

Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencia de los materiales



Inhibición de la enzima fitoeno desaturasa y acumulación de fitoeno en microalgas : el iRNA como mecanismo de silenciamiento génico

**Memoria para optar al grado de doctora
presentada por:**

Marta Vila Spínola

Fecha de lectura: 20 de marzo de 2009

Bajo la dirección de la doctora:

Rosa María León Bañares

Huelva, 2010

ISBN: 978-84-92944-65-1

D.L.: H 107-2010

INHIBICIÓN DE LA ENZIMA FITOENO DESATURASA Y ACUMULACIÓN DE FITOENO EN MICROALGAS. EL iRNA COMO MECANISMO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO



MARTA VILA SPÍNOLA

UNIVERSIDAD DE HUELVA

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales
"Profesor José Carlos Vilchez Martín"

UNIVERSIDAD DE HULEVA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Dpto. de Química y Ciencia de los Materiales
"Profesor Jose Carlos Vilchez Martín"



**INHIBICIÓN DE LA ENZIMA FITOENO DESATURASA Y
ACUMULACIÓN DE FITOENO EN MICROALGAS. EL
iRNA COMO MECANISMO DE SILENCIAMIENTO
GÉNICO**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biología por
la Licenciada

MARTA VILA SPÍNOLA

Directora:

Dra. Rosa M^a León Bañares.
Profesora Contratada a Doctor

A mis padres, por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.....

A Enrique, porque sin él no hubiese llegado.....

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido objeto de las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

PUBLICACIONES

León R., **Vila M.**, Quijano E., González-Ballester D., Galván A. y Fernández E. (2003). *Manipulación genética de microalgas para su utilización en la alimentación de especies de interés acuícola*. Proceedings II Congreso Iberoamericano de acuicultura. Capítulo de libro (ISBN: 84-609-0184-X).

León R., **Vila M.**, Hernánz D., Vílchez C. (2005). *Production of phytoene by herbicide-treated microalgae *Dunaliella bardawil* in two-phase systems*. Biotechnol Bioeng. 92(6):685-694.

León R., **Vila M.** y Vílchez C. (2005). *Efecto de la carencia de nitrógeno sobre la producción de fitoeno por células de *Dunaliella salina* tratadas con el herbicida Norfluorazón*. Avances en el metabolismo del nitrógeno: de los microorganismos a las plantas. Ed. JM Vega *et al.* Capítulo de libro pag 443 (ISBN 84-96373-55-X).

Vila M., Couso I. y León R. (2007). *Analysis of the carotenoids content in mutants of the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii* with low expression levels of the carotenogenic enzyme phytoene desaturasa*. Process Biochemistry 43: 1147-1152.

Couso I., **Vila M.** y León R. *Targeting of exogenous β -carotene oxygenase into the chloroplast is essential for its efficient function in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii** Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (in press)

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Manipulación genética de microalgas para su utilización en la alimentación de especies de interés acuícola. León R., **Vila M.**, Quijano E., González-Ballester D., Galván A., Fernández E. (2003). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura.

Efecto de la carencia de nitrógeno sobre la producción de fitoeno por células de Dunaliella salina tratadas con herbicidas piridazinónicos. **Vila M.**, Quijano E., Vílchez C., León R. (2004) VII Reunión del metabolismo del Nitrógeno. Almonte, Huelva. Póster. Simposio 4.

Development of an expression vector for natural carotenoids production in transgenic microalgae. León R., **Vila M.**, Couso I., González D., Fernández E.. (2005) The 14th International Symposium on Carotenoids. Edimburgo, UK. Póster. Book of Abstracts: Carotenoid Science. Vol.9. pp 150

El promotor regulable de la nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardtii (pNial) permite la selección de transformantes afectados el la síntesis de carotenoides. **Vila M.**, Fernández E., Vega JM., R. León R. (2006) VIII Reunión del metabolismo del Nitrógeno. Lanzarote, España. Póster. Book of Abstracts, S4-P1.

Engineering the carotenoids biosynthetic pathway in microalgae (2007). **Vila M.**, I. Couso I., León R. (2007). 7TH European Workshop "Biotechnology of Microalgae". Nuthetal, Germany. Póster. Book of Abstracts, pg 89.

Targeting of exogenous β -carotene oxigenase into the chloroplast is essential for its efficient function in the microalgae Chlamydomonas reinhardtii. Couso I., **Vila M.**, León R (2007) II International Conference on Environmental, Industrial and Applied microbiology. Sevilla, España. Póster. Book of Abstracts, pg 580.

Analysis of the carotenoids content in mutants of the chlorophyte Chlamydomonas reinhardtii with low expression levels of the carotenogenic enzyme phytoene

desaturasa. **Vila M.**, Couso I., León R (2007). II International Conference on Environmental, Industrial and Applied microbiology. Sevilla, España. Póster. Book of Abstracts, pg 534

Attempts to Knock down the expression of key carotenogenic enzymes. **Vila M.** y León R. (2008). 13th Internacional Chlamydomonas conference. EMBO Workshop on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas. Hyères-les-Palmiers, Var, Francia. Póster. Book of Abstracts, pg 109.

Metabolic Engineering Approaches to Study the Biosynthesis of Carotenoids in Microalgae. (2008). León R., Couso I. **Vila M.** 7th European Symposium on Biochemical Engineering Science ESBES. Faro, Portugal. Póster LMP-18.

Los organismos marinos, y en particular las microalgas, son una fuente importante de infinidad de productos naturales con potenciales aplicaciones terapéuticas e industriales. Son numerosas las aplicaciones de las microalgas en producción de energía, agricultura, tratamiento de aguas residuales, obtención de compuestos químicos (PUFAs pigmentos, polisacáridos, proteínas, vitaminas) y compuestos terapéuticos (Richmond, 2004). La calidad y funcionalidad de los aditivos alimentarios repercute en la calidad de los alimentos y en sus efectos sobre la salud, por lo que existe un creciente interés en el desarrollo de productos naturales para su uso como aditivos en alimentación humana y animal, así como complementos nutricionales o en formulaciones cosméticas. En particular, los carotenoides presentan un especial interés por su capacidad antioxidante, colorante, provitamínica y terapéutica. Las microalgas son la principal fuente natural de un buen número de carotenoides naturales, entre los que podemos citar β -caroteno, astaxantina o luteína, por lo que su explotación industrial para la producción de estos carotenoides está bastante extendida. No obstante el cultivo de microalgas a gran escala y su utilización para producir carotenoides no está exento de problemas. El número de carotenoides producidos industrialmente se restringe sólo a unos pocos y las productividades no son siempre tan altas como sería deseable. El conocimiento adecuado de las rutas biosintéticas, su regulación y los factores que influyen sobre ellas es fundamental para el óptimo aprovechamiento de esta incipiente tecnología.

La obtención de microalgas hiperproductoras de carotenoides de interés esta siendo objeto de numerosas investigaciones a día de hoy, y desde hace algunos años. A diferencia de lo que ocurre en procariotas, en el genoma nuclear de las microalgas y otros eucariotas, el ADN foráneo se integra preferentemente al azar por recombinación no homóloga. Esto ha dificultado los estudios metabólicos por aproximaciones de genética reversa y ha impedido la modificación genética de las microalgas para obtener especies que acumulen mayores cantidades de metabolitos de interés mediante la inactivación selectiva de ciertos genes.

Con estos antecedentes nos planteamos estudiar la acumulación del fitoeno en microalgas.

El fitoeno es el primer carotenoides incoloro y lineal, en la ruta de la carotenogénesis. Se forma por la condensación de dos moléculas de Geranylgeranyl pirofosfato, por acción de la enzima fitoeno sintasa. A partir del fitoeno se sintetizan el resto de carotenos mediante una serie de desaturaciones y ciclaciones; y las xantofilas por hidroxilación, oxidación o epoxidación de los correspondientes carotenoides. El paso del fitoeno a licopeno implica la acción sucesiva de dos desaturasas (PDS y ZDS), que introducen enlaces dobles conjugados en el esqueleto carbonado del fitoeno. La enzima fitoeno desaturasa (PDS) será objeto de estudio en este trabajo, ya que su inhibición supondría una acumulación de fitoeno.

La capacidad de *Dunaliella bardawil* para sintetizar β -caroteno en respuesta a condiciones de estrés ambiental o carencias nutricionales es bien conocida. La limitación de la fuente de nitrógeno es uno de los factores nutricionales que más fuertemente induce la activación de la carotenogénesis. El herbicida piridazinónico norflurazon inhibe la fitoeno desaturasa mediante competición con sus cofactores. En la primera parte de este trabajo hemos observado mediante análisis por cromatografía líquida (HPLC) que tratar células de esta microalga, sometida a carencia de nitrógeno, con norflurazon, provoca la acumulación de fitoeno, carotenoide incoloro muy apreciado en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria por sus propiedades antioxidantes.

El uso de construcciones antisentido o la expresión de secuencias que generen pequeños RNA de interferencia ("siRNA") ya ha sido utilizado con éxito para la supresión específica de varios genes en *Chlamydomonas*. En este trabajo hemos obtenido transformantes de *Chlamydomonas*, mediante esta técnica, con bajos niveles de expresión para la fitoeno desaturasa pero que sorprendentemente no acumulan fitoeno. Esto es debido a la existencia de dos genes para esta enzima. La construcción de vectores de expresión apropiados para microalgas ha sido fundamental para conseguir la expresión de genes o construcciones en *Chlamydomonas*, y ha permitido, mediante el uso de construcciones con genes marcadores, la selección de transformantes. Además, la utilización de promotores

inducibles ha permitido aislar transformantes cuyas características adquiridas suponían letales.

Dado el papel de los carotenoides como antioxidantes protectores frente al daño fotooxidativo, hemos aportado también en la búsqueda de mutantes de *Chlamydomonas*, obtenidos mediante mutagénesis insercional, sensibles a altas intensidades de luz. Esta sensibilidad se explica por la interrupción de algún gen de la ruta de carotenogénesis, obteniendo así mutantes deficientes en algún carotenoides, lo que supondría una gran susceptibilidad frente al daño fotooxidativo.

A	adenina
Act. Foto.	actividad fotosintética
AGO	proteína Argonuta
<i>Bkt</i>	β -caroteno-C4-oxigenasa
C	citocina
C-	control negativo
cDNA	DNA complementario o DNA de cadena sencilla
Chl	clorofila
Chl a	clorofila a
Chl b	clorofila b
CRTI	enzima caroteno isomerasa
CRTISO	enzima caroteno isomerasa
CRTP	enzima fitoeno desaturasa en cianobacterias
CRTQ	enzima chis-caroteno desaturasa en cianobacterias
Ct	carotenoides totales
C _t	“treshold cycle “o ciclo umbral
Da	dalton
D.O	densidad óptica
DCL1	enzima Dicer like 1
DECP	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfoxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	nucleótidos
dR	derivada de la fluoresecencia
dsRNA	doble cadena de RNA
DTT	dithiothreitol
DW	peso seco; del inglés Dry Weight
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FAD	dinucleótido flavin adenina
FADH ₂	dinucleótido flavin adenine reducido
Fcp	proteína de unión a fucoxantina y clorofila
Fig	figura
Fit	fitoeno

For	cebador forward
G	guanina
g	unidad de fuerza centrífuga, gravedad
gDNA	DNA genómico
Gfp	gen green fluorescent protein
GGPP	geranil-geranilpírofosfato
GRAS	“Generally Regarded As Safe”, generalmente referido como seguro
h	hora
HPLC	cromatografía líquida
Hsp70A	“heat shock protein” o proteína de choque térmico
IPP	isopentenil pirofosfato
iRNA	RNA interferencia
Kb	kilobase
KDa	kilodalton
l	litro
LB	medio Luria-Bertoni
LCYB	licopeno ciclasa beta
LCYE	licopeno ciclasa Epsilon
LiCl	cloruro de litio
Luc	luciferasa
Lut	luteína
M	molar
m	pendiente
min	minuto
miRNA	micro RNA
ml	mililitro
mM	mili molar
mRNA	RNA mensajero
MVA	ácido mevalónico
mWm ⁻²	mili vatios por metros cuadrado
n	ordenada en el origen
NAD	dinucleótido de nicotinamida adenina

Nº cél	número de células
Neo	noexantina
ND	no digerido
ng	nanogramos
nm	nanometros
OFA	“one for all” o tampón uno para todos
OMGs	organismos modificados genéticamente
ORF	“open reading frame” o marco de lectura abierto
PAR	región del espectro 400-700 nm
pb	para de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDS	enzima fitoeno desaturasa
<i>pds</i>	gen fitoeno desaturasa
PEG	polietilenglicol
PLK	región polilinker o de múltiple clonaje
pNia1	promotor nitrato reductasa
PSY	enzima fitoeno sintasa
<i>psy</i>	gen fitoeno sintasa
PTGS	silenciamiento génico posttranscripcional
PUFAs	ácido grasos poli-insaturados
R ²	coeficiente de regresión lineal
Ramp	resistencia ampicilina
<i>rbcS2</i>	promotor de la subunidad pequeña del gen de la rubisco
RESDA PCR	restriction enzyme site-directed amplification
RISC	RNA-induced silencing complex
Rev	cebador reverso
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecilsulfato sódico
shRNA	horquilla de RNA
siRNA	pequeñas moléculas de RAN interfrentes
T	timina
Ta	temperatura de hibridación
TAIL PCR	“Termal Asymetric Interlaced PCR”

TAP	medio tris-acetato fosfato
ter rbcS2	región terminadora de la subunidad pequeña del gen rubisco
TGS	silenciamiento génico transcripcional
T _m	temperatura de desnaturalización
tRNA	RNA transferente
U	uracilo
<i>ubq-L</i>	ubiquitina ligasa
UTR	región no traducida
UV	luz ultravioleta
UVB	luz ultravioleta B
Vis	luz visible
VIGS	silenciamiento génico inducido por virus
Viol	violaxantina
Zds	enzima zis-caroteno desaturasa en plantas o microalgas
Zea	zeaxantina
β-car	beta-caroteno
ΔΔC _t	método comparativo de los C _t
μChlml ⁻¹	microgramos de clorofila por mililitro de cultivo
μl	microlitros
μm	micro metro

Índice de Tablas

Tabla I.	Resumen de las especies más importantes de microalgas que han sido modificadas genéticamente y el método de transformación utilizado
Tabla II.	Reacción para la clonación de productos de PCR en el vector pGEM-T
Tabla III.	Cebadores utilizados en el trabajo
Tabla IV.	Efecto de diferentes concentraciones de norflurazón sobre la actividad fotosintética y el contenido en clorofila de células de <i>Dunaliella bardawil</i>
Tabla V.	Promotores y genes marcadores utilizados en construcciones para vectores de expresión para microalgas
Tabla VI.	Estudio de sensibilidad de células de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> al antibiótico bleomicina
Tabla VII.	Caracterización de los transformantes que presentan bajo nivel de expresión para la PDS
Tabla VIII.	Caracterización fenotípica de los mutantes deficientes en pigmentos
Tabla IX.	Cebadores utilizados para la RESDA-PCR

Índice de Figuras

Fig.1.	Importancia de las microalgas.
Fig.2.	Estructura química de los carotenoides
Fig.3.	Ruta de la carotenogénesis en células vegetales
Fig.4.	Alineamiento de las secuencias de la fitoeno desaturasa de distintas microalgas
Fig.5.	Árbol filogenético de la fitoeno desaturasa
Fig.6.	Estructura básica de una molécula siRNA
Fig.7.	Esquema del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA interferencia

- Fig.8.** Bacterias modificadas genéticamente para la producción de determinados carotenoides
- Fig.9.** *Chlamydomonas reinhardtii*
- Fig.10.** *Dunaliella bardawil*
- Fig.11.** Mapa del vector de clonación pGEM-T
- Fig.12.** Mapa del vector de clonación pUC57.
- Fig.13.** Esquema del gen *Ble* en el plásmido pSP124S
- Fig.14.** Diagrama del plásmido pSI103
- Fig.15.** Detalles de cultivos de microalgas en sus distintas modalidades
- Fig.16.** Detalle de un gel de electroforesis
- Fig.17.** Cuantificación electroforética de fragmentos de DNA
- Fig.18.** Ejemplo de secuenciación de un gen.
- Fig.19.** Detalle del Programa “Primer Select” para el diseño de cebadores
- Fig.20.** Ejemplo de cebador degenerado
- Fig.21.** Efecto de la carencia de nitrógeno sobre células de *Dunaliella bardawil*
- Fig.22.** Estructura química del herbicida norflurazón
- Fig.23.** Ruta simplificada de la carotenogénesis en microalgas.
- Fig.24.** Producción de β -caroteno y fitoeno en células de *Dunaliella bardawil* tratadas con norflurazón
- Fig.25.** Evolución del contenido de carotenoides y clorofila en *Dunaliella bardawil*
- Fig.26.** Cromatograma donde del perfil de pigmentos de las células de *Dunaliella bardawil* cultivadas en distintas condiciones
- Fig.27.** Producción de fitoeno por células de *Dunaliella bardawil* sometidas a carencia de nitrógeno en presencia del herbicida norflurazón
- Fig.28.** Efecto de la intensidad de luz visible (A) y de la luz UVB (B) en la viabilidad de células control y de células de *Dunaliella bardawil* tratadas con norflurazón
- Fig.29.** Ciclo de las xantofilas
- Fig.30.** Diagrama del plásmido pSI104PLK: vector de expresión para microalgas

- Fig.31.** Cebadores diseñados para amplificar el cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*
- Fig.32.** Amplificación del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* por PCR
- Fig.33.** Mapa de restricción y electroforesis de la digestión del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*
- Fig.34.** Digestión del plásmido pSI105 para la clonación del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*
- Fig.35.** Diagrama del plásmido pSI105: vector de expresión para microalgas
- Fig.36.** Comprobación por restricción de las colonias transformadas con el plásmido pGEM-T-*Ble*
- Fig.37.** Comprobación por restricción de las colonias transformadas con el plásmido pSI105-*Ble*
- Fig.38.** Comparación de la eficiencia entre la transformación con pSI105-*Ble* (A) y la cotransformación con pSI103+pSP124S (B)
- Fig.39.** Mapa de restricción del plásmido pBKs
- Fig.40.** Digestión de los plásmido pBKs-pNia1 y pSI104PLK para la construcción del vector pSI104PLKpNia1
- Fig.42.** Comprobación por restricción de las colonias transformadas con el plásmido pSI104PLKpNia1
- Fig.41.** Diagrama del plásmido pSI104PLKpNia1: vector de expresión para microalgas
- Fig.43.** Ruta metabólica para la conversión de fitoeno en licopeno
- Fig.44.** Estimación del posible péptido señal en la PDS por comparación entre secuencias eucariotas y procariontes.
- Fig.45.** Secuencias diana elegidas para generar dsRNA
- Fig.46.** Esquema de las construcciones diseñadas para inhibir la PDS de *Chlamydomonas reinhardtii*
- Fig.47.** Horquilla de RNA
- Fig.48.** Mapa de restricción del plásmido pUC57
- Fig.49.** Esquema del plásmido pSI104PLKpNia1-siRNA
- Fig.50.** Mecanismo de silenciamiento por RNA antisentido

- Fig.51.** PCR para amplificar la banda *pds1.300*
- Fig.51.** Esquema del plásmido pSI104PLKpNia1-*pds1300*
- Fig.53.** Transformación nuclear de células de *Chlamydomonas reinhardtii* con perlas de vidrio
- Fig.54.** Cebadores diseñados para verificar la integración de las construcciones diseñadas para el silenciamiento de la PDS en el genoma de las células de *Chlamydomonas reinhardtii* cotransformadas
- Fig.55.** Ejemplo de PCR para verificar la integración de la construcción *pds1300* antisentido en el genoma de las células de *Chlamydomonas reinhardtii* cotransformadas
- Fig.56.** PCR para verificar la integración de las construcciones iRNA en el genoma de las células de *Chlamydomonas reinhardtii* cotransformadas
- Fig.57.** Localización de los cebadores diseñados para la amplificación de transcritos del gen *pds* por qPCR a tiempo real
- Fig.58.** Funcionalidad de los cebadores para qPCR a tiempo real
- Fig.59.** Curva de calibrado para el gen *pds*
- Fig.60.** Curva de calibrado para el gen *ubiquitina ligasa*
- Fig.61.** Ejemplo de qPCR a tiempo real para la obtención de la recta de calibrado del gen *pds*.
- Fig.62.** Ejemplo de curva de amplificación por qPCR a tiempo real
- Fig.63.** Abundancia relativa del transcrito de la fitoeno desaturasa en los transformantes asilados
- Fig. 64.** Esquema del plásmido PSI104 linealizado
- Fig. 65.** Aislamiento y cuantificación del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*
- Fig. 66.** Mutantes deficientes en pigmentos
- Fig. 67.** Montaje para someter a los mutantes a alta intensidad de luz
- Fig. 68.** Mutantes sensibles a la luz que sufren "Photoblaching"
- Fig. 69.** Mutantes sensibles a alta intensidad de luz
- Fig. 70.** Cebadores utilizados en el primer ciclo de amplificación de la RESDA-PCR

- Fig. 71.** Resultado de la segunda ronda de amplificación de la RESDA-PCR
- Fig. 72.** Resultado de la primera ronda de amplificación de la RESDA-PCR
- Fig. 73.** Secuencia de la banda 6 amplificada por RESDA-PCR
- Fig. 74.** Localización de la mutación

Abreviaturas

Indice de Tablas y Figuras

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Importancia de las microalgas	7
2. Carotenoides	7
2.1. Definición, estructura e importancia	7
2.2. Biosíntesis de carotenoides en células vegetales	8
2.3. Enzima fitoeno desaturasa	11
3. Producción de carotenoides por microalgas	15
4. Manipulación genética de microalgas	18
4.1. Métodos para la transformación genética de microalgas	19
4.2. Construcciones y estrategias	21
4.3. Principales problemas para la expresión de transgenes en microalgas	22
5. Silenciamiento génico mediado por RNA interferencia	23
5.1. Antecedentes	25
5.2. Mecanismo molecular	26
5.3. Silenciamiento génico en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	30
6. Producción de carotenoides en organismos modificados genéticamente	32
7. Objetivos	36
II. MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Organismos empleados	41
1.1. Estirpes bacterianas	41
1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	41

1.2. Microalgas	41
1.2.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	41
1.2.2. <i>Dunaliella bardawil</i>	42
2. Vectores plasmídicos	43
2.1. Comerciales	43
2.1.1. pGEM-T	43
2.1.2. pUC57	44
2.2. No comerciales	45
2.2.1. pSP124S	45
2.2.2. pSI103	46
3. Medios y condiciones de cultivo	47
3.1. Cultivos bacterianos	47
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	47
3.2. Cultivos para microalgas	48
3.2.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48
3.2.2. <i>Dunaliella bardawil</i>	50
4. Seguimiento del crecimiento celular	51
4.1. Seguimiento del crecimiento celular en bacterias	51
4.2. Seguimiento del crecimiento celular en microalgas	51
4.2.1. Recuento del número de células	51
4.2.2. Peso Seco	52
4.2.3. Densidad óptica	52
5. Manipulación de DNA	52
5.1. Métodos de extracción de DNA plasmídico	52
5.1.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina	52
5.1.2. Minipreparaciones de DNA plasmídico por cromatografía de intercambio iónica	53
5.1.3. Midipreparaciones de DNA plasmídico por cromatografía de intercambio iónica	53
5.2. Métodos de extracción de DNA genómico	53
5.2.1. A partir de cultivos de gran volumen	53
5.2.2. Minipreparaciones	54
5.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa	55

5.4. Extracción y purificación de fragmentos de DNA de gel de agarosa	56
5.5. Cuantificación de DNA	56
5.5.1. Cuantificación electroforética	56
5.5.2. Cuantificación espectrofotométrica	57
5.6. Digestión de fragmentos de DNA	57
5.7. Ligación de fragmentos de DNA	58
5.8. Secuenciación de	58
6. Manipulación del RNA	59
6.1. Aislamiento del RNA mensajero (mRNA)	59
6.1.1. Extracción con fenol/cloroformo y precipitación con LiCl	59
6.1.2. Cromatografía de intercambio iónico	60
6.2. Cuantificación del RNA	60
6.3. Retrotranscripción del mRNA	60
7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	61
7.1. Diseño de cebadores	61
7.2. Ligación de los productos de la PCR al vector pGEM-T	62
7.3. qPCR cuantitativa a tiempo real	63
7.4. RESDA-PCR	65
8. Técnicas de transformación genética	66
8.1. Cepas bacterianas	66
8.1.1. <i>Escherichia coli</i>	66
<i>Células competentes</i>	66
<i>Transformación de células competentes</i>	67
8.2. Microalgas	67
8.2.1. Transformación con perlas de vidrio	67
9. Determinaciones analíticas en microalgas	68
9.1. Medida de pigmentos	68
<i>Determinación espectrofotométrica de clorofila y carotenoides</i>	
<i>Totales</i>	68
<i>Determinación por cromatografía líquida de clorofilas y</i>	
<i>carotenoides específicos</i>	69
9.2. Medida de producción y consumo de oxígeno dependiente de luz	69
10. Herramientas de bioinformática	71

	<i>Indice</i>
10.1. Bases de datos de secuencias	71
<i>Genéricas</i>	71
<i>Específicas</i>	71
10.2. Herramientas para el análisis de secuencias	71
<i>Para el alineamiento de secuencias</i>	71
<i>Para el diseño de cebadores para PCR</i>	71
<i>Para la edición de secuencias</i>	71
<i>Otros</i>	71
11. Cebadores utilizados	72

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 73

1. Efecto de la inhibición de la enzima fitoeno desaturasa sobre la síntesis de carotenoides en la clorofita *Dunaliella bardawil* 75

1.1. Efecto de la carencia de nitrógeno sobre la producción de carotenoides en <i>Dunaliella bardawil</i>	77
1.2. Tratamiento de células de <i>Dunaliella bardawil</i> con el herbicida norflurazón	79
1.2.1. Efecto de diferentes concentraciones de norflurazón sobre la actividad fotosintética	81
1.2.2. Efecto de diferentes concentraciones de norflurazón sobre la biosíntesis de los carotenoides β -caroteno y fitoeno	82
1.3. Efecto del norflurazón sobre el perfil de pigmentos de <i>Dunaliella bardawil</i>	83
1.3.1. Producción de fitoeno por células de <i>Dunaliella bardawil</i> sometidas a carencia de nitrógeno y en presencia de norflurazón	86
1.4. Susceptibilidad de células de <i>Dunaliella bardawil</i> tratadas con norflurazón en condiciones fotooxidativas	87
1.5. Discusión	89

2. Construcción de vectores de expresión para <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	93
2.1. Construcción del vector de expresión pSI104PLK	96
2.2. Construcción del vector de expresión pSI105	98
2.2.1. Clonación del cassette <i>Hsp70A:rbcS2:AphVIII</i> en el vector pSI104PLK	100
2.3. Estudio de la funcionalidad del vector de expresión pSI105	101
2.3.1. Aislamiento del gen <i>Ble</i>	102
2.3.2. Clonación del gen <i>Ble</i> en el vector pSI105	103
2.3.3. Estudio de la sensibilidad a bleomicina	104
2.3.4. Comparación de la eficiencia entre transformación y Cotransformación	105
2.4. Construcción del vector pSI104PLKpNia1	107
2.5. Discusión	110
3. Silenciamiento génico en microalgas: aislamiento de transformantes con bajos niveles de expresión de la fitoeno desaturasa en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	113
3.1. Estrategia para inhibir la expresión del gen <i>pds</i> en <i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	115
3.1.1. Fitoeno desaturasa	115
3.1.2. Mecanismos para inhibir la expresión del gen <i>pds</i> en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	118
3.2. Construcciones para inhibir la fitoeno desaturasa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	119
3.2.1. Construcciones para generar siRNA	119
3.2.2. Construcciones RNA antisentido	123
3.3. Transformación de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con las construcciones diseñadas y selección de los transformantes	125

3.4. Estudio del nivel de expresión del gen <i>pds</i>	129
3.4.1. Cuantificación relativa por qPCR a tiempo real del nivel de expresión del gen <i>pds</i> en los transformantes obtenidos	129
<i>Gen de la Ubiquitina ligasa como control interno</i>	130
<i>Cebadores para la cuantificación del mRNA de la PDS por qPCR a tiempo real</i>	131
<i>Condiciones para la reacción de qPCR a tiempo real</i>	132
<i>Curvas de calibrado y eficiencia de los cebadores utilizados para amplificar el gen <i>pds</i> y el gen Ubiquitina ligasa</i>	133
<i>Análisis de los resultados</i>	136
3.5. Caracterización de los transformantes aislados	140
3.6. Discusión	141
4. Aislamiento de mutantes en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> por mutagénesis insercional	145
4.1. Obtención de mutantes insercionales en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	148
4.1.1. Linearización del plásmido pSI104 y obtención del cassette <i>Hsp70A:rbcS2:AphVIII</i>	148
4.2. Selección y caracterización fenotípica de los mutantes	150
<i>Mutantes con alteraciones en su pigmentación</i>	151
<i>Mutantes sensibles a la luz</i>	153
<i>Mutantes que sufrían blanqueamiento</i>	154
<i>Mutantes incapaces de crecer bajo altas intensidades de luz</i>	154
4.3. Aproximación a la caracterización molecular los mutantes aislados	155
4.4. Discusión	161
V. CONCLUSIONES	163
VI. BIBLIOGRAFIA	169

I. INTRODUCCIÓN

1. IMPORTANCIA DE LAS MICROALGAS

Los organismos marinos, y en particular las microalgas, son una fuente importante de infinidad de productos naturales con potenciales aplicaciones terapéuticas e industriales. El término microalga hace referencia a aquellos microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, y son capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Es un grupo bastante heterogéneo, con gran variedad de formas y tamaños, que habita prácticamente la totalidad de los ecosistemas acuáticos, y se encuentra también en suelos, rocas y plantas (Field 1998). Incluye dos tipos celulares distintos: cianobacterias, con estructura celular procariota, y las restantes microalgas de estructura celular eucariota. Actualmente se conocen unas 500.000 especies, cuya clasificación ha ido modificándose con el tiempo (South y Whittick 1987; Ben-Amotz y Avron 1990; Richmond 1990).

Los principales usos y aplicaciones de las microalgas, se resumen en la figura 1 y se describen con más detalle a continuación.

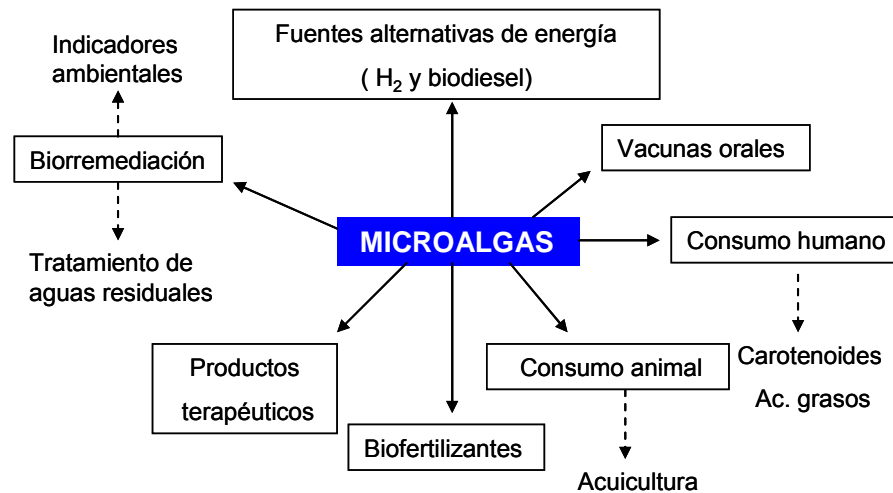


Fig. 1. Importancia de las microalgas. Principales aplicaciones de las microalgas.

A lo largo de la historia, las microalgas han venido empleándose para distintos fines, siendo el más antiguo de ellos su uso como alimento para consumo animal o humano. El pueblo azteca recolectaba microalgas (cianobacterias del género *Spirulina maxima*) de las aguas del lago Texcoco y las empleaba en la elaboración de distintos alimentos (García-González *et al.*, 2000). La producción a gran escala de las microalgas se inicia en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial, donde comenzó el cultivo masivo de diatomeas que mostraban capacidad de acumular grandes cantidades de lípidos bajo ciertas condiciones de cultivo. El consumo de microalgas tiene especial aceptación en los países asiáticos donde desde los años 60 se comercializa con éxito el alga *Chlorella*, admitida como producto dietético-medicinal (Richmond 2004). Hoy en día se estima que hasta un 75% de la producción mundial de microalgas se destina a la alimentación humana en forma de preparados en polvo, pastillas, cápsulas y tabletas. Su producción y comercialización se encuentra sometida a estrictas medidas de regulación, por las normativas europeas 1830/2003 CE y 1829/2003 CE.

Los efectos beneficiosos de la biomasa de microalgas para la salud humana se basan en las propiedades de la gran variedad de compuestos bioactivos que ésta contiene; ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que actúan como potentes antioxidantes, vitaminas, y carotenoides como β -caroteno, astaxantina, luteína o zeaxantina. Además, se ha demostrado la capacidad de algunas especies para producir compuestos terapéuticos (Richmond 2004) con propiedades antibióticas, antiinflamatorias o antivirales. Las microalgas o sus derivados son utilizados también en la industria alimentaria como suplemento nutricional o como aditivos alimentarios (Becker 2004; Colla *et al.*, 2004; Pulz y Gross 2004).

Otra de las aplicaciones de las microalgas es su uso en alimentación animal (Becker 2004), destacando su uso en acuicultura, donde la biomasa resulta de vital interés para el cultivo de bivalvos (ostras, almejas, navajas, etc.), que se alimentan exclusivamente de microalgas; para los estadios tempranos de larvas de gambas y otros crustáceos, y de varias especies de zooplancton (artemias, rotíferos) que son a su vez la base para la alimentación de las larvas de peces

(Borowitzka 1997, Zmora y Richmod 2004). Además, los pigmentos presentes en muchas especies de microalgas incrementan el color rosado de salmónidos y crustáceos (Duerr *et al.*, 1998, Jaime-Ceballos *et al.*, 2004).

Alrededor de los años 80 cobra importancia la utilización de microalgas en el tratamiento de aguas residuales y en biorremediación. Se ha descrito la utilización de microalgas para eliminar fosfatos, nitrato amonio (Vílchez 1997), metales pesados (Sathish *et al.*, 2007) o compuestos orgánicos (León *et al.*, 2001). En los últimos años, la capacidad de las microalgas para mitigar el exceso de emisiones de CO₂ y luchar contra el cambio climático, ha renovado el interés por el cultivo a gran escala de algas como consumidoras de anhídrido carbónico (Otsuki 2001). Algunas empresas como Green Fuel Technologies (<http://www.greenfuelonline.com>) ofrecen la tecnología para eliminar el anhídrido carbónico de los gases emitidos por instalaciones industriales mediante microalgas.

Las microalgas pueden emplearse como biofertilizantes y acondicionadoras del suelo. Hay especies de microalgas que favorecen la fijación de nitrógeno, y han hecho posible, por ejemplo, el cultivo de arroz sin adición de fertilizantes. Además, dada la importancia ecológica de las microalgas como productoras primarias de los ambientes acuáticos, pueden ser utilizadas como indicadores de contaminación ambiental (Ayala y Vargas 1987; Olaizola 2003).

Conforme continúan las investigaciones se descubren nuevas aplicaciones para las microalgas. La potencial producción de biodiesel (Li *et al.*, 2008) e hidrógeno (Melis 2007, Hemschemeier 2007, Ghirardi *et al.*, 2000, Ghirardi 2006) por microalgas cobra especial importancia en el actual panorama de crisis energética. Otro campo novedoso con importantes aplicaciones potenciales es la utilización de microalgas como sistemas eucariotas para la expresión de proteínas heterólogas, que pueden ser desde hormonas o anticuerpos, hasta antígenos para la inmunización de especies animales (León *et al.*, 2004). Recientemente se ha descrito la expresión de proteínas antigénicas en el cloroplasto de *C. reinhardtii* y se ha demostrado su capacidad como vehículo para el suministro de vacunas recombinantes por vía oral en peces y conejos (Siripornadulsil *et al.*, 2007).

Hoy en día, tanto la biomasa de algas como los extractos de la misma, han ganado una posición firme en el mercado. La demanda por parte de las industrias farmacéuticas, agroalimentarias o cosméticas, de productos de alto valor añadido obtenidos a partir de estos microorganismos ha provocado que en los últimos años haya surgido un enorme interés por la biotecnología de microalgas (Raja et al., 2008). No obstante, las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas han sido mucho menos estudiadas que las que implican a bacterias o levaduras. Las limitaciones para la transformación genética de microalgas, que impiden su manipulación genética, y la menor experiencia en los sistemas de cultivo a gran escala es, sin duda, un handicap importante. Todo esto ha disparado las investigaciones sobre la producción a gran escala de las especies de mayor interés comercial, los parámetros óptimos para el crecimiento de las distintas especies aisladas, y la mejora genética de estas cepas, no sólo desde el punto de vista biotecnológico, sino con el objetivo de un mayor conocimiento fisiológico y bioquímico de las mismas. Cada vez se desarrollan más herramientas moleculares y recursos genéticos (Grossman 2007), que nos permitirán el estudio de los procesos metabólicos que tienen lugar en las microalgas y su regulación, y facilitarán su aprovechamiento biotecnológico. Ya contamos con las secuencias del genoma completo o casi completo de clorofitas como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri*, *Ostreococcus tauri* y *Chlorella sp*, así como el de las diatomeas *Phaedactylum tricornutum* y *Thalassiosira pseudonana*. La secuenciación del genoma de *Botryococcus braunii* esta en realización (<http://genome.jgi-psf.org>). También se han desarrollado microarrays para varias microalgas de interés como *Chlamydomonas* (Eberhard 2006) o *Haematococcus* (Eom et al., 2006), lo que nos permite el estudio simultáneo de la expresión de miles de genes, en respuesta a cambios ambientales o nutricionales.

2. CAROTENOIDES

2.1. Definición, estructura e importancia

Los carotenoides son un amplio grupo de isoprenoides presentes en todos los organismos fotosintéticos y en algunos no fotosintéticos. La mayoría son poliisoprenoides de 40 átomos que poseen una cadena hidrocarbonada que se podría considerar la espina dorsal de la molécula. Esta cadena puede presentar en los extremos estructuras cíclicas o anillos, en algunos casos complementados con grupos funcionales que contienen oxígeno. Los carotenoides que contienen exclusivamente carbono e hidrógeno en su estructura se conocen como carotenos (Fig.2), mientras que los derivados oxigenados de estos hidrocarburos se conocen como xantofilas (luteína, zeaxantina, violaxantina, etc.). La estructura de un carotenoide puede determinar en parte la función biológica del pigmento. Su coloración tiene relación directa con su estructura, así, a la vez que el número de dobles enlaces conjugados aumenta, la longitud de onda de la luz absorbida también aumenta, confiriendo al carotenoide un color más rojizo. Los máximos de absorción varían desde 450 a 490 nm.

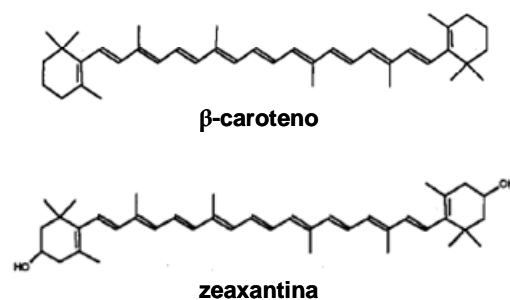


Fig. 2. Estructura química de los carotenoides. Ejemplo de la estructura química de un caroteno (β -caroteno), y de una xantofila (zeaxantina), sintetizados por microalgas.

Los carotenoides se unen a ciertas proteínas integrales de la membrana tilacoidal donde participan en los procesos de captación de luz y prevención del daño fotooxidativo del aparato fotosintético (Demming-Adams *et al.*, 1996; Baroli y

Niyogi 2000). Además juegan un importante papel como antioxidantes y factores provitamínicos en muchos organismos, que deben incluirlos en su dieta debido a que sólo los organismos fotosintéticos, y ciertas bacterias y hongos, son capaces de sintetizarlos. Sus aplicaciones en la industria agroalimentaria, cosmética y acuícola, así como sus ventajas nutricionales y terapéuticas se basan en su color y en su alta capacidad de protección frente a radicales libres (Richmond, 2000; Lorenz y Cysewski, 2000; Eonseon *et al.*, 2003; Borowitzka, 1997). La ingesta de carotenoides ha demostrado ofrecer protección frente la degeneración macular, los daños inducidos en la piel por la luz UV y algunas enfermedades degenerativas asociadas a la edad avanzada (Guerin *et al.*, 2003; Nishino *et al.*, 2002; Semba y Dagneile, 2003). Estudios recientes sugieren que las propiedades antioxidantes y otras funciones biológicas inesperadas de los carotenoides, relacionadas con la regulación génica y la comunicación intercelular, pueden proporcionar beneficios adicionales para la salud. Por ejemplo, la luteína, puede reducir el riesgo de diversos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y oftalmológicas. Otros carotenoides presentan también acción anticarcinogénica, antimutagénica, estimuladora del sistema inmune, antiinflamatoria (Demming-Adams, 2002; Stahl y Sies 2005), reductora de hipertensión, desintoxicante y reductora de colesterol. La ingesta de luteína y zeaxantina disminuye el riesgo de padecer cataratas y enfermedades degenerativas de la retina relacionadas con el envejecimiento (Guerin *et al.*, 2003). Por lo que podemos considerar a los carotenoides como alimentos funcionales o nutraceuticos -compuestos dietéticos con valor terapéutico-

2.2. Biosíntesis de carotenoides en células vegetales

Las revisiones de Sandmann (1994), Armstrong (1997) y sobre todo Cunningham y Gantt (1998) y las más recientes de Botella-Pavía y Rodríguez-Concepción (2006) y Sandmann (2006) dan una buena visión general de esta ruta metabólica en plantas y microorganismos (Fig.3).

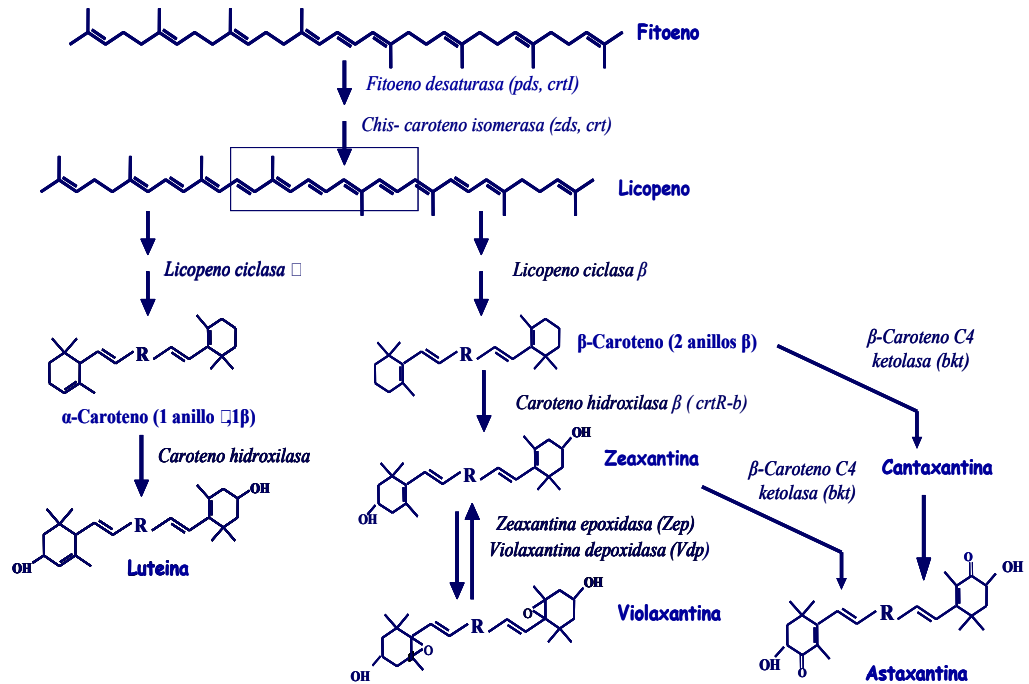


Fig. 3. Ruta de la carotenogénesis en células vegetales

Los carotenoides se forman a partir de un bloque constructor de 5C, precursor de todos los isoprenoides, el isopentenil pirofosfato (IPP). Hasta hace poco era asumido que la bien conocida ruta del ácido mevalónico (MVA) era la responsable de la biosíntesis de IPP en todos los organismos, pero se ha descubierto una ruta alternativa independiente de MVA, que parece ser la principal responsable de la síntesis de carotenoides en los tejidos fotosintéticos. Esta ruta fue identificada al cultivar bacterias y microalgas en presencia de acetato marcado con ^{13}C y observar inesperados patrones de marcaje, que no concordaban con lo esperado según la ruta del mevalonato (Eisenreich *et al.*, 2004, Lichtenhaler 1999).

El IPP formado se isomeriza mediante la isopentenil pirofosfato isomerasa (Ipi) a dimetilalil pirofosfato, que por la adición consecutiva de tres moléculas de IPP se convierte en GGPP (Geranil-geranil pirofosfato). La condensación de dos moléculas de GGPP catalizada por la fitoeno sintasa (PSY) nos conduce a la síntesis del primer carotenoide de 40C lineal incoloro, el fitoeno. A partir de fitoeno se sintetizan el resto de carotenoides, por una serie de desaturaciones y ciclaciones, y las xantofilas por hidroxilación, oxidación o epoxidación de los correspondientes carotenoides (Fig.3). Así, el fitoeno sufre una serie de cuatro desaturaciones consecutivas que transforman el fitoeno incoloro en el licopeno de color rosado. En plantas y microalgas esta conversión está catalizada por dos enzimas muy relacionadas, la fitoeno desaturasa (PDS) y la Chis (Z)-fitoeno desaturasa (ZDS), para sintetizar pro-licopeno o poly *cis* licopeno, que es isomerizado al licopeno todo *trans* gracias a la enzima carotenoide isomerasa (CRTISO). Parece que esta isomerización también puede tener lugar espontáneamente en presencia de luz, aunque la actividad CRTISO se ha encontrado en muchas plantas y algas (Isaacson *et al.*, 2002). PDS y ZDS siguen el mismo mecanismo de reacción utilizando plastoquinona como aceptor de hidrógeno y conectando así la desaturación del caroteno con la cadena de transporte electrónico fotosintético.

El licopeno puede ciclarse por acción de la licopeno ciclasa-beta (LCY β) para dar gamma-caroteno con un anillo beta, o por la acción de la licopeno ciclasa epsilon (LCY ϵ) para dar delta-caroteno con un anillo epsilon. A su vez cada uno de ellos puede ciclarse nuevamente por la acción de cualquiera de las dos ciclasas. De forma que puede obtenerse beta-caroteno con los dos anillos beta o alfa-caroteno con un anillo *beta* y otro epsilon. Los anillos beta y epsilon sólo se diferencian en la posición de un doble enlace.

La hidroxilación en el C3 de cada anillo de β -caroteno produce zeaxantina (3, 3'-hidroxi- β -caroteno) y la hidroxilación del C3 de cada anillo de β -caroteno produce luteína (3,3'-hidroxi- β -caroteno). La enzima cetolasa (β -caroteno-C4-oxigenasa, *BKT*) es la principal responsable de la síntesis de astaxantina. Esta enzima no existe en plantas superiores, tan sólo en algunas microalgas como

Haematococcus o *Muriella zofingiensis*, bacterias fotosintéticas como *Agrobacterium aurantiacum* y algunos hongos. La astaxantina se sintetiza a partir del β -caroteno mediante dos reacciones, una de oxigenación y otra de hidroxilación. En todos los organismos estudiados, excepto *Xanthophyllomyces dendrorhous*, estos dos últimos pasos de modificación del β -caroteno son independientes (Ojima *et al.*, 2006). Se han propuesto dos rutas diferentes de biosíntesis de astaxantina: una que empieza con la oxidación del β -caroteno pasando por equinona, cantaxantina y adonirubina, y otra que comienza con la hidroxilación del β -caroteno, con β -criptoxantina, zeaxantina y adonixantina como intermediarios (Sandmann 1994; Cunningam y Gantt 1998; Margalith 1999). La primera ruta ha sido demostrada mediante análisis funcional de las cetolasas tipo CRTW/BKT de la bacteria marina *A. aurantiacum* y el alga verde *H. pluvialis*, las cuales sólo aceptan β -caroteno como sustrato (Lotan y Hirschberg 1995; Fan *et al.*, 1995; Misawa *et al.*, 1995; Breitenbach *et al.*, 1996; Linden 1999). Recientemente, también mediante análisis funcional de la cetolasa de *Muriella zofingiensis*, ha sido confirmada la segunda ruta en el trabajo de Huang, quien ha demostrado que el producto del gen *bkt* de esta alga tiene puede actuar tanto sobre β -caroteno como sobre zeaxantina (Huang *et al.*, 2006).

2.3. Enzima fitoeno desaturasa

La enzima fitoeno desaturasa (PDS) cataliza la desaturación del carotenoide fitoeno para producir el carotenoide licopeno (Fig.3) (Ye *et al.*, 2000; McLaren y Frigg 2001). El fitoeno sufre una serie de cuatro desaturaciones que resultan en la formación del fitoflueno y chis-caroteno en primer lugar, y neorospeno y prolicopeno a continuación. El prolicopeno formado debe ser isomerizado a *all-trans* licopeno por la CRTISO. Las desaturaciones introducidas gracias a la acción concentrada de la PDS y ZDS sirven para alargar la serie de dobles enlaces conjugados que constituyen el grupo cromóforo de los carotenoides y por lo tanto, transforman el primer carotenoide incoloro fitoeno, en licopeno, de color rosado. Estas cuatro desaturaciones consecutivas están catalizadas en plantas por dos enzimas muy relacionadas, la fitoeno desaturasa y la chis-caroteno

desaturasa; mientras que en bacterias y hongos una sola proteína, codificada por el gen *crtl*, cataliza las cuatro desaturaciones.

Tanto la PDS como la ZDS utilizan FAD como cofactor redox. También está demostrado el papel del transportador de electrones plastoquinona como aceptor de electrones en ambas enzimas. Parece claro que ambas siguen un mecanismo de reacción muy similar en el que los electrones generados de las reacciones de desaturación son transferidos al cofactor FAD (Norris *et al.*, 1995; Grossman *et al.*, 2004). El cofactor reducido FADH₂ transfiere sus electrones a la plastoquinona, conectando de este modo la desaturación de carotenoides con la cadena de transporte electrónico. Los electrones de las plastoquinonas pueden ser entonces canalizados hacia el oxígeno vía una oxidasa cloroplástica terminal o a la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis.

El análisis de las desaturasas de varios organismos vegetales ha demostrado que la fitoeno desaturasa es una proteína asociada a membrana en plantas, aunque no se trata de una proteína integral de membrana (Cunninham y Gantt 98). Además presentan un dominio de unión a NAD/FAD. En *Chlamydomonas reinhardtii*, el RNA mensajero correspondiente a la PDS ha sido recientemente identificado (McCarthy *et al.*, 2004) como precursor de un polipéptido de 564 aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos de la PDS de plantas, microalgas y cianobacterias están muy bien conservadas (Lohr *et al.*, 2005). En la figura 4 se representa la comparación de la PDS en distintas microalgas. Sin embargo, presenta poca identidad con la correspondiente fitoeno desaturasa de bacterias codificada por el gen *crtl*, que parece haber surgido de forma independiente en la evolución (Fig. 5).

```

C. reinhardtii  MQIQVKPSSSRQAN-----LVAKGASCPRVAVRRVAG--RRALEVVARDYPRPAFE 49
M. zofingiensis MQQALGQCLQGRAQSTRPQTHHVRVTRNAVDSGRVLRVSPSSRRALSVVCRDYPKPAFE 60
H. pluvialis    MHTTMRGQASGSGC-----TSGRQTRGHWSRRSVRE--RGALRVVAKDYPTPDFQ 48
D. salina       MQVMQGRAHTQAAYS-----RQPAQQ---RTQRRVGRIT---RLQVYARDFPAPQFD 46
D. bardawil    MQIMQGRAHAQTLN-----RQPVTQVAGRTQRRVGRS----RLQVYARDFPPPQFD 47
*:              .                      *              * * .:*** **

C. reinhardtii  TAETFQEAALSSSKLKDAPRPAKPLKVVIAGAGLAGLSAAKYLSDAGHHPIVLEGRDVLG 109
M. zofingiensis SAGTYQEAQQLSSSKLKSAPRPEKPLKVVVLAGAGLAGLSAAKYLSDAGHIPVVLEGRDVLG 120
H. pluvialis    SSPTYQEAALSLSTKLRNAPRPAKPLRVVIAGAGLAGLSAAKYLADAGHHPIVLEGRDVLG 108
D. salina       GTETYQEAVALSTKLQNAAPRPAKQRVVIAGAGLAGLSAAKYLSDAGHIPVVLEARDVLG 106
D. bardawil    GTASYQDAVALSTKLQNAAPRPAKQRVVIAGAGLAGLSAAKYLSDAGHIPVLEARDVLG 107
: :*: *  **::*: .**** ** :*: *****:**** *:***,****

C. reinhardtii  GKVAAWKDEDGDWYETGLHIFFGAYPNMNVFKELNIEERLQWKEHSMIFAMPDSPGEFS 169
M. zofingiensis GKVAAWKDEDGDWYETGLHIFFGAYPNMNVFAELGITDRLQWKEHSMIFAMPNLPGEFS 180
H. pluvialis    GKVAAWKDEDGDWYETGLHIFFGAYPNIQNLFKELGIQDRLQWKEHSMIFAMPDAPGEFS 168
D. salina       GKVAAWKDEDGDWYETGLHIFFGAYPNMQRLFELNISDRLQWKSHSMIFAMQDKPGEFS 166
D. bardawil    GKVAAWKDEDGDWYETGLHIFFGAYPNIQRLLKELNISDRLQWKSHSMIFAMQDKPGQFS 167
*****: :*: **.* :*****,***** : **:**

C. reinhardtii  RFDFFDIPAPFNGVFAILRNNQMLTWPEKIQFAIGLLPAIIFGQKYVEEQDHLSTVQWMR 229
M. zofingiensis RFDFFDLPAPLNGVVAILRNNQMLTWPEKIQFAIGLIPAILGGQYVVDQDHLSTVQWMR 240
H. pluvialis    RFDFFELPAPWNGIIAILRNNQMLSWPEKIRFAIGLLPAIIFGQRYCEEQDELTVTEWMR 228
D. salina       RFEFFDIPAPWNGVIVILRNNEMLSWPEKIQFAIGLLPAIIFGQKYVEEQDELTVTQWMQ 226
D. bardawil    RFEFFDIPAPWNGVVAILRNNEMLSWTEKIKFAIGLLRPIIFGQKYVEEQDELTVTQWME 227
**::*: ** **::*.*****:***:****:*****: .*: **:* :**.*:***:**

C. reinhardtii  QQGVPPDRVNEEVFIAMAKALAFIDPDRLSMTVVLTALNRFLQERHGSKMAFLDGAPPERL 289
M. zofingiensis QQGVPPDRVNEEVFIAMAKALAFIGPDDLSTIVLTLNRFLREKHGSKMAFLDGAPPERL 300
H. pluvialis    KQGVPPDRVNEEVFIAMAKALNFIPDDLSTMTVVLTALNRFLQERHGSKMAFLDGAPPERL 288
D. salina       KQGVPSRVNHEVFIAMAKALNFIPDELSMTVVLTALNRFLQERHGSKMAFLDGAPPERL 286
D. bardawil    KQGVPSRVNDEVFIAMAKALNFIDPELSMTVVLTALNRFLQERHGSKMAFLDGAPPERL 287
:****.***.****** **.* ***:*****:*****:*****:*****

```



Fig. 4. Alineamiento de la secuencias de la fitoeno desaturasa de distintas microalgas. (*) Indica que los residuos nucleótidos son idénticos en toda las secuencias; (:) indica regiones conservadas; (.) indica regiones semiconservadas. Las secuencias de la PDS de cada especie se obtuvieron del ncbi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Números de acceso: *Chlamydomonas reinhardtii* (AY604703), *Muriella zofingiensis* (ABR20877.1), *Haematococcus pluvialis* (AAV37090.1); *Dunaliella salina* (ABB51091.1) y *Dunaliella bardawil* (CAA75094.1). El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

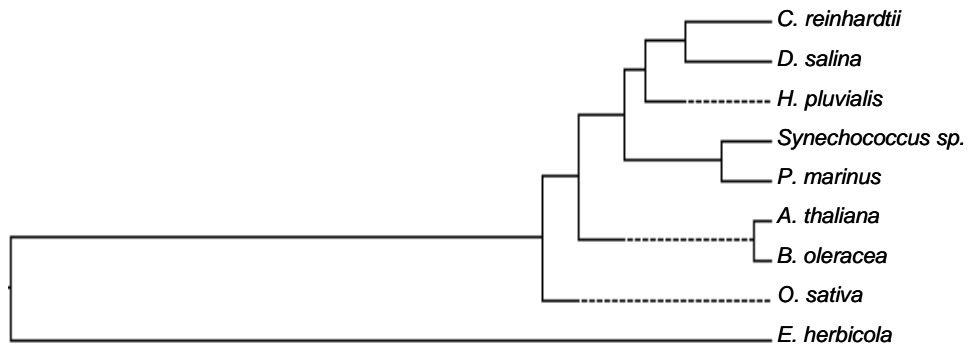


Fig. 5. Árbol filogenético de la fitoeno desaturasa. El árbol fue generado con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) a partir del alineamiento de secuencias de la fitoeno desaturasa de distintas especies de plantas superiores; *Arabidopsis thaliana* (NP_974545), *Brassica oleracea* (ABV46593.1), *Oryza sativa* (AAD02489), microalgas; *Chlamydomonas reinhardtii* (AY 604703), *Muriella zofingiensis* (ABR20877), *Dunaliella salina* (ABB51091) y *Haematococcus pluvialis* (AAV37090.1); cianobacterias; *Prochlorococcus marinus* (NP_895829.1); *Synechococcus sp* (ZP_01122599.1) y bacterias *Erwinia herbicola* (BAB79603)

Esta enzima es diana de la acción del herbicida norflurazón, que bloquea la síntesis de carotenoides coloreados, produciéndose como consecuencia una acumulación del carotenoide fitoeno en plantas (Simkin *et al.*, 2000) y microalgas (León *et al.*, 2005). Se ha demostrado que es un paso crítico en la ruta de carotenogénesis de cianobacterias y plantas superiores (Chamovitz *et al.*, 1993). En microalgas hay poca información, y en ocasiones contradictoria, acerca del papel de esta enzima en la ruta de la carotenogénesis. El “knock out” del gen *pds* en *Chlamydomonas* podría ayudar a conocer más sobre su papel en la síntesis de carotenoides, tal como explicamos con más detalle en la sección de resultados.

3. PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES POR MICROALGAS

El mercado mundial de carotenoides en la actualidad alcanza los 80 millones de Euros por año, de ellos, más del 90% corresponde a síntesis química.

Sin embargo, la creciente demanda de aditivos naturales, la observación de que los isómeros naturales podrían ser más activos que los obtenidos químicamente, y una legislación cada vez más restrictiva sobre el uso de aditivos artificiales en alimentación, hacen muy atractiva su producción a partir de fuentes naturales. Debido a que las microalgas son una de las principales fuentes naturales de carotenoides, su cultivo a gran escala para la síntesis de carotenoides con propósitos comerciales, es una actividad en expansión (Borowitzka 1995; Richmond 2000; Eonseon *et al.*, 2003).

Los carotenoides han sido industrialmente explotados desde hace tiempo como pigmentos naturales y factores provitamínicos. Por ejemplo, algunos cetocarotenoides como la astaxantina y la cantaxantina son aditivos alimentarios esenciales para la adecuada pigmentación de salmones, truchas o mariscos criados en cautividad (Lorenz y Cysewski, 2000). Estos animales adquieren su característico color rosado cuando crecen en libertad gracias a su alimentación a base de fitoplacton (microalgas y bacterias marinas) rico en estos compuestos. Las xantofilas, luteína y zeaxantina, se utilizan para incrementar la pigmentación amarilla de huevos y pollos (Botella-Pavía y Rodríguez-Concepción., 2006) y el β -caroteno se utiliza como colorante y antioxidante en muchos alimentos humanos, así como en las industrias cosmética y farmacéutica.

Como acabamos de comentar, las microalgas y algunas plantas superiores sintetizan carotenoides *in vivo* de forma natural. En la biomasa de microalgas podemos desatacar tres grupos principales de pigmentos: clorofilas, carotenoides, y ficobilinas (Abalde *et al.*, 1995). Según Borowitzka (1994) es posible incrementar la síntesis de estos compuestos a través de la manipulación de las condiciones de cultivo, causando algún tipo de estrés ambiental. La comercialización de carotenoides a partir de microalgas se halla en la actualidad restringida a β -caroteno, precursor de la vitamina A, a partir de *Dunaliella salina*, siendo el principal productor a nivel mundial COGNIS Nutrition and Health, (Spolaore *et al.*, 2006), y astaxantina, a partir de *Haematococcus pluvialis* (Cyanotech, Mera Pharmaceuticals), pero con numerosos problemas en esta última (Lee y Zhang 1999). En condiciones normales, la concentración de carotenoides en estas dos

especies es similar a la del resto de los tejidos fotosintéticos, pero puede aumentar extraordinariamente cuando se somete a condiciones de estrés, llegando a suponer el 10% de su peso seco en el caso de la producción de β -caroteno por *Dunaliella*, y entre el 1,5-3% del peso seco para la astaxantina en *Haematococcus*. Sin embargo, la producción de carotenoides a escala industrial no está libre de inconvenientes. La productividad de los cultivos debe ser muy alta para que el proceso sea económicamente viable, en ocasiones los cultivos son susceptibles de contaminarse lo que dificulta su cultivo a cielo abierto y encarece el proceso productivo. A veces aunque la capacidad de producción de carotenoides por unidad de biomasa es muy alta, obtener cultivos de alta densidad resulta de gran complejidad como ocurre con *Haematococcus*. Esto hace que la búsqueda de especies más productivas, bien nuevas especies aisladas del medio natural, bien obteniendo mutantes hiperproductores mediante mutagénesis al azar de especies ya conocidas, o bien manipulándolas genéticamente para que adquieran nuevas funciones génicas que les permitan producir nuevos carotenoides o mayores cantidades de los que ya producen, siga siendo esencial.

La potencialidad de otros carotenoides, tales como, zeaxantina o cantaxantina (Del Campo *et al.*, 2000, 2001, 2004; Lubián *et al.*, 2000; Cordero *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2006a; 2006b), que actúan como antioxidantes protectores en la región macular de la retina humana (Snodderly 1995, Semba y Dagnelie, 2003), luteína, como protector en catarata senil (Olmedilla *et al.*, 2003), fitoeno y licopeno, por su interés en cosmética y en la prevención de determinados tipos de cáncer, respectivamente (Di Mascio *et al.*, 1989, León *et al.*, 2005; Muller *et al.*; 2003, Rossinow *et al.*, 2003), así como de otras especies microalgales para la producción de β -caroteno o astaxantina (Zhang *et al.*, 1997; Liu y Lee, 2000; Orosa *et al.*, 2000; Lubián *et al.*, 2000; Del Campo *et al.*, 2004), y la mejora de los métodos operacionales para su extracción (León *et al.*, 2003) están siendo objeto de intenso estudio en la actualidad por diversos grupos de investigación.

La demanda creciente por parte de los consumidores de sustancias procedentes de fuentes naturales contribuye a que la obtención de estos productos a partir de microalgas constituya una alternativa a la síntesis química (Gordon y

Bouernfeind, 1982). Las técnicas de extracción convencional de estas sustancias para su uso en la industria alimentaria presentan el inconveniente del empleo de disolventes orgánicos, cuya utilización está disminuyendo de forma progresiva por razones ambientales, sanitarias y de seguridad. La extracción con dióxido de carbono en condiciones supercríticas constituía una tecnología emergente de bajo impacto ambiental por las indudables ventajas del dióxido de carbono como disolvente, entre las que destacan su baja toxicidad, su bajo coste y su facilidad para separarse del producto extraído (Hawthorne, 1990). Hoy día se ha conseguido optimizar con la adición de etanol (Macías-Sánchez et al., 2008). Por otra parte, añade un componente más de calidad a los productos obtenidos con dicha técnica ya que no experimentan ningún tipo de calentamiento excesivo, que suele producir efectos negativos sobre los compuestos termolábiles. En otras ocasiones, los productos presentan características químicas que impiden su extracción. La obtención de estos productos sintetizados, a través de sistemas bifásicos orgánico/acuoso, se ha logrado (León et al., 2004; Mojaat et al., 2008), pero sólo a pequeña escala. Recientemente, Kang y Sim han optimizado un método de extracción de astaxantina a partir de cultivos de *Haematococcus* con aceites vegetales (Kang y Sim 2008).

4. MANIPULACIÓN GENÉTICA DE MICROLAGAS

Como ya hemos comentado, la manipulación genética de microalgas, para la obtención de especies hiperproductoras, supondría una importante ventaja para la aplicación biotecnológica de microalgas. La transformación de *Chlamydomonas reinhardtii*, utilizada en nuestro trabajo, está bien establecida y ha sido ampliamente descrita (León y Fernández 2007; León et al., 2004). De hecho, fue la primera microalga modificada genéticamente de forma estable (Fernández et al., 1989, Debunchy et al., 1989). Diversas revisiones describen de forma exhaustiva las técnicas, promotores y genes marcadores utilizados para la transformación de *Chlamydomonas* (Lumbreras et al., 1998, Fuhrmann 2001) y otras microalgas (León y Fernández 2007). A continuación resumimos algunos de estos métodos y estrategias utilizados actualmente para la eficiente transformación nuclear de las

microalgas (Tabla I), así como las principales dificultades encontradas para lograr este objetivo.

4.1. Métodos para la transformación genética de microalgas

A diferencia del gran número de ejemplos de bacterias, levaduras e incluso plantas superiores transformadas genéticamente, tan sólo unas pocas especies de microalgas han sido transformadas con éxito.

La base de los métodos tradicionalmente utilizados para la transformación genética de microalgas es provocar, por diferentes métodos, una permeabilización temporal de las membranas celulares, permitiendo así a las moléculas de DNA entrar en las células sin alterar su viabilidad. Los principales métodos utilizados actualmente están resumidos en la tabla I, y son: la agitación con perlas de vidrio en presencia de polietilenglicol (PEG), que se ha utilizado con éxito para la transformación de mutantes de *Chlamydomonas* que carecen de pared celular (Kindle 1990), o en estirpes silvestres en las que la pared se ha eliminado por tratamiento enzimático. La agitación con fibras de carburo de silicio descrita por Dunahay (Dunahay 1993), que ha permitido la manipulación genética de *Chlamydomonas* (Kaepler *et al.*, 1990, 1992; Asano *et al.*, 1991) sin la necesidad de eliminar la pared celular, así como la manipulación de dinoflageladas como *Amphidinium* y *Symbiodinium* (Lohuis y Miller 1998). La electroporación, que provoca una permeabilización temporal de la membrana nuclear por la aplicación externa de un campo eléctrico, ha sido utilizada para transformar una gran variedad de células y organismos, como es el caso de *Chlamydomonas* (Shimogawara *et al.*, 1998), *Chlorella ellipsoidea* (Chen *et al.*, 2001) *Chlorella saccharophila* (Maruyama *et al.*, 1994) y *Dunaliella salina* (Geng *et al.*, 2003).

Tabla I. Resumen de las especies más importantes de microalgas que han sido modificadas genéticamente y el método de transformación utilizado

División	Especie	Método	Referencia
Dinoflageladas	<i>Amphidinium</i>	Carburo de silicio	ten Lohuis y Miller 1998
	<i>Symbiodinium</i>	Carburo de silicio	ten Lohuis y Miller 1998
Diatomeas	<i>Phaeodactylu tricornutum</i>	Bombardeo	Falciatore <i>et al</i> 1999; Apt <i>et al.</i> , 1996
	<i>Cyclotella criptica</i>	Bombardeo	Dunahay 1995
	<i>Navicula saprophila</i>	Bombardeo	Dunahay 1995
	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Bombardeo	Fischer 1999
	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	Bombardeo	Falciatore <i>et al</i> 1999
	Cloroficeas	<i>Chlamydomonas</i>	Perlas de vidrio Electroporación
		Carburo de silicio	Dunahay 1993
		Bombardeo	Debuchy <i>et al.</i> , 1989; Kindle 1989
		Agrobacterium	Kumar <i>et al.</i> , 2004
<i>Chlorella ellipsoidea</i> *		Bombardeo	Jarvis <i>et al</i> 1991
		Electroporación	Chen <i>et al.</i> , 2001
<i>Chlorella saccharophila</i>		Electroporación	Maruyama <i>et al.</i> , 1994
<i>Chlorella vulgaris</i> *		Transformación protoplastos	Hawkins <i>et al.</i> , 1999
<i>Haematococcus pluviales</i> *		Bombardeo	Teng <i>et al.</i> , 2002
<i>Dunaliella salina</i>		Electroporación	Sun <i>et al</i> 2005; Geng <i>et al.</i> , 2003
	Bombardeo	Tan <i>et al.</i> , 2005; Lü <i>et al</i> 2005	

* en algunos casos sólo se ha observado expresión transitoria

Otro método usual en la transformación de microalgas es el bombardeo de partículas, que consiste en acelerar, mediante una pistola impulsada por helio, partículas de oro o wolframio recubiertas del DNA hacia las células diana. Este método ha sido particularmente satisfactorio para la transformación de diatomeas (Apt *et al.*, 1996; Dunahay *et al.*, 1995; Zaslavskaja *et al.*, 2000, Falciatore *et al.*, 1999), *Dunaliella salina* (Tan *et al.*, 2005; Lü *et al.*, 2005) y clorofilas (Kindle *et al.*, 1989). La transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* descrita comúnmente para la transformación de plantas, se basa en la capacidad de esta bacteria para transferir su DNA (plásmido Ti) a la célula hospedadora, y ha sido descrita para *C. reinhardtii* (Kumar 2004), mediante el co-cultivo de ambos microorganismo. Otros intentos de transformación de microalgas como el uso de virus recombinantes como medio de transporte del DNA exógeno, la utilización de transposones, o la microinyección (Langridge *et al.*, 1985), están siendo estudiados (León y Fernández 2007).

4.2. Construcciones y estrategias

Las primeras referencias sobre la transformación genética estable de microalgas fue la transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* por complementación. Se utilizó un mutante de *Chlamydomonas* deficiente en nitrato reductasa, que fue transformado con una construcción consistente en el gen de la nitrato reductasa y su correspondiente promotor (Fernández *et al.*, 1989). Durante varios años el único método de selección disponible para la transformación de microalgas implicaba la complementación de mutantes específicos con genes homólogos, es decir, genes pertenecientes a la misma especie transformada (Kindle 1998). Pero esta estrategia no es aplicable a estirpes silvestres o a microalgas diploides, como las diatomeas, debido a las dificultades para generar mutantes en los que ambos alelos de un gen sean defectuosos. Hoy en día contamos con una amplia colección de genes reporteros y marcadores seleccionables (León *et al.*, 2004); los marcadores más potentes son aquellos que confieren resistencia frente a antibióticos o herbicidas, por ejemplo: *Ble*, *NptI* y

AphVIII, que confieren resistencia a los antibióticos bleomicina, G418 y paromomicina, respectivamente.

Los intentos para expresar genes unidos a promotores heterólogos, es decir promotores de genes de otras especies, no tuvieron éxito en la mayoría de las microalgas. La única referencia de transformación estable de microalgas con genes heterólogos es la expresión del gen *Gus* (que codifica la enzima β -glucuronidasa) bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, o del promotor p 1'2' de *Agrobacterium* en las dinoflageladas *Amphidinium* y *Symbiodinium* (Lohuis *et al.*, 1998). Las peculiares características nucleares de estas microalgas pueden influir en su capacidad para expresar genes bajo el control de promotores heterólogos. En general, se considera que en clorofitas y diatomeas la expresión estable de genes exógenos sólo puede conseguirse si se incluyen los promotores y las regiones reguladoras adecuadas. La presencia de intrones también es un factor crítico. La expresión de *Ble* y *AphVIII*, bajo el control del promotor *rbcS2*, aumentó incluyendo el primer intrón del gen de la subunidad grande de la rubisco, *rbcS2* (Lumbreras y Purton 1998; Sizova *et al.*, 2001).

4.3. Principales problemas para la expresión de transgenes en microalgas

Una vez que el transgen ha sido introducido en la célula e integrado en el cromosoma de la microalga debe expresarse. El gen exógeno debe estar precedido por una región promotora que sea adecuadamente reconocida por la RNA polimerasa de la célula hospedadora; después el mRNA debe ser traducido. La similitud entre el uso de codones del transcrito y el del organismo hospedador es un aspecto importante a considerar. El sesgo en el uso de codones hace que un codón que es frecuentemente utilizado en ciertos organismos, sea raramente utilizado por otros, lo que causa diferencias en la abundancia de tRNA e influye en la eficiencia de traducción y en el nivel de expresión. Esta es una importante limitación para la expresión de genes heterólogos en microalgas (León *et al.*, 2004).

La proteína fluorescente verde o “*green fluorescent proteína*” (*Gfp*) y la luciferasa (*Luc*) son dos marcadores extremadamente útiles, pero todos los intentos para expresarlos en microalgas fracasaron hasta que Fuhrmann y colaboradores (1999, 2001) sintetizaron DNAs que codifican la proteína fluorescente verde (*Gfp*) y la luciferasa (*Luc*) con la preferencia de codones de *Chlamydomonas*. Los intentos para expresar la *Gfp* en *P. tricornutum* (Zaslavskaja 2000, 2001) son también particularmente significativos para entender la importancia del sesgo de codones en la expresión satisfactoria de genes heterólogos. Estos autores estudiaron la expresión de varios genes de la *Gfp* bajo el control del promotor de la proteína de unión de la fucoxantina y la clorofila (*Fcp*) en *P. tricornutum*. Observaron que la *Gfp* (adaptada al uso de codones de humanos) con un uso de codones similar al de los genes de *P. Tricornutum*, era la única versión de *Gfp* que se expresaba apreciablemente. La baja expresión de la *Gfp* no modificada se atribuyó al efecto del sesgo en el uso de codones.

Aunque todos los elementos requeridos para la óptima transcripción y traducción de los transgenes se hayan incluido en la construcción génica, la expresión de un gen exógeno puede ser muy baja o nula. Más aún, si los clones de algas transgénicas no se mantienen en condiciones selectivas, la expresión de estos genes puede ser suprimida. El silenciamiento génico en microalgas se ha atribuido a diversos mecanismos epigenéticos, transcripcionales y postranscripcionales, y puede estar mediado por el mecanismo de interferencia por RNA (iRNA) que se trata con más detalle en el siguiente apartado.

5. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIADO POR RNA interferencia

El término “silenciamiento génico” se utiliza habitualmente para describir el “apagado” de un determinado gen, y es un mecanismo general que ocurre durante la regulación de la expresión génica. Está presente en la mayoría de los organismos eucariotas y fue descubierto a finales de la década de los 1980s. A

través de este mecanismo, la maquinaria celular impide la expresión de un gen que debería estar “encendido” en circunstancias normales.

Nuestro concepto de regulación génica en eucariotas ha cambiado totalmente con el descubrimiento del RNA interferencia. La señal para la activación de este mecanismo la constituyen unos pequeños fragmentos de RNA de doble cadena (Fig.6) de entre 21-26 nucleótidos de longitud con dos bases desapareadas en el extremo 3´ de ambas hebras (Baulcombe 2004). La expresión génica se puede regular tanto a nivel transcripcional, como a nivel post-transcripcional (Matzke y Birchler, 2005). El Silenciamiento Génico Transcripcional (en inglés, *Transcriptional Gene Silencing* o TGS), se desarrolla en el núcleo. Los pequeños fragmentos de RNA duplex que hemos descrito guían selectivamente la metilación del DNA y de las histonas, promoviendo la remodelación de la cromatina (Volpe et a. 2002; Matzke y Bichler 2005). En el Silenciamiento Génico Post-Transcripcional (en inglés, *Post-Transcriptional Gene Silencing* o PTGS), los pequeños RNA duplex señalizan y median la degradación de un RNA diana por medio de complementariedad de bases (Meister y Tuschli, 2004). La degradación de este mRNA impide su normal traducción y consecuentemente no se sintetiza la correspondiente proteína que codifica.

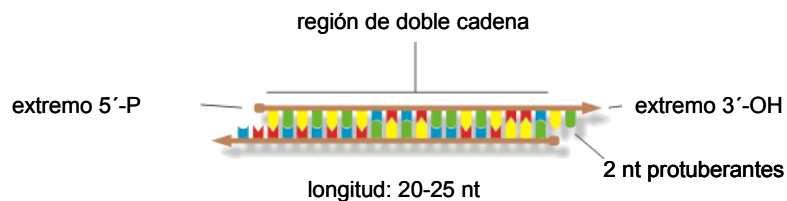


Fig. 6. Estructura básica de una molécula siRNA. Estructura básica de una molécula de doble cadena de RNA que desencadenará el mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional. Presenta 2 ó 3 bases desapareadas en los extremos 3´ de ambas hebras, y su longitud puede variar entre 20 y 26 nucleótidos.

Tanto el silenciamiento transcripcional como el post-transcripcional son mecanismos que regulan la expresión de genes endógenos, y desempeñan un papel decisivo en la diferenciación celular y en la regulación del desarrollo, pero además, son empleados por los organismos para protegerse de transposones y virus que generan dsRNA intermediarios, los cuales son un tipo de RNA usualmente no producidos por las células (Novina y Sharp 2004). Es por eso que se cree que el silenciamiento génico forma parte de un sistema de defensa ancestral que precede incluso a la divergencia evolutiva de las plantas y nematodos.

5.1. Antecedentes

Las primeras observaciones de este fenómeno se realizaron en organismos vegetales (Baulcombe. 2004; Novina y Sharp 2004; Dykxhoorn *et al.*, 2003). Con la finalidad de obtener petunias de un color púrpura más intenso que el de la flor silvestre, se adicionaron copias extras a la planta, del gen que codifica las enzimas implicadas en la síntesis de ese pigmento. Para sorpresa de los investigadores las petunias transgénicas resultantes eran bicolor y algunas completamente blancas (Napoli *et al.*, 1990; Van der Krol *et al.*, 1990), lo que indicaba que no sólo los transgenes habían sido reprimidos, si no también los correspondientes genes nativos de la planta (Lau *et al.*, 2003). Anteriormente un grupo de virólogos vegetales observó un fenómeno similar; el objetivo de su trabajo era mejorar la resistencia de las plantas al ataque de ciertos virus. En ese tiempo ya se sabía que las plantas que fabricaban proteínas virales eran más resistentes a la infección. Sin embargo, en este caso los virólogos observaron que las plantas que contenían sólo un pequeño segmento del RNA viral, y que no codificaban ninguna proteína, eran igualmente resistentes (Wingard 1928). Concluyeron que el RNA viral producido también podía proteger a la planta de nuevas infecciones virales, evitando la multiplicación y propagación del virus en cuestión. Posteriormente realizaron el experimento inverso: insertaron secuencias cortas de genes de la planta en el genoma del virus. Infectaron plantas con el virus modificado y observaron que la

expresión de ese gen de la planta era suprimida. Este fenómeno se llamó “Silenciamiento Génico Inducido por Virus” (en inglés, “*Virus-Induced Gene Silencing*” o VIGS). Durante mucho tiempo se trató de describir que originaba este proceso de interferencia. Sin embargo la primera descripción formal de iRNA como respuesta biológica a la presencia de dsRNA de doble cadena en la célula fue descubierta en estudios realizados sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* al cual se le introdujeron moléculas de dsRNA del gen implicado en el proceso de contracción muscular (Fire *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1995). Observaron que el efecto del silenciamiento era mucho más potente que el que se obtenía con RNA antisentido de cadena sencilla. Aún más sorprendente fue constatar que la estequiometría del proceso no coincidía con la idea de un simple bloqueo del RNA mensajero por hibridación. Unas pocas moléculas de RNA de doble cadena bastaban para silenciar la expresión génica, a pesar de que una cantidad mucho mayor de RNA mensajero existiera en la célula. Poco después Fire y Mello (1998) observaron en el mismo gusano que pequeños fragmentos de RNA de doble cadena, “small dsRNA”, eran suficientes para provocar el silenciamiento. Este fenómeno se llamó RNA interferencia (iRNA) o interferencia por ARN y ha supuesto una revolución en la biología molecular, ya que permitirá identificar la función de casi cualquier gen simplemente apagándolo y observando que le ocurre al organismo afectado. Además es una gran esperanza para el diseño de terapias para muchas enfermedades con una base genética (Love *et al.*, 2008).

Actualmente se conoce que este proceso se encuentra altamente conservado en muchos organismos eucariotas (Tijsterman *et al.*, 2002; Ullu *et al.*, 2004; Hannon 2004).

5.2. Mecanismo molecular

A pesar de que el fenómeno de silenciamiento génico fue descrito por primera vez hace más de 15 años, aún no se conoce con precisión su mecanismo

molecular ni su regulación. Sin embargo, se ha avanzado mucho en estudios que lo describen parcialmente. Los descubrimientos realizados sobre el mecanismo molecular del RNA interferencia (iRNA) en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998) fueron fundamentales para comprender los mecanismos que controlan el silenciamiento post-transcripcional y le valieron a estos investigadores el premio nobel de Medicina en el año 2006. La precisión de este mecanismo está justificada por la variedad de funciones que desempeñan sus componentes, entre las que se encuentra el reconocimiento de genes exógenos y endógenos potencialmente perjudiciales para la integridad celular, la actividad RNasa guiada por la complementariedad de ácidos nucleicos y la actividad metiltransferasa que media la inactivación de determinadas zonas del cromosoma.

Utilizando análisis bioquímicos y genéticos se ha podido establecer un modelo que describe cómo se produce el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) (Fig.7). En este modelo, el silenciamiento puede dividirse en una etapa de iniciación y en otra etapa efectora y de mantenimiento. La vía normal fisiológica de silenciamiento comienza con la presencia de un RNA de cadena doble ("double-stranded RNA" o dsRNA) o RNA de cadena sencilla plegado en forma de horquilla ("short hairpin" o shRNA). Estos dsRNA o shRNA pueden ser: i) intermediarios de la replicación de un virus; ii) estructuras secundarias de un RNA viral; iii) generados a partir de precursores específicos del propio genoma del organismo; iv) los dsRNA pueden también generarse a partir de RNA de cadena simple mediante la acción de una RNA polimerasa dependiente de RNA (RDRs o RdRPs); v) introducidos artificialmente, aunque en este caso los efectos son transitorios y no heredables (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Waterhouse y Helliwell 2003), ó vi) pueden provenir de un transgen expresado en el genoma del organismo estudiado. En cualquiera de los casos, el mecanismo de iRNA nos proporciona un mecanismo para el silenciamiento selectivo de genes (Waterhouse *et al* 1998; Chuang y Meyerowitz 2000; Smith *et al* 2000; Somerville 2000; Wang y Waterhouse 2000; Wesley *et al* 2001).

Estas cadenas dobles de RNA u horquillas de RNA son reconocidas y digeridas por una enzima denominada Dicer, (Hutvanger *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2004; Berstein. *et al.*, 2001) endonucleasa tipo RNasa III , en pequeños fragmentos de RNA de entre 20 y 26 nucleótidos (Aravin y Tuschli, 2005) de longitud, con extremos 3' protuberantes, llamados "small interference RNAs" (siRNAs) o microRNA (miRNA) si provienen de una horquilla de RNA con regiones sin hibridar. La enzima Dicer tiene un dominio helicasa 5' terminal y dos dominios RNasa tipo III. En su estructura se han localizado también dominios de unión a RNA de doble cadena (Schroda 2006) En la etapa efectora, el siRNA o miRNA se une a una proteína AGO, de la familia de las Argonauta (Hammond *et al.*, 2001 a y b) con dominios PIWI, para formar el complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) con actividad RNasa (Martínez *et al.*, 2002; Rivas *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2004). La actividad helicasa de la enzima Dicer separa las dos hebras del siRNA, y garantiza la unión de sólo una de ellas al complejo RISC. Una vez que el complejo RISC está activado, tiene como blanco la degradación de los RNA mensajeros homólogos a dichos siRNAs. Las reglas para la incorporación de una de las cadenas de siRNA en el complejo RICS están basadas en la baja energía de apareamiento del extremo 5' (los 4 primero nucleótidos) de la cadena incorporada, en comparación con la energía del extremo 5' de la cadena no incorporada (Schwarz *et al.*, 2003).

Está claramente demostrado, al menos en levaduras y otros organismos, que el iRNA podría también influir en la transcripción en el núcleo celular, que está parcialmente determinada por el grado de condensación de la cromatina, dependiente de la mutilación del DNA. De modo que la elección de los genes que van a ser transcritos, y los que permaneceran en zonas altamente condensadas o escondidas, puede estar bajo control de estos microRNA o siRNA, induciendo así un silenciamiento transcripcional por mecanismos que aún no son conocidos (Wassenegger *et al.*, 1994; Wassenegger 2002, 2005; Jones *et al.*, 2001). En algunos casos también se ha descrito el papel de los siRNA o microRNA en el silenciamiento a nivel de traducción en los ribosomas.

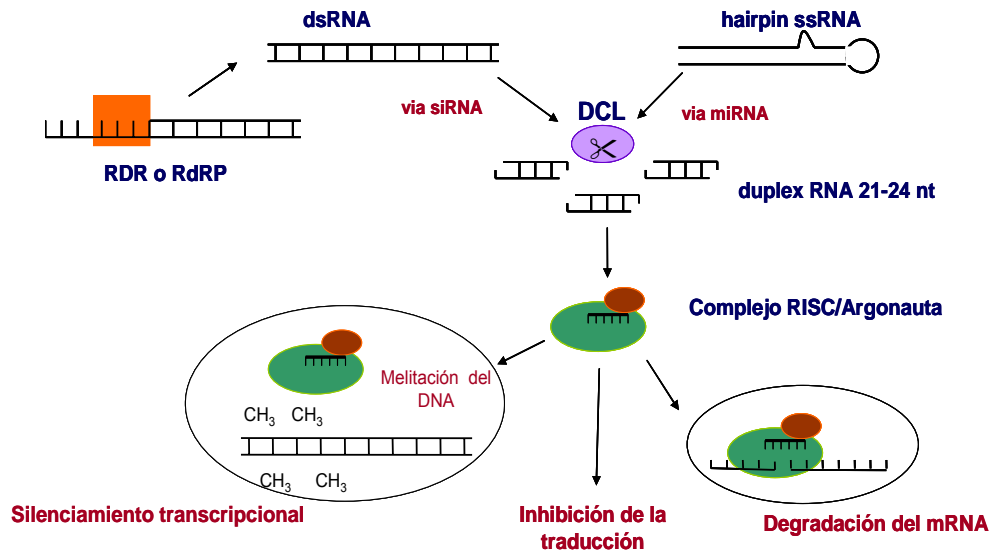


Fig. 7. Esquema del mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA interferencia. El mecanismo de silenciamiento génico se desencadena con la presencia de un RNA de doble cadena (dsRNA) vía siRNA, o hairpin de cadena sencilla (hairpin ssRNA) vía microRNA, que son reconocidos por la enzima Dicer (DCL), fragmentándolos en pequeños RNA de doble cadena de 21-26 nucleótidos (duplex RNA). Estos pequeños fragmentos de RNA dúplex se unirán a la proteína AGO (de la familia de las Argonautas) formando el complejo RISC para inhibir por distintas vías la expresión del gen.

El silenciamiento génico post-transcripcional en plantas, tradicionalmente se ha conseguido por la técnica de “antisense” o antisentido, que consiste en introducir en la célula un fragmento de DNA que codifique un mRNA en sentido contrario al gen que queremos silenciar. Los mRNA reversos hibridarían formando un RNA de doble cadena, que terminaría siendo degradado por la enzima DICER y generando los siRNA, lo que impide la traducción de dicho mRNA y por tanto la síntesis de la proteína correspondiente. Mientras que el silenciamiento post-transcripcional mediante la técnica de “RNA interferencia” consiste en introducir en

la célula pequeños fragmentos de RNA de doble cadena (siRNAs) o secuencias de DNA diseñadas para generar los “siRNA” “*in vivo*”. En ambas técnicas el proceso de silenciamiento confluye en la formación de pequeñas moléculas de RNA interferente (“small interference RNAs” o siRNAs) que dirigen a una enzima nucleasa para destruir de forma específica el mRNA que presenta homología con el siRNA.

5.3. Silenciamiento génico en *Chlamydomonas reinhardtii*

El silenciamiento post-transcripcional se ha utilizado en microalgas y concretamente en *Chlamydomonas* con distinto grado de éxito y ha ayudado a la caracterización funcional de un gran número de genes (Schroda, 2006). En *Chlamydomonas*, una de las primeras pruebas experimentales de silenciamiento post-transcripcional fue obtenida por Cerutti y colaboradores. Ellos obtuvieron un transformante que contenía una única copia del gen *aadA*, que confiere resistencia al antibiótico espectinomicina, bajo el control de las secuencias promotoras y terminadoras del gen de la subunidad pequeña de la rubisco. Este mutante se silenciaba si se mantenía en condiciones no selectivas del gen *aadA*. Comprobaron que el gen *aadA* se transcribía, pero los transcritos eran degradados post-transcripcionalmente (Cerutti *et al.*, 1997). Usando este transformante hicieron experimentos de mutagénesis insercional (Wu-Scharf *et al.*, 2000) y seleccionaron transformantes en los que se había reactivado el gene *aadA* originalmente silenciado, por mecanismos post-transcripcionales. Uno de los transformantes aislados, resistentes a espectinomicina, tenía dañado un gen que codifica una RNA helicasa, pudiendo tratarse de un componente de la maquinaria de PTGS en *Chlamydomonas*. Desde estos primeros experimentos, han aparecido en *Chlamydomonas* numerosos ejemplos de silenciamiento o disminución de la expresión de genes concretos mediante RNA interferencia. Fragmentos de cDNA antisentido que hibridan con mRNA en sentido directo (Schroda *et al.*, 1999; Fuhrmann *et al.*, 2001), fragmentos de genes que contienen intrones, seguidos de los mismos fragmentos sin intrones pero en sentido contrario, y construcciones de

repeticiones inversas que generan horquillas de RNA (Rohr *et al.*, 2004) son algunas de las estrategias usadas para generar la doble cadena de RNA que finalmente produce siRNAs “*in vivo*”. Sin embargo el nivel de silenciamiento es variable, dependiendo del tipo de construcción, del número de copias, del sitio de integración, de la diana del gen y de la integridad del transgen integrado (Schroda 2006, Fuhrmann *et al.*, 2001).

En el genoma de *Chlamydomonas*, y en el de algunos eucariotas multicelulares se han encontrado varias copias de las proteínas Dicer y AGO. En concreto se han encontrado 3 copias de cada una de ellas, que podrían estar implicadas en distintos mecanismos silenciamiento. Por ejemplo, AGO3 parece estar involucrada en una ruta de regulación de la expresión génica endógena mediante microRNA, mientras que DCL1 podría estar únicamente implicada en el silenciamiento de elementos transponibles mediante siRNA (Cerutti 2008). Curiosamente no se ha encontrado en las actuales versiones del genoma ningún gen con homología respecto a la RdRP (Schroda 2006; Zhao *et al.*, 2007).

La presencia de microRNAs, que controlan la expresión génica, se ha observado en plantas y animales, pero hasta la fecha no había constancia experimental de su existencia en organismos unicelulares. Dos recientes trabajos demuestran que el genoma de *Chlamydomonas* codifica miles de pequeños microRNAs (Molnár *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007) que pueden dirigir la hidrólisis de los RNA mensajeros “*in vivo*” e “*in vitro*” y que la expresión de algunos de estos miRNA aumenta o disminuye durante procesos como la gametogénesis. Este fenómeno explicaría los problemas de silenciamiento observados en ocasiones, cuando se trata de expresar genes exógenos, y abre innumerables posibilidades para el estudio de muchas funciones génicas mediante el silenciamiento con construcciones de siRNA específicamente diseñadas para ello.

El sistema iRNA nos proporciona una potente herramienta para estudiar la función celular de determinados genes e identificar genes esenciales en procesos celulares. Ésto es particularmente importante en plantas y algas, donde los genes

exógenos se insertan de forma aleatoria en el genoma nuclear y la tradicional inactivación génica por recombinación homóloga como ocurre en bacterias no es posible. La relativa facilidad con la que los genes pueden ser silenciados usando iRNA ha causado una “revolución silenciosa” en Biología Molecular. Los siRNA pueden ser diseñados a medida para silenciar cualquier gen. Pueden ser sintetizados químicamente o creados “*in vitro*” por transcripción de construcciones especialmente diseñadas para ello e inducir así el silenciamiento génico (Wasi 2003). Esta tecnología junto con los datos de las secuencias genómicas ha permitido descubrir la función de miles de genes (Schroda 2006) y presenta un importante potencial terapéutico. Más allá de las funciones fisiológicas que se le atribuyen, este fenómeno puede ser utilizado además como herramienta terapéutica en el campo de la biomedicina (Brummelkamp *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2003; Wilda *et al.*, 2002) para el desarrollo de nuevas drogas y para generar mejores cultivos y alimentos.

6. PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES EN ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Muchos investigadores han intentado aumentar el valor nutricional de varias plantas de interés agronómico mediante la manipulación genética de la ruta metabólica de la carotenogénesis (Botella-Pavía y Rodríguez-Concepción 2006; Giuliano *et al.*, 2000; Sandman 2001; 2006). Estas manipulaciones no han estado exentas de dificultades, pero muchas de ellas se han resuelto gracias a la creatividad y el duro trabajo. Por ejemplo la baja productividad de β -caroteno en el endospermo del arroz dorado original (Ye *et al.*, 2000) ha sido parcialmente superado sustituyendo la fitoeno sintasa de narciso por la de maíz, en la construcción génica original. Esto ha incrementado la cantidad de carotenoides totales en el endospermo de arroz de $1,6 \mu\text{g g}^{-1}$ a $37 \mu\text{g g}^{-1}$ (Paine *et al.*, 2005). O los efectos colaterales observados en plantas de tomate transgénico que sobreexpresa fitoeno sintasa, PSY, (Fray *et al.*, 1995) (baja talla y reducido contenido en clorofila debido a alteraciones en la síntesis de ácido abscísico y fitol

desde su precursor GGPP) han sido evitados dirigiendo la enzima PSY específicamente hacia el cromoplasto del fruto mediante la fusión de un péptido señal específico (Fraser *et al.*, 2002). La producción “*in vivo*” de astaxantina y otros carotenoides por plantas que no los sintetizan de forma natural se ha conseguido mediante ingeniería genética en varias especies (Ralley *et al.*, 2004; Stalberg *et al.*, 2003; Mann *et al.*, 2000; Gerjets y Sandmann 2006). La síntesis de carotenoides se ha conseguido manipular también en bacterias (Fig.8), cianobacterias y levaduras transgénicas (Sandmann 2001; Schmidt-Dannert *et al.*, 2000), en microalgas, está siendo objeto de muchas investigaciones.



Fig. 8. Bacterias modificadas genéticamente para la producción de determinados carotenoides. *E. coli* modificada genéticamente para acumular los carotenoides indicados (tomada de Cunningham y Gantt, 1998).

La expresión del gen *bkt* de *Haematococcus* en *Chlamydomonas* para producir cetoluteína (León *et al.*, 2007) es hasta ahora el único logro conseguido. Pero ni en el mejor de los casos los valores de carotenoides obtenidos de forma natural por ciertas microalgas sometidas a condiciones de estrés. En la mayoría de los casos, la falta de conocimiento de la ruta y su regulación provoca la aparición de efectos indeseados o limita la productividad de las proteínas codificadas por genes exógenos.

Las microalgas no sólo constituyen un excelente modelo para el estudio de la carotenogénesis en plantas, sino que pueden ser hospedadores ideales para la expresión de genes de la ruta de la carotenogénesis de otras especies, tanto con fines de estudios básicos, como para la producción biotecnológica de nuevos carotenoides con mayores productividades que las estirpes naturales. Las microalgas, además de presentar más analogías fisiológicas y morfológicas con las células de plantas que las bacterias, tienen casi las mismas ventajas que estas en cuanto a facilidad y rapidez de crecimiento. Muchas tienen un activo metabolismo central de los terpenoides, lo que garantizaría el suficiente aporte de precursores para la síntesis de carotenoides, y poseen alta capacidad de almacenamiento de carotenoides en cloroplastos y plástidos. Estos dos factores pueden limitar la productividad de carotenoides en bacterias y levaduras. Además en algas unicelulares es mucho más simple estudiar la expresión de las enzimas de la síntesis de carotenoides que en plantas superiores, en las que los carotenoides se acumulan en tejidos u órganos especializados. Muchas especies de microalgas están consideradas como organismos GRAS (“Generally regarded as safe”), lo que es útil para la producción de carotenoides o microalgas enriquecidas en carotenoides para aplicaciones alimentarias o farmacéuticas.

A pesar de que la manipulación genética es una vía necesaria para el estudio de la ruta biosintética de carotenoides, así como para el desarrollo de estirpes altamente productivas para usos biotecnológicos, en la actualidad aún existe cierto rechazo social y reticencia por parte de las empresas hacia los productos procedentes de organismos modificados genéticamente (OMGs). Además, la manipulación genética de microalgas está limitada a un pequeño número de especies (León *et al.*, 2004; León y Fernández 2007). A diferencia de lo que ocurre en procariontes, en el genoma nuclear de las microalgas y otros eucariotes, el DNA foráneo se integra preferentemente al azar por recombinación no homóloga. Esto ha dificultado los estudios metabólicos por aproximaciones de genética reversa y ha dificultado la obtención por ingeniería genética de microalgas que acumulen metabolitos de interés mediante la inactivación selectiva de ciertos genes (Schroda 2006).

La modificación genética de microalgas de interés industrial, como *Dunaliella*, que puede alcanzar concentraciones intracelulares de β -caroteno de alrededor del 10% de su peso seco, sería de un gran interés. Pero a pesar de que hay algunas referencias (Sun *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2005; Geng *et al.*, 2003; Lu 2005), su transformación genética estable no está aún bien establecida. La transformación de *Haematococcus* por otra parte se ha abordado mediante bombardeo de partículas con algunos resultados positivos (Teng *et al.*, 2002). Pero en estas microalgas incluso la elección de genes de resistencia para la selección de transformantes es complicada. Las células se enquistan ante la presencia de la mayoría de los antibióticos y herbicidas enmascarando su efecto letal. Recientemente Steinbrenner y Sandmann (2006) han conseguido seleccionar clones de *H. pluvialis* transformados con una fitoeno desaturasa modificada en base a su resistencia al herbicida norflurazón y proponen esta PDS resistente a norflurazón como un posible gen reportero. La microalga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* es la primera y mejor de las clorofitas estudiadas y transformadas (Harris 2001). Su manipulación genética nuclear es fácil, está bien establecida y existen una gran variedad de métodos de transformación y de construcciones para esta microalga (Lumbreras *et al.*, 1998, León y Fernández 2007), para la que además contamos con interesantes herramientas moleculares y genéticas como un microarray con cerca de 10000 elementos que cubren alrededor del 87% de su transcriptoma (Eberhard *et al.*, 2006), una base de datos de ESTs (<http://www.chlamy.org>), y la secuencia completa de su genoma (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>) (Grossman *et al.*, 2003; Merchant *et al.*, 2007). Lo que la convierte en una buena candidata para expresar genes foráneos carotenogénicos. La gran mayoría de los genes de la ruta de la carotenogénesis en *Chlamydomonas* han sido clonados o asignados por homología de sus secuencias con los de otras microalgas cercanas (Grossman *et al.*, 2004; Lohr *et al.*, 2005).

La modificación de microalgas para obtener estirpes que produzcan nuevos carotenoides o mayores cantidades de los carotenoides que ya producen, puede llevarse a cabo mediante la inactivación, desregulación o sobreexpresión de genes endógenos o exógenos. La tecnología del iRNA descrita anteriormente nos permite

inhibir, al menos parcialmente, genes concretos de forma específica por mecanismos que ahora empiezan a comprenderse mejor (Schroda 2006). Hay múltiples ejemplos de transformantes de *Chlamydomonas* en los que se ha conseguido el silenciamiento de la expresión génica con esta aproximación (Cerutti 1997; Schroda 2000; Rohr *et al.*, 2004; Koblenz y Lechtreck, 2005; Molnár 2007).

7. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo se enmarcan dentro de los objetivos generales del proyecto “Biosíntesis de carotenoides de interés comercial en microalgas: regulación y manipulación genética de la ruta (AGL2007-65303-C02-01), financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, que pretende conseguir un mayor conocimiento de la ruta de la carotenogénesis en microalgas. En esta Tesis nos marcamos dos objetivos generales:

1. Inhibir por distintos mecanismos la enzima fitoeno desaturasa, que cataliza uno de los primeros pasos de la ruta y permite la conversión del fitoeno en el resto de carotenoides coloreados.

Esto tiene gran importancia desde el punto de vista biotecnológico -el fitoeno es utilizado como antioxidante incoloro en cosmética- y fisiológico -los mutantes sin carotenoides pueden aportar mucha información sobre su función-. Las aproximaciones utilizadas para lograr este objetivo han sido: El uso de inhibidores químicos, concretamente el herbicida norflurazón, cuyo papel en la inhibición de la PDS de plantas superiores está bien documentado, y la Inhibición específica de la enzima fitoeno desaturasa (PDS) por RNA interferencia, mediante el diseño de distintas construcciones de interferencia bajo el control de promotores endógenos constitutivos y regulables.

2. Obtener mediante mutagénesis insercional mutantes sensibles a altas intensidades luminosas y/o mutantes con alteraciones en su perfil de pigmentos.

La ventaja de la mutagénesis insercional frente a otras formas de mutagénesis es que la inserción de un gen marcador nos permite identificar fácilmente el gen alterado. Hay bastantes probabilidades de que alguno de los mutantes con el fenotipo indicado esté afectado en alguno de los genes que codifican enzimas de la ruta de la síntesis de carotenoides.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ORGANISMOS EMPLEADOS

1.1. Estirpes bacterianas

1.1.1. *Escherichia coli*

La estirpe empleada fue DH5 α (genotipo supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gryA96 thi1 relA1), utilizada rutinariamente para el mantenimiento y propagación del DNA.

1.2. Microalgas

1.2.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

Alga verde eucariota, unicelular, biflagelada de agua dulce. Clorofita del orden de las Chlamydomonadales, con unos 10 μ m de diámetro, que posee múltiples mitocondrias y un gran cloroplasto en forma de copa que ocupa prácticamente todo el citoplasma. Su genoma consta aproximadamente de 16.000 genes, repartidos en 17 cromosomas. Tiene un ciclo de vida con formas haploides y diploides, una tasa de generación de 5 horas y reproducción vegetativa sexual, desarrollando gametos mt⁺ y mt⁻.

Posee una organización bioquímica bien conocida y con numerosas similitudes con las plantas superiores (Harris 1989; 2001). Su transformación nuclear es fácil y está bien establecida. Cuenta con otras herramientas moleculares y genéticas de gran interés, como una base de datos de ESTs (<http://www.chlamy.org>), y la secuencia casi completa de su genoma (Grossman, 2003; Merchant *et al.*, 2007) (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>).

La estirpe utilizada ha sido la 704 (*cw15 Arg7⁺ Nia1:Ars mt⁺*), carente de pared celular, cedida amablemente por el Dr Roland Loppes (Loppes *et al.*, 1999).

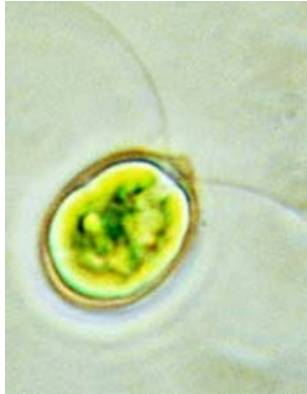


Fig. 9. *Chlamydomonas reinhardtii*. Microfotografía de una célula de *Chlamydomonas reinhardtii* tomada al microscopio óptico (1000x).

1.2.2. *Dunaliella bardawil*

Alga verde eucariota, unicelular, biflagelada, halotolerante, aislada en 1978 por Ben-Amotz y Avron en estanques salinos del Lago Bardawil (Israel) (Oren 2005). Al igual que *Chlamydomonas* es una clorofila del orden de las Chlamydomonadales, que posee un gran cloroplasto que ocupa la mayor parte del citoplasma. Carece de pared celular lo que le permite cambiar de volumen celular como respuesta a cambios extracelulares de presión osmótica. Sus principales características son su asombrosa capacidad para tolerar altas concentraciones salinas, hasta 5M de NaCl, y la masiva acumulación de β -caroteno en respuesta a distintas condiciones de estrés.

La estirpe utilizada (UTEX 2538) fue cedida amablemente por el Instituto de Biología Vegetal y Fotosíntesis (CSIC, Sevilla).



Fig. 10. *Dunaliella bardawil*. Microfotografía de células de *Dunaliella bardawil* tomada al microscopio óptico (1000x).

2. VECTORES PLASMÍDICOS

2.1. Vectores comerciales

2.1.1. pGEM-T

El plásmido pGEM-T (Promega) (Fig.11), fue utilizado para clonar rutinariamente los fragmentos de DNA resultantes de la amplificación por PCR. Se basa en el principio del "TA-cloning". Se suministra linearizado y se caracteriza por tener una base de timidina en los extremos 5' de ambas cadenas. Muchas polimerasas tienen la característica de añadir una adenina al extremo 3' del producto amplificado, con lo que la ligación del producto de la PCR con el vector pGEM-T resulta de gran facilidad. Contiene como marcador selectivo el gen que confiere resistencia a ampicilina.

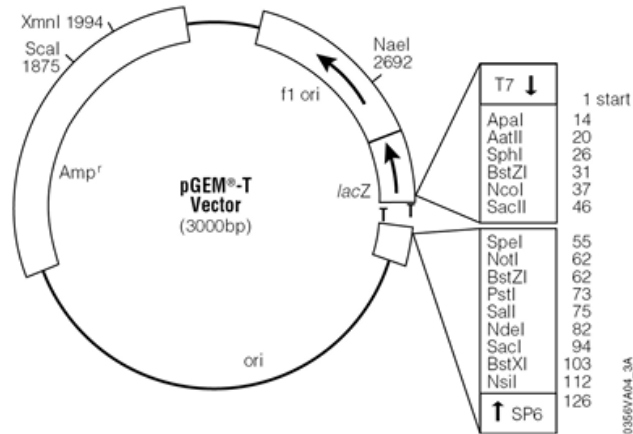


Fig. 11. Mapa del vector de clonación pGEM-T. Diagrama del vector comercial de clonación pGEM-T (Promega) donde se detalla el operón lacZ, el marcador de resistencia a ampicilina (Amp^r), el origen de replicación en virus (f1 ori) y la región de policlonaje.

2.1.2. pUC57

El vector comercial pUC57 (GeneScript) fue usado para clonar y propagar fragmentos de DNA. Tiene un tamaño de 2.710 pb y un sitio de múltiple clonaje MCS incluido en el gen lacZ (Fig.12), que facilita la clonación de los fragmentos de DNA.

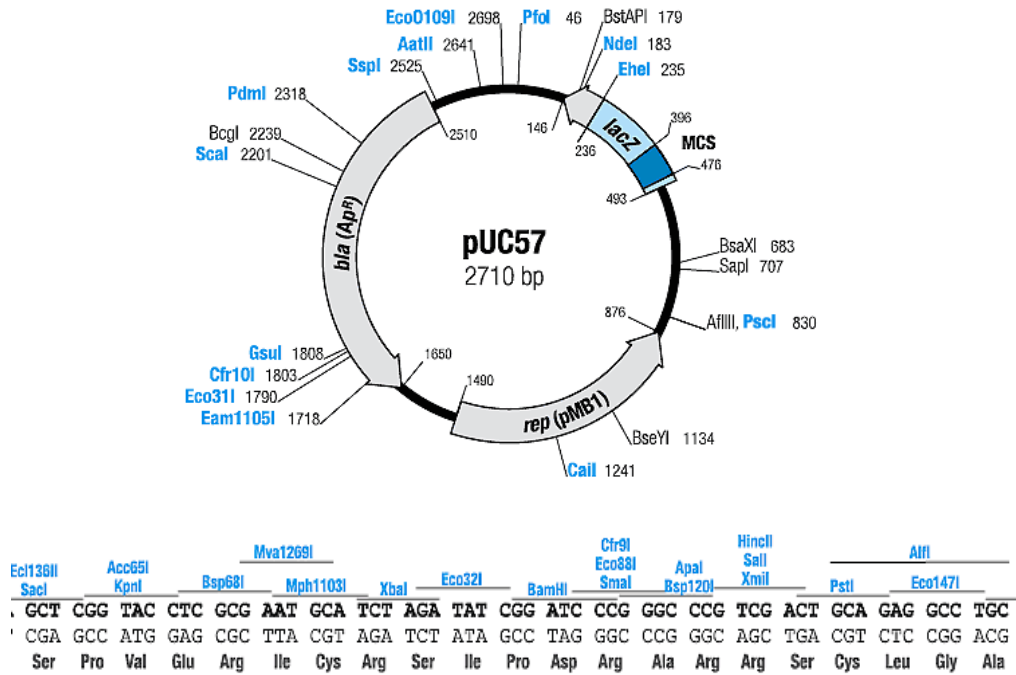


Fig. 12. Mapa del vector de clonación pUC57. Diagrama del vector de clonación comercial pUC57 y detalle de su secuencia de múltiple clonaje (MCS).

2.2. Vectores no comerciales

2.2.1. pSP124S

El plásmido pSP124S, cedido amablemente por el Dr. Emilio Fernández de la Universidad de Córdoba, se caracteriza por tener el gen marcador *Ble*, aislado del actinomiceto *Streptoalloteichus hindustanus*, que codifica una pequeña proteína de 13,7 kDa, que confiere resistencia al antibiótico talisomicina, y a otros antibióticos relacionados como la bleomicina, fleomicina y zeocine, ya que presenta gran afinidad por estos antibióticos y se

une a ellos evitando la degradación del DNA. El plásmido contiene además las regiones no traducidas 5' y 3' y dos copias del primer intrón del gen *rbcS2* (subunidad pequeña de la rubisco) de *C. reinhardtii*. La presencia de intrones (Fig.13) es un factor importante para la eficiencia de la expresión (Sizova *et al.*, 2001; Lumbreras *et al.*, 1998).

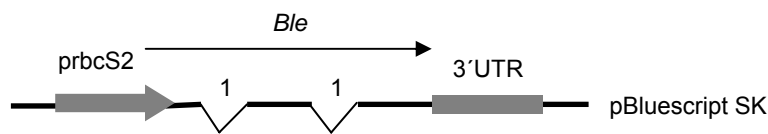


Fig 13. Esquema del gen *Ble* en el plásmido pSP124S. El gen *Ble* está flanqueado por el promotor del gen *rbcS2*, que codifica la subunidad pequeña de la rubisco, y la región terminadora del mismo gen. Dos copias del primer intrón del gen *rbcS2* han sido insertadas en la región codificante del gen *Ble*.

2.2.1. Plásmido pSI103

El plásmido pSI103 (Fig.14) cedido amablemente por el Dr. Emilio Fernández de la Universidad de Córdoba, permite la expresión de genes endógenos en microalgas. Se caracteriza por tener el gen marcador *AphVIII*, aislado de la bacteria *Streptomyces rimosus*, que codifica la enzima aminoglicosido 3-fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico paromomicina. Sizova y colaboradores (Sizova *et al.*, 2001) demostraron la alta eficiencia de este gen como marcador para la transformación nuclear de *C. reinhardtii*, mediante construcciones de plásmidos con el gen *AphVIII*, unido a diferentes elementos reguladores, y la región 5' del gen *hsp70A* (heat shock protein) que potencia la actividad del promotor al que se encuentra unido y disminuye la probabilidad de silenciamiento transcripcional (Schroda *et al.*, 2002, Schroda 2004). Además contiene las regiones no traducidas 5' y 3' y el primer intrón del gen *rbcS2* (subunidad pequeña de la rubisco) de *C. reinhardtii*.

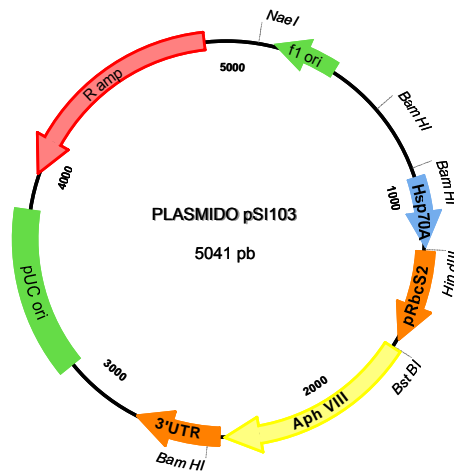


Fig. 14. Diagrama del plásmido pSI103. Esquema del vector de expresión para *Chlamydomonas* pSI103 donde se representa: f1 ori: origen de replicación para virus; R amp: gen de resistencia a ampicilina; pUC ori: origen de replicación para bacterias; 3'UTR: región no traducida del gen de la subunidad pequeña de la rubisco; *AphVIII*: gen de resistencia a paromomicina; pRbcS2: promotor del gen de subunidad pequeña de la rubisco; *Hsp70A*: promotor del gen correspondiente a una chaperona de la familia heat shock protein.

3. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.1. Cultivos bacterianos

3.1.1. *Escherichia coli*

El medio de cultivo utilizado fue medio LB (Sambrook y Russell 2001), que contiene: 10 g l⁻¹ de bacto triptona, 5 g l⁻¹ de extracto de levadura, y 5 g l⁻¹ de NaCl. Se ajustó el pH a 7, y se esterilizó en autoclave. El antibiótico indicado, normalmente ampicilina, fue esterilizado por filtración a través de membranas de nitrocelulosa 0,2 µm, y se añadió a los cultivos con una concentración final de 100 µg ml⁻¹. Para el crecimiento en placas se añadió agar al 1% (p/v). El crecimiento

en cultivos líquidos se realizó en agitadores orbitales termostatzados a 37 °C y con agitación (150-200 *r.p.m*) durante 14-16h. El crecimiento en placas se realizó en estufas termostatzadas a 37 °C durante el mismo tiempo.

3.2. Cultivos para microalgas

3.2.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

Se cultivó en medio TAP, preparado a partir de las siguientes soluciones concentradas (Harris 1989):

solución Tris (121 g l⁻¹); solución A (5 g l⁻¹ de CaI₂ 2H₂O, 10 g l⁻¹ de MgSO₄·7H₂, 40 g l⁻¹ de NH₄Cl); solución A-N (igual que la solución A pero sin NH₄Cl); solución B (115 g l⁻¹ de K₂HPO₄, 6 g l⁻¹ de KH₂PO₄) y solución de oligoelementos (Hutner *et al.*, 1950). Para preparar la solución de oligoelementos: 10 g de EDTA se disuelven en 250 ml de H₂O. A continuación se calientan 550 ml de H₂O a 100 °C, y se añaden en el siguiente orden, los siguientes compuestos: 11,4 g l⁻¹ H₃BO₃; 22 g l⁻¹ ZnSO₄·7H₂O; 5,1 g l⁻¹ MnCl₂·4H₂O; 5 g l⁻¹ FeSO₄·7H₂O; 1,6 g l⁻¹ CoCl₂·6H₂O; 1,6 g l⁻¹ CuSO₄·5H₂O; 0,214 g l⁻¹ MoO₄Na₂·2H₂O. Tras mezclar las soluciones, se calentó a 100 °C, se dejó enfriar hasta 80-90 °C, y se ajustó el pH a 6,8 con KOH al 20% y procurando que la temperatura no fuese inferior a 70 °C. Tras ajustar el volumen final a 1 l, se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 días antes de su uso.

Medio TAP: cada litro contenía 20 ml de solución Tris 1M, 10 ml de solución A o A-N, 1 ml de solución B, 1 ml de solución de oligoelementos, 0,95 ml de ácido acético glacial. Se ajusta el pH a 7, y se añade agar al 1,5% en el caso de cultivos sólidos.

Para preparar medio con nitrato como única fuente de nitrógeno se utilizó la solución A-N suplementada con KNO₃ a una concentración final de 1 g l⁻¹. En condiciones mixotrópicas los cultivos no necesitan ser enriquecidos con CO₂, sólo precisan agitación. Para medios sólidos se le añade agar al 1,5% (p/v), y se

incubaban en las mismas condiciones. Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en el autoclave, (20 minutos a 126 °C y 1,2 atmósferas de sobrepresión). Se cultivaron en cámaras termostatzadas a 25 °C con iluminación continúa de 100-200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad proporcionada por tubos fluorescentes de luz blanca (Philips 30W/33), a menos que se indique otra intensidad luminosa.

Todas las intensidades de luz se midieron con un Delta OHM quantum foto radiómetro equipado con una sonda PAR para medir luz blanca, y con una sonda UVB para medir intensidad de luz ultravioleta.

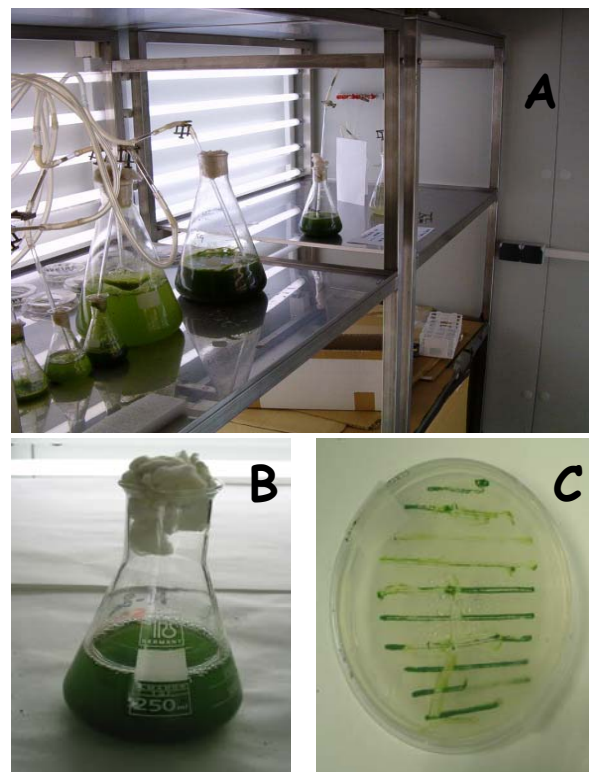


Fig. 15. Detalles de cultivos de microalgas en sus distintas modalidades. Cámara termostatzada para el cultivo de microalgas (A). Cultivo líquido de *Chlamydomonas* en condiciones mixotrópicas (B). Cultivo de *Chlamydomonas* en medio sólido (C).

3.2.2. *Dunaliella bardawil*

El medio de cultivo utilizado para cultivar *D. bardawil* fue descrito por Johnson y colaboradores (1968), conteniendo cada litro: 116,88 g de NaCl, 1,5 g de MgCl₂·6H₂O, 0,5 g de MgSO₄·7H₂O, 0,2 g de KCl, 0,2 g de CaCl₂·2H₂O, 1 g de KNO₃, 0,043 g de NaHCO₃, 0,035 g de KH₂PO₄, 10 ml de solución de hierro (189 mg l⁻¹ de Na₂EDTA, 244 mg l⁻¹ de FeCl₃·6H₂O), 10 ml de Trazas de *Dunaliella*. La solución de trazas contenía por litro: 61 mg de H₃BO₃, 38 mg de (NH₄)₆Mo₂O₂₄·4 H₂O, 6 mg de CuSO₄·5H₂O, 5,1 mg de CoCl₂·6H₂O, 4,1 mg de ZnCl₂, 4,1 mg de MnCl₂·4H₂O. Se ajustó el pH a 7,5 con HCl. Además se adicionó NaCl hasta la concentración final requerida.

Los cultivos en medio líquido se prepararon para una concentración final 2M de NaCl, mientras que para cultivos sólidos la concentración final era de 0,5M para minimizar la deshidratación del agar. Los cultivos fueron gaseados con aire enriquecido con CO₂ (3% v/v). Para esto, los recipientes de cultivo se taparon con algodón hidrófobo, atravesado por una varilla de vidrio hueca, cuyo extremo inferior estaba en contacto con el medio, y el superior se prolongaba con un tubo de goma, en el cuál se intercala un segmento de vidrio con algodón hidrófobo que actúa como filtro de aire.

Los cultivos líquidos se cultivaron en una cámara termostatzada a 25 °C, se iluminaron con luz blanca continua con una intensidad de 100-200 μE m⁻² s⁻¹, si no se indican otras intensidades luminosas, proporcionada por tubos fluorescentes (Philips 30W/33). Los cultivos en medio sólido se incubaron en las mismas condiciones en placas de Petri. Las condiciones para la esterilización de los medios fueron iguales a las descritas para *Chlamydomonas*.

4. SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO CELULAR

4.1. Seguimiento del crecimiento celular en bacterias

El crecimiento de un cultivo bacteriano se determinó midiendo la densidad óptica (D.O) del cultivo a una absorbancia de 580 nm.

4.2. Seguimiento del crecimiento celular en microalgas

Se utilizaron los siguientes métodos para estimar el crecimiento celular en microalgas.

4.2.1. Recuento del número de células

Para determinar el número de células de un cultivo, se toma un 1 ml de la suspensión celular, se diluye en función de la concentración del cultivo, y se le añaden 50 μ l de etanol al 95% (v/v) para inmovilizar las células. El recuento se lleva a cabo bajo microscopio en una cámara *Neubauer* de contaje celular.

La cámara de *Neubauer* es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Consiste en un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cuál se ha marcado, con la ayuda de un diamante, una cuadrícula de 3 x 3 mm. Cada cuadrado de esta cuadrícula se divide a su vez en 16 cuadros (0,25 mm x 0,0625 mm²) con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm, y una superficie total L (1mm²). Para cada determinación solemos contar 64 de estos cuadros, y hacemos la media aritmética. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0,1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0,1 mm³, es decir 0,1 μ l. Para el recuento celular utilizamos un microscopio óptico (Olympus CX41) con el objetivo de 40 aumentos.

4.2.2. Peso Seco

Para determinar el peso seco de un cultivo se filtró un volumen exacto de cultivo (30 ml) en un filtro pretarado de fibra de vidrio con un tamaño de poro de 0,7 μm . Posteriormente los filtros se lavaron con una solución 0,5 M de formiato de amonio para eliminar las sales y se dejaron secar en una estufa a 80 °C durante 24 horas. Finalmente el filtro se pesó, obteniéndose así el valor del peso seco.

4.2.3. Densidad óptica

Se realizaron medidas de absorbancia de suspensiones celulares a 660 nm. Todas las medidas de densidad óptica realizadas en este trabajo se llevaron a cabo en un espectrofotómetro con detector ultravioleta-visible Ultrospec 3100pro.

5. MANIPULACIÓN DEL DNA

5.1. Métodos de extracción de DNA plasmídico

5.1.1. Minipreparaciones de DNA plasmídico por lisis alcalina

Se utilizan 2 ml de cultivo bacteriano en fase estacionaria de crecimiento, que se centrifugan a 13.000 g durante 1 min. El precipitado se resuspende en 100 μl de una solución que contenía: 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH 8, y 10 mM de EDTA. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añaden 200 μl de una solución 0,1 M de NaOH y 1% de SDS (p/v). Se agita suavemente varias veces y se incuba 5 minutos en hielo. A continuación, se añaden 150 μl de una solución fría de acetato potásico 5M, pH 4,8 y se agita suavemente varias veces. El tubo se centrifuga a 13000 g durante 10 min. El precipitado, con los restos celulares, se descarta y el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo donde se realizan dos extracciones sucesivas; la primera con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25/24/1; v/v/v) y la segunda con cloroformo

saturado con H₂O. Por último, se toma la fase acuosa y se le añaden 2 volúmenes de etanol al 95% (v/v) para precipitar el DNA. Tras una incubación de 15-20 minutos, se centrifuga 5 minutos a 13.000 g, y el precipitado se lava con etanol al 70%. Se centrifuga de nuevo, y el DNA precipitado se seca y se resuspende en 20 µl de H₂O.

5.1.2. Minipreparaciones de DNA plasmídico por cromatografía de intercambio iónica

Este método fue empleado para la obtención de DNA de alta calidad utilizado para la transformación de células de *C. reinhardtii* y para reacciones de secuenciación del DNA. Se utilizaron columnas previamente empaquetadas del kit comercial NucleoSpin® Plasmid QuickPure de la marca comercial Macherey-Nagel, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El rendimiento obtenido fue de 1-5 µg de DNA por ml de cultivo.

5.1.3. Midipreparaciones de DNA plasmídico por cromatografía de intercambio iónica

Cuando requeríamos mayor cantidad de plásmido utilizábamos el Plasmid Midi Kit de Quiagen siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Partiendo de un volumen de cultivo de 25 ml.

5.2. Métodos de extracción de DNA genómico

5.2.1. A partir de cultivos de gran volumen

Se resuspende el precipitado celular obtenido al centrifugar 200 ml de un cultivo de *C. reinhardtii*, con una concentración de clorofila comprendida entre 25 y 30 µgChl ml⁻¹, en 3 ml de tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 8, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA y SDS al 2% (p/v)). Se agita a temperatura ambiente entre 5 y 15 minutos, se incuba en hielo unos minutos y se comienza la extracción del DNA con

fenol/cloroformo. Se añade el mismo volumen de fenol/cloroformo, se agita y se centrifuga 5-10 minutos. Al centrifugar aparecen dos fases, una acuosa superior en la que se encuentran los ácidos nucleicos y otra orgánica inferior. Las proteínas desnaturalizadas en presencia de fenol/cloroformo permanecen en la interfase. Se extrae la fase acuosa y se incuba en hielo un par de minutos. Se repite la extracción con fenol/cloroformo tantas veces como sea necesario hasta conseguir que la interfase quede limpia. A continuación se extrae la fase acuosa con el mismo volumen de cloroformo/H₂O, y se le añaden 2,4 volúmenes de etanol absoluto. Se deja precipitar 3-4 horas como mínimo a -20 °C y posteriormente se centrifuga durante 10 minutos en frío (4 °C). El precipitado obtenido se lava con etanol al 70%, se seca, y finalmente se resuspende en 40 µl de tampón de elución Tris-Cl 5 mM (pH 8.5) sin EDTA. Obtenemos así el DNA genómico y el RNA total. En ocasiones, se utilizó para comprobar la inserción en el genoma de distintos genes y construcciones, como molde para la PCR. Cuando era preciso extraer el DNA genómico puro, se procedió a una precipitación del RNA con LiC tal y como se detalla en el apartado 6.1.1. El DNA genómico se conservó a 4 °C por unas horas, o a -20 °C por un periodo de tiempo mayor.

5.2.2. Minipreparaciones para extraer DNA genómico

Se toma un “loop” de células de una colonia de *Chlamydomonas*, o el pellet de 1 ml del cultivo, se resuspenden en 10 µl de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 3% SDS) y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añade 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA) y 60 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5,2. El DNA es extraído con fenol/cloroformo y precipitado con isopropanol, 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente el precipitado se lava con etanol al 70%, se seca y se resuspende en Tris-HCl 5mM. 1µl del DNA genómico obtenido será utilizado para reacciones de PCR (consultar <http://www.chlamy.org/methods/dna.html> para más detalles).

5.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La electroforesis horizontal en gel de agarosa (McDonnell *et al.*, 1977) se utiliza para analizar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Para preparar el gel de agarosa, se disuelve en un horno microondas, la cantidad deseada de agarosa en tampón TAE 1X (TAE 50X: 242 g l⁻¹ de Tris, 57,1 ml l⁻¹ de ácido acético glaciar, 100 ml l⁻¹ de EDTA 0,50 M, pH: 8, con un pH final igual a 8,5), lo dejamos enfriar ligeramente y le añadimos el bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg ml⁻¹ (Sambrook y Russell 2001). La solución se vierte en un molde de electroforesis previamente sellado, se introduce un peine (Fig.16) que permita la formación de los pocillos donde se va a cargar el DNA, y se deja solidificar.

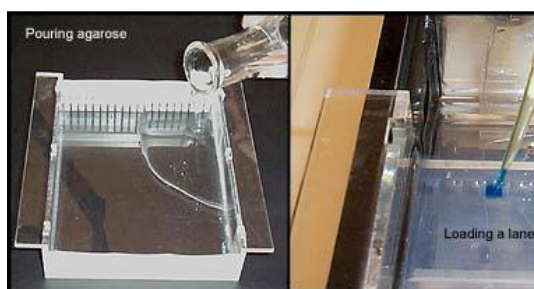


Fig. 16. Detalle de un gel de electroforesis Preparación y carga de un gel agarosa para electroforesis de ácidos nucleicos.

La concentración de agarosa utilizada en el gel depende del tamaño de los fragmentos que se deseen separar. Generalmente utilizamos porcentajes de agarosa comprendidos entre el 0,8 y el 1% (p/v). Para separar fragmentos menores de 300 pb aumentamos la concentración de agarosa hasta el 2% (p/v) (Sambrook y Russell 2001). Como marcadores de peso molecular se usó *1kb ladder* (Invitrogen) que incluye fragmentos con tamaños comprendidos entre 506 pb y 12 kb, y *1kb ladder plus* (Invitrogen) que incluye fragmentos que van desde 100 p hasta 12 kb.

Para llevar cabo la electroforesis, se dispone el gel ya solidificado en una cubeta de electroforesis horizontal, se carga en cada pocillo una mezcla de la muestra a analizar y tampón de carga (0,25% bromofenol blue y 40% de sacarosa en H₂O), y se corre la electroforesis a un voltaje de 100 V (fuente de Amersham Biosciences) hasta que el frente haya avanzado lo deseado. Para visualizar el DNA, se expone el gel a luz ultravioleta de 254 nm en un transiluminador ("Gel DocTM XR" de Bio-Rad). Las imágenes fueron tratadas con el software "Quantity one - 4.5.2" de la misma casa comercial.

5.4. Extracción y purificación de fragmentos de DNA de gel de agarosa

Para la purificación de fragmentos de DNA a partir de un gel de agarosa, se cortaron las bandas deseadas del gel de electroforesis con un bisturí, y posteriormente se sometieron a un proceso de adsorción en resinas de sílice. Se utilizaron resinas comerciales (PerfectprepGelCleanup; eppendorf) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.5. Cuantificación de DNA

La concentración de ácidos nucleicos se determinó siguiendo alguno de los procedimientos que se detallan a continuación:

5.5.1. Cuantificación electroforética

La estimación de la concentración del DNA, de forma aproximada, a partir de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, se realiza comparando la intensidad de las bandas correspondientes al DNA linearizado, con cantidades conocidas de DNA del bacteriófago lambda (λ) (Fig.17). El mínimo que se puede visualizar mediante tinción con bromuro de etidio es de 5 ng de DNA.

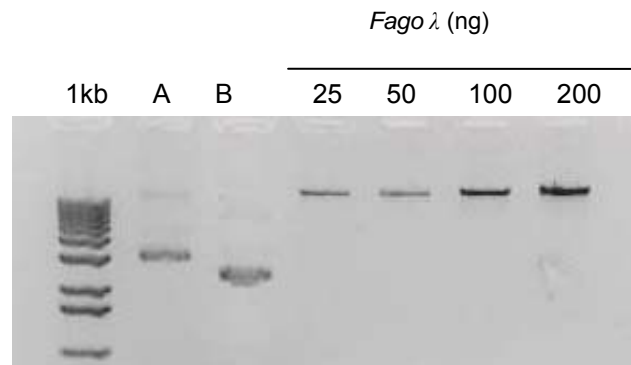


Fig. 17. Cuantificación electroforética de fragmentos de DNA. Gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio para cuantificar fragmentos DNA en comparación con el fago lambda (λ). A y B representan dos plásmidos lineales; 25, 50, 100 y 200 indican las distintas cantidades en ng del fago λ ; 1kb: marcador de peso molecular.

5.5.2. Cuantificación espectrofotométrica:

Cuando se precisa una medida más exacta, se puede emplear el método espectrofotométrico que, además, permite evaluar la pureza de la muestra. Se determinó la absorbancia a 260 nm de muestras diluidas adecuadamente de preparaciones de DNA (Sambrook y Russell 2001) frente a un blanco de TE o agua ultrapura. Se utilizó como coeficiente de extinción $0,02 (\mu\text{g ml}^{-1})^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. La pureza de las preparaciones se determinó calculando la relación $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$, que osciló entre 1,7-1,8.

5.6. Digestión de fragmentos de DNA

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas que indica el fabricante para cada enzima. Las enzimas utilizadas fueron de Amershan o Roche, con su correspondiente tampón de digestión. En algunos casos realizamos digestiones dobles con enzimas de restricción diferentes, lo que nos permitirá una inserción dirigida. Todas las digestiones se incubaron a 37 °C durante 2 horas.

6. MANIPULACIÓN DEL RNA

6.1. Aislamiento del RNA mensajero (mRNA)

6.1.1. Extracción con fenol/cloroformo y precipitación con LiCl

Dada la inestabilidad del RNA todas las soluciones usadas para su extracción (excepto las que contenían Tris) fueron tratadas con el inhibidor de RNAasas, dietil pirocarbonato (DECP) al 0,1% (p/v) con agitación durante un mínimo de 12 horas y posteriormente autoclavadas. Se centrifugan 200 ml de cultivo y se resuspenden en 3 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0,3 M NaCl, 5 mM EDTA y 2% (p/v) de SDS). Se realiza una primera extracción añadiendo un volumen igual al de muestra de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamilalcohol 50:48:2 saturado con 50 mM Tris-HCl y pH 8, se agita vigorosamente durante 20 minutos, se incuba unos minutos en hielo y se centrifuga 10 minutos a 11.000 *r.p.m* obteniéndose dos fases; una acuosa superior donde se localizan los ácidos nucleicos (DNA y RNA) y una fase orgánica inferior donde se localizan las moléculas liposolubles; las proteínas se retiene en la interfase. Se repite la extracción hasta que la interfase quede bien limpia. La última extracción se realiza con cloroformo saturado en H₂O tratado con DEPC.

Para precipitar los ácidos nucleicos se añaden 2,4 volúmenes de etanol absoluto y se incuba durante 3-4 horas como mínimo a -20 °C. Se centrifuga en frío a 13000 *r.p.m.* durante 10 minutos, se deja secar el precipitado y se resuspende en 0,5 ml de H₂O tratada con DEPC; el RNA se precipitó con el mismo volumen de LiCl 8 M a 4 °C durante un mínimo de 4 horas. Se centrifuga a 13000 *r.p.m.* en frío durante 30 minutos y del sobrenadante se obtiene el DNA genómico, y del precipitado el RNA total. Para obtener el RNA total se lava el precipitado con etanol al 70%, eliminando así el exceso de sales, se seca y se vuelve a precipitar con etanol, añadiendo 2,5 volúmenes de acetato sódico 3 M hasta una concentración final de 0,15 M. Por último, se centrifuga y

se lava el precipitado con etanol al 70%, se seca y se resuspende en 300 μ l de tampón 5 mM Tris-HCl pH 8,5. (Schloss *et al.*, 1984; Sambrook y Russell 2001).

6.1.2. Cromatografía de intercambio iónico

Eventualmente, cuando el número de muestras era muy elevado, el aislamiento del RNA total se llevó a cabo con el kit RNAeasy plant MiniKit de Qiagen, según las instrucciones del fabricante, partiendo de 50-100 mg peso fresco, y utilizando el tampón PL1 (suministrado por el fabricante) para la lisis celular.

6.2. Cuantificación del RNA

Para cuantificar la concentración de las disoluciones de RNA se determina la absorbancia a 260 y 280 nm, frente a un blanco de TE o agua ultrapura. Se utilizaron coeficientes de extinción de $0,025 (\mu\text{g}^{-1} \text{ ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La relación DO_{260}/DO_{280} indica la pureza del RNA. (Sambrook y Russell 2001).

6.3. Retrotranscripción del mRNA

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir RNA total utilizando la SuperScriptII RNaseH-transcriptasa reversa (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante, y se utilizó posteriormente como substrato para reacciones de PCR. Las reacciones se prepararon para un volumen final de 20 μ l, conteniendo cada una: 1 μ l de OligodT ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$), 1 ng-5 μg de RNA total, 1 μ l dNTP mix 10 mM y H₂O destilada hasta un volumen final de 20 μ l. La muestra se calentó durante 5 min a 65 °C, y rápidamente se incubó en hielo. Se centrifuga para recoger la muestra y se le añade: 4 μ l de 5X "First-Strand Buffer", 2 μ l 0,1 M DTT, y 1 μ l RNaseOUT inhibidor de nucleasas ($40 \text{ U}\mu\text{l}^{-1}$). Se mezcla e incuba 2 min a 42 °C. Posteriormente se añade 1 μ l de la enzima Retrotranscriptasa (200 U) se mezcla suavemente con ayuda de la pipeta y se incuba 50 minutos a 42 °C.

Para inactivar la reacción calentamos 15 minutos a 70 °C. Para eliminar el RNA complementario al cDNA incubamos durante 20 minutos con RNase a 37 °C.

7. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR (Saiki *et al.*, 1988) tradicional o PCR a tiempo final es uno de los métodos más versátiles y útiles que puede utilizar el biólogo molecular. Consiste en la replicación “*in vitro*” de fragmentos específicos de DNA. A partir de una única molécula de DNA se pueden obtener del orden de 100.000 millones copias idénticas en 1-2 horas. La técnica se basa en ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y elongación. La temperatura de hibridación (T_a) es específica de los cebadores, y se calcula empíricamente en función de la temperatura de desnaturalización o T_m ($T_a = T_m - 5$ °C), que viene determinada por la longitud y composición de los oligos. T_m puede calcularse de modo orientativo mediante la fórmula: T_m (°C) = $2(A+T) + 4(C+G)$, aunque en ocasiones es necesario una confirmación experimental. El tiempo de elongación depende de la longitud del fragmento a amplificar, siendo la actividad de la polimerasa de aproximadamente 1 kb por minuto. La amplificación por PCR fue llevada a cabo en un termociclador (Mastercycler personal; eppendorf). Cada reacción de PCR se preparó para un volumen final 25 μ l y contiene: 10 pmol de cada primer, 0,2 mM dNTPs, 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa de Biotools (B&M Labs, Madrid, España), 2,5 μ l de tampón específico 10X (que contiene 2,5 mM $MgCl_2$), 1% dimetilsulfoxido (DMSO), 1 μ l de DNA genómico diluido o 1 μ l de cDNA y H_2O miliQ hasta completar el volumen final. El programa para la PCR fue: 0,5 minutos a 96 °C, 0,5 minutos a la temperatura de hibridación de los cebadores, y 1,5 minutos a 72 °C, para 30 ciclos.

7.1. Diseño de cebadores

Los cebadores para la amplificación por PCR fueron diseñados con el módulo “Primer Select” del programa informático Lasergene (DNASTAR, Inc.) (Fig. 19).

En algunas ocasiones, los cebadores se diseñaron incluyendo sitios de corte para alguna enzima de restricción específica. En todos los casos se verificó que los cebadores no formasen autodímeros, horquillas o dímeros entre ellos. Los cebadores utilizados en este trabajo se resumen en el apartado 11.

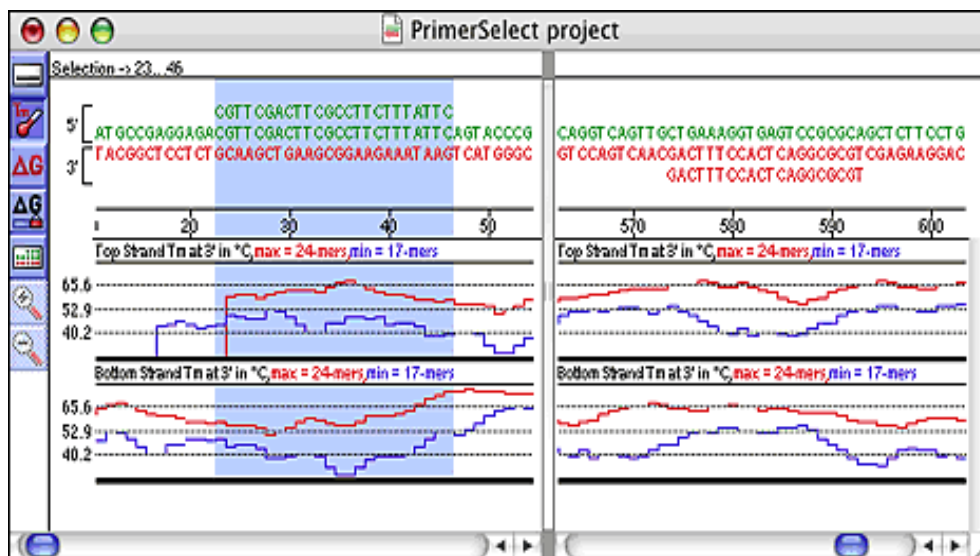


Fig. 19. Detalle del Programa “Primer Select” para el diseño de cebadores. Diseño de cebadores específicos con el módulo “Primer Select” del programa informático Lasergene (Dnastar, Inc.).

7.2. Ligación de los productos de la PCR al vector pGEM-T

Los fragmentos de DNA procedentes de amplificaciones por PCR se ligaron al vector comercial pGEM-T (Promega) (Fig.11) usando la ligasa, el tampón y las condiciones de incubación indicadas por el fabricante (Tabla II).

Tabla II. Reacción para la clonación de productos de PCR en el vector pGEM-T

	Reacción estándar	Control positivo	Control negativo
Tampón de ligación 2X	5 µl	5 µl	5 µl
Vector pGEM-T	1 µl	1 µl	1 µl
Producto de la PCR	X µl		
DNA control positivo	-	2 µl	-
T4 ligasa	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O hasta un volumen final de	10 µl	10 µl	10 µl

Componentes de las distintas reacciones de ligación de los productos amplificados por PCR al vector de clonación pGEM-T.

7.3. qPCR cuantitativa a tiempo real

La tecnología PCR cuantitativa a tiempo real o “Real Time PCR”, comúnmente utilizada para el estudio de la expresión de genes, nos permite comparar la abundancia de un transcrito de cualquier gen, por coamplificación de un control interno, con el cDNA en estudio, de forma específica y con gran sensibilidad. En la PCR tradicional, la cuantificación se realiza en función del producto final, pero en los últimos ciclos el abundante número de copias puede saturar el sistema de detección. Por el contrario, la qPCR cuantitativa a tiempo real, se basa en la determinación del ciclo umbral (C_t), o ciclo inicial de amplificación. El incremento de DNA en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. El valor del C_t (“Threshold cycle) o ciclo umbral por encima del cual la fluorescencia emitida comienza a ser significativa, es inversamente proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos, casi todos basados en la utilización de otro fragmento de DNA (sonda) complementario a una parte intermedia del DNA que queremos amplificar. Esta sonda puede ser específica o inespecífica. En el primer caso, la sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia (“*quencher*”), de tal forma que sólo

cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la DNA polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del "*quencher*" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser (sondas Taqman) En el caso de sondas inespecíficas, la sonda se une a toda molécula de DNA de cadena doble emitiendo fluorescencia, solo cuando se encuentra unida a ésta; la más empleada, y utilizada en nuestro trabajo es el SYBRGreen I. Este último sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil, pero el principal inconveniente es su baja especificidad, debido a que el fluoróforo se une de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores. Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases, por lo que aplicando un gradiente de temperatura al final de la reacción de PCR se obtiene una curva de disociación que permite comprobar la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR.

Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en tiempo real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental. La baja probabilidad de contaminación, la exactitud de los resultados y la sencillez, rapidez y automatización del método, hacen de la PCR a tiempo real una técnica cada vez más utilizada en biología molecular.

El proceso se llevó a cabo en un equipo Mx3005P (Stratagene), con un fotomultiplicador como detector de fluorescencia, placa de 96 pocillos con tapa térmica, y un sistema óptico de dos ruedas con 5 filtros cada una. El rango de emisión del equipo (λ_{em}) era de 350 a 700 nm, y el de excitación (λ_{ex}) de 350 a 750 nm. Se utilizó el complejo SYBRGreenI como fluoróforo inespecífico que emite fluorescencia cuando se encuentra unido al surco mayor del DNA ($\lambda_{em} = 520$ nm y $\lambda_{ex} = 497$) y cada reacción se preparó para un volumen final de 25 μ l, con los

siguientes componentes: 12,5 µl del MaxterMix 2X de Stratagene con las concentraciones establecidas por el fabricante (dNTPs, MgCl₂, SYBR Green, Taq polimerasa hot Start, buffer DNA polimerasa), 50-150 nM como concentración final de cada cebador (for-rev), 1 µl de DNA complementario conteniendo entre 100-150 ng y H₂O mili-Q hasta ajustar el volumen final. Cada muestra se analizó por triplicado. Se incluyó un control negativo (C-) sin DNA, y un control positivo (C+). La fluorescencia se midió al final de cada paso amplificación, y al final del proceso se ejecutó una curva de disociación para comprobar la especificidad de los cebadores. Los datos se trataron con el software "Quick setup-4.5.2".

7.4. RESDA PCR

La RESDA PCR, Restriction Enzyme Site-Directed Amplification, descrita por González-Ballester y colaboradores (2005a), basada en la Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL PCR) descrita por Liu y Whittier (1995) permite la fácil y eficiente identificación de las regiones adyacentes al DNA marcador insertado en el genoma de *Chlamydomonas* durante experimentos de mutagénesis insercional. Se basa en el uso de cebadores específicos para el gen marcador *AphVIII*, y cebadores degenerados que hibridan con las secuencias correspondientes a sitios de restricción frecuentes distribuidos aleatoriamente en el genoma de *Chlamydomonas*. Se lleva a cabo realizando varias rondas de amplificación. El termociclador utilizado en estos casos era de la casa comercial Techne, modelo 3000. Ejecuta rampas de temperatura a 3,6 °C s⁻¹.

Los cebadores degenerados constan de varias partes (Fig. 20); en el extremo 3' tienen las secuencias correspondientes a sitios de restricción frecuentes, junto con un pequeño número de nucleótidos degenerados; en el extremo 5' tienen una secuencia de 18 bases que corresponde al cebador universal Qo. Ambos extremos están unidos por un puente de inosinas que aumentan la estabilidad de las 10 bases del extremo 3'. El cebador Qo permitirá, en combinación con otro cebadote específicos, R4, la reamplificación específica por una PCR anidada de los fragmentos amplificados en la primera ronda de PCR.

Esta técnica, junto con la mutagénesis insercional, ha sido utilizada con éxito para el análisis funcional de la regulación de la ruta de asimilación de nitrato en *Chlamydomonas* (González-Ballester *et al.*, 2005 a).

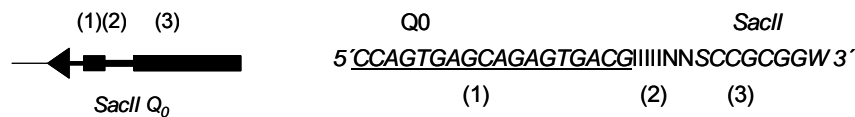


Fig 20. Ejemplo de cebador degenerado. El cebador DegSacII consta de 18 bases del primer universal Q₀ en el extremo 5' (1), de un puente de 5 inosinas (2) y de un fragmento degenerado de 10 bases,(3) que incluye el sitio de restricción para SacII (tomado de González-Ballester *et al.*, 2005a)

8. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

8.1. Cepas bacterianas

8.1.1. *Escherichia coli*

Células competentes

La exposición de *E. coli* a CaCl₂ u otros iones divalentes a temperaturas próximas a 0 °C favorece la penetración del DNA extraño en la célula. El tratamiento con CaCl₂ en frío origina un estado especial de la célula denominado "competencia". Con este objetivo se cultivó la estirpe DH5α de *E. coli* en medio LB durante toda una noche a partir de una colonia aislada. A continuación, las células se diluyeron 1:50 en medio LB y se cultivaron durante 2h a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 580 nm próxima a 0,5. Tras centrifugar las células 5 minutos a 1000 *g* se resuspendió el precipitado en 1/2 del volumen de partida de CaCl₂ 50 mM frío manteniéndose 30 minutos en hielo. A continuación, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 1/10 del volumen de partida de CaCl₂ 50 mM (Sambrook y Russell 2001).

Las células competentes así obtenidas pueden ser utilizadas tras una incubación de 2-4 horas a 4 °C, o se pueden conservar a -80 °C hasta su uso.

Transformación de células competentes

Para su transformación mezclamos en viales eppendorf: 200 µl de células competentes, el DNA plasmídico (aproximadamente 200 ng), y 100 µl de tampón TCM (Tris 10 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10mM, pH 7). Se incuban en hielo durante 30 minutos, después la mezcla se somete a un choque térmico de 43 °C durante 2,5 minutos para facilitar la penetración de DNA, y se vuelve a incubar en hielo 5 minutos. Posteriormente se añade 0,7 ml de LB y se incuba a 37 °C durante 30-45 minutos sin agitación. Por último, se siembra un volumen adecuado de la transformación en placas de LB que contienen 100 µg ml⁻¹ de ampicilina (Sambrook y Russell, 2001) y se dejaron crecer a 37 °C.

8.2. Microalgas

8.2.1. Transformación con perlas de vidrio

La transformación fue llevada a cabo usando el método de agitación con perlas de vidrio de Kindle (1990) con algunas modificaciones. Concentramos el cultivo de *C. reinhardtii* 100 veces, centrifugándolo 5 minutos a 3000 g, y resuspendiendo el sobrenadante en medio TAP estéril. La suspensión celular concentrada se transfiere a tubos estériles cónicos que contienen 0,3 g de perlas de vidrio estériles (0,4-0,6 mm), 0,2 ml de polietilenglicol (MW 8000) al 20% y alrededor de 1 µg del plásmido deseado, a menos que se indiquen otras cantidades de ADN. Se agita vigorosamente en el vortex cada tubo durante 8 segundos, se añade 5 ml de medio TAP estéril, se centrifuga durante 2 minutos a 3000 g y se elimina el sobrenadante. Se resuspenden las células, evitando arrastrar las perlas de vidrio, en medio TAP estéril, se traspasan a tubos estériles limpios y se completan con medio TAP estéril hasta un volumen final de 50 ml. Estos tubos se dejan en la cámara de cultivo durante 24h con luz (200 µE m⁻² s⁻¹).

Al día siguiente, los tubos se centrifugan a 3000 g durante 2-3 minutos, el precipitado se resuspende en 1 ml de medio TAP estéril y se vierte en placas de medio TAP con 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de paromomicina. Tras aproximadamente 5 días en la cámara de cultivo empiezan a aparecer las primeras colonias de transformantes.

9. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN MICROALGAS

9.1. Medida de pigmentos

Determinación espectrofotométrica de clorofila y carotenoides totales

La extracción de pigmentos totales se llevó a cabo siguiendo el método de la acetona caliente al 80% (v/v) (Arnon 1949). Se toma 1ml de la suspensión celular, se calienta durante 5 minutos a 100 °C, se le añaden 4 ml de acetona, y se agita vigorosamente. Tras centrifugar a 5.000 g durante 5 minutos se midió la absorbancia del sobrenadante. La clorofila (Chl) fue determinada espectrofotométricamente a 652 nm según el método descrito por Arnon (1949):

$$\text{Chl}(\mu\text{g ml}^{-1}) = \left(\frac{\text{Abs}_{652} \cdot 5}{34,5} \right) \cdot 1000$$

La determinación de clorofilas y carotenoides totales (Ct) se realizó midiendo la absorbancia del sobrenadante a 470, 644 y 664 nm. Las concentraciones se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones (Lichtenthaler 1987):

$$\text{Chl } a (\mu\text{g ml}^{-1}) = 5 \cdot [(12,25 \cdot \text{Abs}_{664}) - (2,74 \cdot \text{Abs}_{646})]$$

$$\text{Chl } b (\mu\text{g ml}^{-1}) = 5 \cdot [(21,5 \cdot \text{Abs}_{646}) - (5,1 \cdot \text{Abs}_{664})]$$

$$Chl\ total\ (\mu g\ ml^{-1}) = 5 \cdot [(7,15 \cdot Abs_{664}) + (18,7 \cdot Abs_{646})]$$

$$Ct\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{[(5 \cdot 1000 \cdot Abs_{470}) - (1,82 \cdot Chl\ a) - (85,02 \cdot Chl\ b)]}{198}$$

Determinación por cromatografía líquida de clorofilas y carotenoides específicos

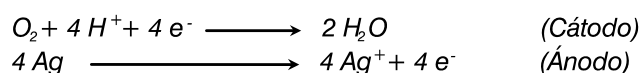
Para la extracción de las muestras se utilizó el método descrito anteriormente para la extracción de pigmentos. La separación y análisis cromatográfico de pigmentos se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) *Merck Hitachi*, con un detector de UV-Vis, tal como describe Young y colaboradores (1997), usando una columna RP-18, con un flujo de 1 ml min^{-1} . La fase móvil utilizada fue la siguiente: disolvente A (etil acetato); disolvente B (acetonitrilo:agua- 9:1 v/v) y el gradiente aplicado para la elución fue: 0-16 minutos 0-60% de A; 16-30 minutos 60% de A; 30-35 minutos 100% de A. El volumen de muestra inyectada en la columna fue de $20\ \mu\text{l}$. La detección de pigmentos se llevo a cabo a una longitud de onda de 450 nm, excepto el fitoeno que fue determinado a 288 nm.

Para la cuantificación de pigmentos se utilizaron patrones estándar suministrados por la casa comercial Sigma o DHI (Hoersholm, Denmark). Los cálculos se basaban en el área del pico obtenido en cada caso.

9.2. Medida de producción y consumo de oxígeno dependiente de luz.

La actividad fotosintética se determinó siguiendo al evolución de oxígeno en un electrodo tipo Clark de Pt/Ag-AgCl. La celda consta de un cátodo de Pt y un ánodo de Ag/AgCl inmersos en una disolución saturada de KCl. La aplicación del

potencial provoca la reducción del oxígeno y la generación de una corriente eléctrica proporcional a su concentración. Las reacciones que tienen lugar son las que se indican a continuación:



El electrodo de oxígeno se compone de una cámara cilíndrica con una capacidad de 3 ml. La base tiene forma circular, y en ella se encuentran los electrodos de trabajo y de referencia. El sistema está refrigerado por un baño de agua termostatzado a 25 °C y conectado a un ordenador que recoge la evolución de la intensidad de corriente producida a lo largo del tiempo. El electrodo se encuentra acoplado a un sistema de iluminación que cuenta con una fuente de luz halógena blanca, cuya intensidad puede variar alcanzando intensidades saturantes de hasta 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En cada medida de producción de oxígeno se utilizó 1 ml de la suspensión celular, se colocó en la cubeta del electrodo donde se sometió a agitación magnética y a iluminación continua saturante.

En estas condiciones se registra la evolución de O_2 frente al tiempo, siendo la pendiente de la recta proporcional a la actividad fotosintética aparente, esto es el oxígeno desprendido por fotosíntesis menos el consumido por respiración. Para determinar la actividad fotosintética neta, las mismas células son sometidas a un periodo de oscuridad, durante el cual registramos el oxígeno consumido por respiración. La suma de las pendientes correspondientes da como resultado la actividad fotosintética neta.

La equivalencia entre la corriente registrada y la concentración de oxígeno se calculó tomando como referencia la concentración de oxígeno disuelto en agua destilada a 25 °C, que es 0,265 mM y el valor obtenido cuando se elimina todo el oxígeno por desplazamiento al saturar la solución con el reductor ditionito, que corresponde a cero. La actividad fotosintética se define como los μmoles de oxígeno desprendido unidad de tiempo (horas) y de biomasa (mg Chl).

10. HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Las herramientas bioinformáticas empleadas en este trabajo se pueden dividir en dos grupos: bases de datos de secuencias y programas de análisis de secuencias.

10.1. Bases de datos de secuencias

Genéricas:

GeneBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>

EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>

Específica:

Chlamydomonas: Chlamy Center JGI v3.0-4.0 (<http://www.chlamy.org>)

10.2. Herramientas para análisis de secuencias

Para el alineamiento de secuencias

Blast: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Clustalw: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

MegAlgin (Dnastar)

Para el diseño de cebadores para PCR

Primer Select (Dnastar)

Para la edición de secuencias

EditSeq (Dnastar)

BioEdit: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

Otros

ChloroP: <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>

11. CEBADORES EMPLEADOS

Tabla III. Cebadores utilizados en el trabajo

Cebador	Secuencia	Ta (°C)
<i>For-AphVIII-NaeI</i>	5' CGCGCCGGCTTGACATGATTGGTG 3'	57
<i>Rev-AphVIII-XbaI</i>	5' CACTCTAGACTTCCGGCTCGTATG 3'	54
<i>For-pds1300-EcoRI</i>	5' TGAATTCGCCAGCCAGGAAGAAGT 3'	52
<i>Rev-pds1300-BamHI</i>	5' GGATCCCACCCAATCGTT 3'	45.2
<i>For-Ble-XhoI</i>	5' AGCGGTGCCCTCGAGATAAAC 3'	51.2
<i>Rev-Ble-PstI</i>	5' CAGCCCGCCCCTGCAGAAAGAG 3'	57.2
<i>For Ubiq-L</i>	5' GTACAGCGGCGGCTAGAGGCAC3'	58
<i>Rev Ubiq-L</i>	5' AGCGTCAGCGGCGGTTGCAGGTATCT3'	65
<i>For-pNia1-ter rbcS2</i>	5' CCCCCTCCTCTGCTGCCTCTG 3'	65
<i>Rev-pNia-ter rbcS2</i>	5' CTTCCATCCACCGCCGTTTCGTCA 3'	67.5
<i>For-pds</i>	5' GCGGCGGCGAGCTGAAGATGAAC 3'	67
<i>Rev-pds</i>	5' GGTGAAGTCGCCAGCCAGGAAGAA 3'	68
<i>For-pds small</i>	5' CCGCGTGAACGAGGAGGTCT 3'	61.4
<i>Rev-pds small</i>	5' CCGCGGGCCGTGAAGTGG 3'	63.2

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Efecto de la inhibición de la enzima fitoeno desaturasa sobre la síntesis de carotenoides en la clorofita *Dunaliella bardawil*

1.1. EFECTO DE LA CARENCIA DE NITRÓGENO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES EN *Dunaliella bardawil*

La ruta de la carotenogénesis se induce en respuesta a un buen número de condiciones de estrés abiótico, tales como exceso de luz, estrés osmótico, luz ultravioleta, carencia de nitrógeno u otras carencias nutricionales (Ben-Amotz y Avron 1983; Coesel 2008), siendo el exceso de luz y la carencia de nitrógeno dos de los factores más importantes. El nitrato se ha descrito como una molécula señal importante en eucariotas fotosintéticos, cuya presencia o carencia es capaz de inducir importantes cambios tanto a nivel metabólico como fisiológico. En microalgas unicelulares está bien descrito que la concentración de nitrógeno en el medio regula la gametogénesis (Pozuelo *et al.* 2000) y la ruta de asimilación de nitrógeno (Fernández *et al.*, 1998), entre otros procesos fisiológicos. Para comprobar el efecto de la carencia de nitrógeno sobre la acumulación de carotenoides en *D. bardawil*, tomamos un volumen de 200 ml de un cultivo de la microalga en fase exponencial de crecimiento, lo centrifugamos, y tras lavar con medio sin nitrógeno, resuspendemos en el mismo volumen del medio carente de la fuente nitrogenada. Tras 72 horas de incubación en estas condiciones, tomamos muestras para la determinación del perfil de carotenoides, y para la observación microscópica de células (Fig.21). La incubación en carencia de nitrógeno provoca una importante acumulación de β -caroteno. Esto provoca una alteración de la coloración de las células que puede apreciarse tanto al microscopio óptico, como a simple vista. Esta estrategia se ha utilizado con éxito para estudiar el papel de los carotenoides en respuesta al estrés oxidativo (Salguero *et al.*, 2003) y para establecer sistemas bifásicos acuosos/orgánicos de producción de β -caroteno (León *et al.*, 2003). Aunque la regulación de los mecanismos por los que la carencia de nitrógeno y otros factores de estrés ambiental inducen la síntesis de carotenoides no se conoce, sí hay muchos estudios sobre el potencial de ciertas algas unicelulares para la producción masiva de carotenoides naturales, como es el caso de *Dunaliella*, capaz de sintetizar hasta el 10% de su peso seco en β -caroteno.

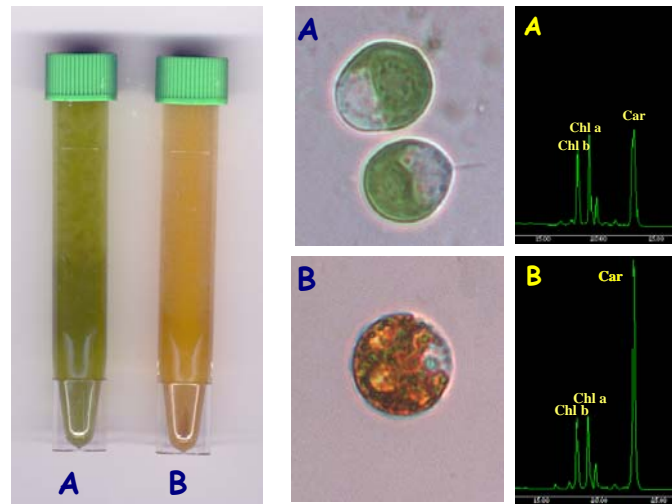


Fig. 21. Efecto de la carencia de nitrógeno sobre células de *Dunaliella bardawil*. Aspecto de los cultivos, vista al microscopio (1000 X) y separación cromatográfica de los pigmentos en células de *D. bardawil* cultivadas en condiciones normales (A) y cultivadas en carencia de nitrógeno durante 72 horas (B).

La acumulación de carotenoides en respuesta a estas condiciones de estrés abiótico llega a alterar la pigmentación de las células de *D. bardawil*, pasando de un color verde a un intenso color naranja (Fig.21). Este cambio de pigmentación se debe a un drástico cambio de la relación carotenoides/clorofila.

En este trabajo vamos a estudiar el efecto combinado de someter las células de *Dunaliella bardawil* a carencia de nitrógeno en presencia del herbicida norflurazón, que inhibe la enzima fitoeno desaturasa. La inducción de la carotenogénesis en presencia de norflurazón altera todo el perfil de carotenoides del alga, tal como observamos mediante cromatografía líquida, y proporciona un método eficaz para la producción de fitoeno por métodos biotecnológicos. Este carotenoide incoloro tiene gran importancia en la industria cosmética por sus propiedades antioxidantes.

1.2. TRATAMIENTO DE *Dunaliella bardawil* CON EL HERBICIDA NORFLURAZÓN

El norflurazón (Fig.22) o 4-cloro-5-(metilamino)-2-[3-(trifluorometil) fenil]-3(2*H*)-pyridazinona es un herbicida perteneciente a la familia de las piridazinonas, bien conocido por su efecto sobre la biosíntesis de carotenoides en plantas superiores y microalgas (Ben-Amotz *et al.*, 1987). El tratamiento con norflurazón provoca blanqueamiento celular debido a la inhibición de las síntesis de carotenoides y a la consecuente reducción en el contenido en clorofila, cuya síntesis y ensamblado en los complejos colectores de luz está directamente relacionado con la presencia de carotenoides (Lohr *et al.*, 2005). Ésto provoca una inhibición en la actividad fotosintética y muerte de la planta. De hecho, el norflurazón, es el principio activo de un buen número de herbicidas comerciales.

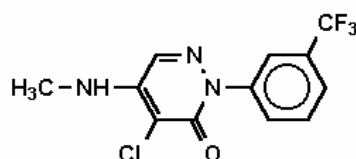


Fig.22. Estructura química del herbicida norflurazón

Varios estudios realizados en plantas superiores han demostrado que el mecanismo de acción del norflurazón es la inhibición de la fitoeno desaturasa (Breitenbach *et al.*, 2001) (Fig.23) por competición con sus cofactores. La fitoeno desaturasa es una enzima asociada a membrana de localización cloroplástica. Su inhibición impide la síntesis de β -caroteno y otros carotenoides fotoprotectores y consecuentemente las clorofilas y demás componentes de las membranas tilacoidales se vuelven más susceptibles a la fotooxidación. Además de su importancia para revelar información sobre la regulación de la carotenogénesis, la inhibición de las enzimas de la ruta puede ser utilizada como estrategia para redirigir el metabolismo de la microalga hacia la síntesis de carotenoides de nuestro interés.

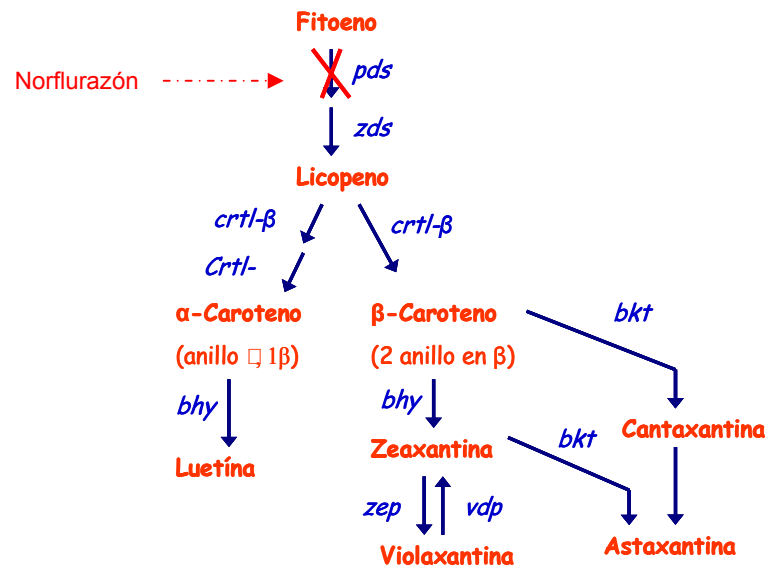


Fig.23. Ruta simplificada de la carotenogénesis en microalgas. Ruta de carotenogénesis simplificada donde se indica la actividad del herbicida norflurazón, inhibiendo la síntesis de licopeno y del resto de los carotenoides al inhibir la actividad de la enzima fitoeno desaturasa.

Con estas premisas nos planteamos estudiar la producción de fitoeno en células de *D. bardawil*, sometidas a carencia de nitrógeno, en las que la ruta de la carotenogénesis ha sido bloqueada por la adición de norflurazón (Fig. 23). Con este objetivo, decidimos optimizar la concentración de norflurazón que permite bloquear la carotenogénesis sin afectar letalmente a la viabilidad celular y estudiar las condiciones más adecuadas para la acumulación y producción del carotenoide incoloro fitoeno.

1.2.1. Efecto de diferentes concentraciones de norflurazón sobre la actividad fotosintética

Células de *D. bardawil* cultivadas en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos fueron recogidas por centrifugación, lavadas con medio sin nitrógeno y resuspendidas en este mismo medio. Estas células se cultivaron en ausencia de nitrógeno y cantidades crecientes de norflurazón durante 72 horas. Transcurrido este tiempo tomamos alícuotas de cada cultivo y determinamos su capacidad fotosintética a luz saturante en un electrodo de Clark (tabla IV). La medida de la actividad fotosintética nos da una idea de la viabilidad celular.

Tabla IV. Efecto de diferentes concentraciones de norflurazón sobre la actividad fotosintética y el contenido en clorofila de células de *Dunaliella bardawil*

Norflurazón ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Clorofila ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Actividad fotosintética ($\mu\text{moles O}_2 \text{ mgChl}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
0	25,7	269
5	25,5	265
10	24,7	255
20	22,0	166
40	22,7	142

Células de *Dunaliella bardawil* en la fase exponencial de crecimiento ($25 \mu\text{gChl ml}^{-1}$) se recogieron por centrifugación, se lavaron, y se resuspendieron en medio sin nitrógeno, donde fueron incubadas durante 72 horas con las cantidades indicadas del herbicida. Transcurrido este tiempo de incubación determinamos el contenido en clorofila y la actividad fotosintética.

La concentración máxima de norflurazón que se puede adicionar al medio de cultivo sin que la actividad fotosintética de *D. bardawil* se afecte de forma significativa es $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Para esta concentración de norflurazón el valor de la actividad fotosintética era del 95% de la actividad fotosintética de células control

cultivadas también en ausencia de nitrógeno, pero sin norflurazón. Concentraciones mayores, como $40 \mu\text{g ml}^{-1}$, reducían la capacidad fotosintética hasta el 50 % de la de las células control.

1.2.2. Efecto de diferentes concentraciones de norflurazón sobre la biosíntesis de los carotenoides β -caroteno y fitoeno

Tal como habíamos comprobado previamente, la carencia de nitrógeno induce la síntesis de β -caroteno, pero en presencia de norflurazón la inhibición de la enzima fitoeno desaturasa provoca una disminución de la acumulación de β -caroteno y un incremento proporcional del fitoeno acumulado. En la figura 24 se indican las cantidades de β -caroteno y fitoeno acumuladas por células de *D. bardawil* cultivadas en medio sin nitrógeno y con cantidades crecientes de norflurazón durante 72 horas.

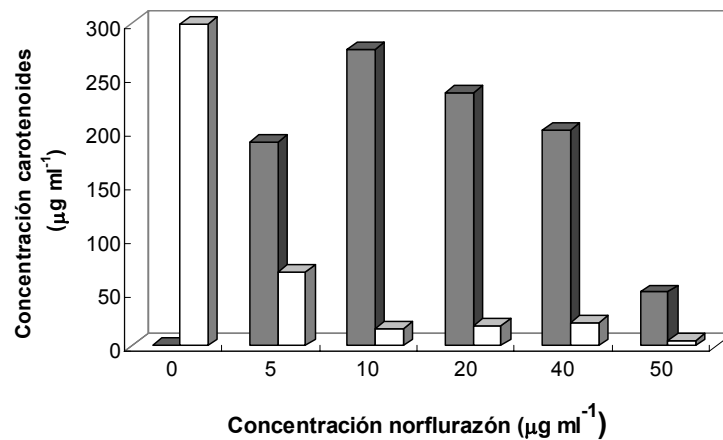


Fig.24. Producción de β -caroteno y fitoeno en células de *Dunaliella bardawil* tratadas con norflurazón. Células de *D. bardawil* cultivadas en medio sin nitrógeno y en presencia de cantidades crecientes del herbicida norflurazón durante 72h. Tras este tiempo las células se recogieron y los pigmentos fueron extraídos con acetona caliente al 80%, y el contenido en fitoeno (■) y en β -caroteno (□) se cuantificó por HPLC.

La mayor concentración de fitoeno se obtuvo para concentraciones de norflurazón de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Para esta concentración de herbicida la concentración de fitoeno se incrementó desde prácticamente 0 hasta $270 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo, mientras que la cantidad de β -caroteno acumulado que observamos era de $150 \mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo, lo que supone tan solo el 5% del β -caroteno acumulado en las mismas condiciones nutricionales pero en ausencia de norflurazón.

1.3. EFECTO DEL NORFLURAZÓN SOBRE EL PERFIL DE PIGMENTOS DE *Dunaliella bardawil*

Tras determinar la concentración óptima de norflurazón para bloquear la ruta de la carotenogénesis sin afectar a la viabilidad celular, estudiamos como afecta la presencia de este herbicida a la evolución de la concentración intracelular de los principales carotenoides. El perfil de pigmentos de estas células cultivadas sin nitrógeno y en presencia de norflurazón fue comparado con el de células sometidas a carencia de nitrógeno sin inhibidor, y con el de células cultivadas en condiciones estándar con nitrato 10 mM como fuente de nitrógeno (Fig.25). Los carotenoides fueron cuantificados por cromatografía líquida (Fig.26).

En los cultivos de *D. bardawil* con nitrato, la concentración de los principales carotenoides aumenta gradualmente al igual que el contenido en clorofila, según aumenta el número de células del cultivo. La carencia de nitrógeno detiene el aumento de clorofila e induce de forma importante la producción de β -caroteno, cuyo contenido se triplica en relación a las células cultivadas en condiciones estándar. En cuanto a las células cultivadas en carencia de nitrógeno y en presencia de norflurazón, puede observarse un gran aumento del contenido intracelular de fitoeno, que llega a alcanzar valores de 270 mg l^{-1} mientras, como es lógico, la producción de la mayoría de los carotenoides que se sintetizan a partir de fitoeno, como luteína y violaxantina se detiene por completo. La zeaxantina es el único carotenoide cuyo contenido aumenta en estas condiciones, ya que se sintetiza a expensas de la violaxantina cuya concentración disminuye, confirmando el papel del ciclo de la violaxantina en condiciones de estrés.

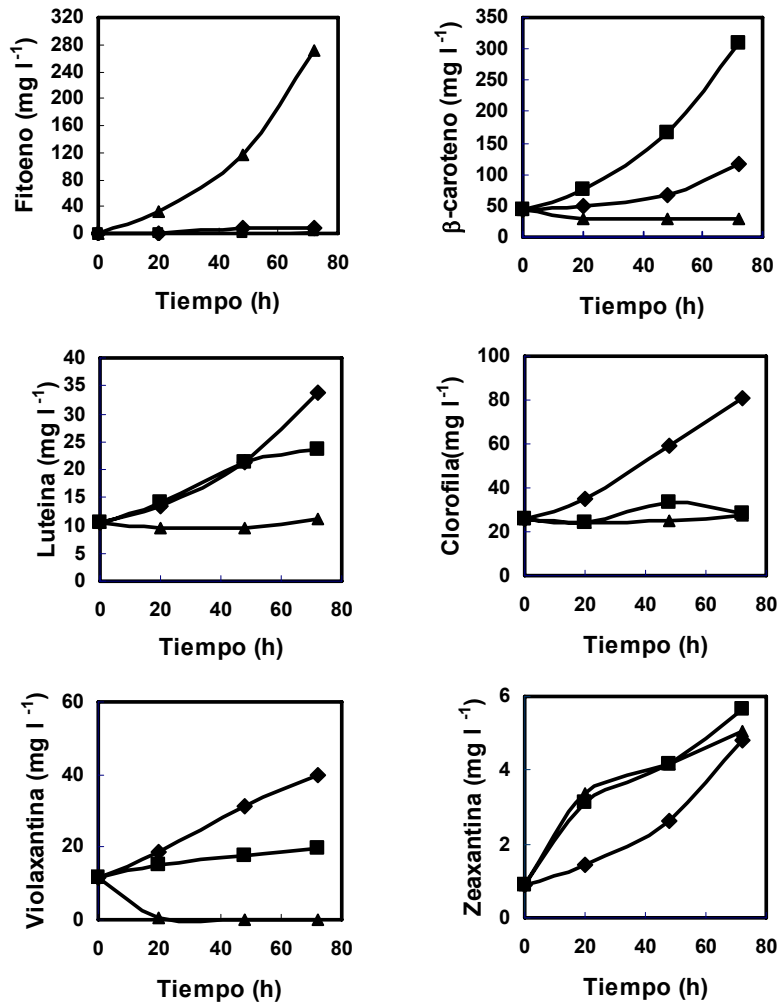


Fig. 25. Evolución del contenido de carotenoides y clorofila en *Dunaliella bardawil*. Las células de *D. bardawil* fueron cultivadas en condiciones estándar con nitrato 10 mM como fuente de nitrógeno (◆), en carencia de nitrógeno (■) y en carencia de nitrógeno y presencia de norflurazón ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) (▲). Los pigmentos se midieron en cromatografía líquida.

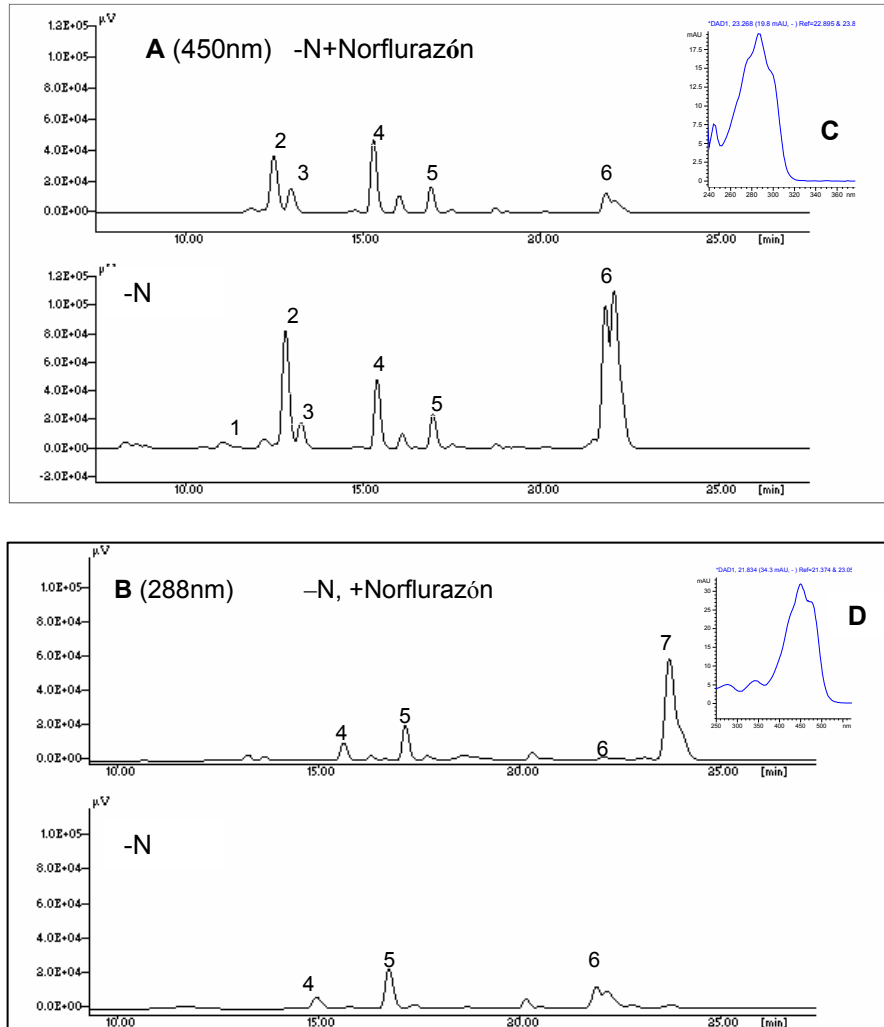


Fig.26. Cromatograma donde se muestra el perfil de pigmentos de las células de *Dunaliella bardawil* cultivadas en distintas condiciones. Cromatogramas a 450 nm (A) y a 288 nm (B) de los pigmentos extraídos de células de *D. bardawil* cultivadas en carencia de nitrógeno con y sin norflurazón. Las condiciones para la separación cromatográfica de los pigmentos se describen en Materiales y Métodos. Los picos identificados fueron: violaxantina (1), luteína (2), zeaxantina (3), clorofila b (4); clorofila a (5); β -caroteno (6) y fitoeno (7). C y D representan los espectros de absorción registrados con el detector diodo array para el β -caroteno y fitoeno respectivamente.

1.3.1. Producción de fitoeno por células de *Dunaliella bardawil* sometidas a carencia de nitrógeno en presencia del herbicida norflurazón

El hecho de que el herbicida norflurazón produzca una importante inhibición de la fitoeno desaturasa puede ser útil para la producción biotecnológica de fitoeno, ya que el 90% de la concentración molar de β -caroteno que la célula acumula en carencia de nitrógeno, se acumula en forma de fitoeno en presencia de este herbicida. La figura 27 muestra la evolución en el tiempo de los carotenoides β -caroteno y fitoeno en cultivos carentes de fuente de nitrógeno con y sin norflurazón. La producción de fitoeno se mantiene después de 72 horas de cultivo, con una velocidad de producción de $3,75 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, alcanzando unos 270 mg l^{-1} de cultivo al cabo de 72 horas. Esta concentración es notablemente más alta que la observada en células mutantes de *D. salina* seleccionadas tras mutagénesis química en base a su capacidad para acumular fitoeno (Ben-Amotz, 2002). Las estirpes seleccionadas por el grupo del Dr. Ben-Amotz alcanzaban una producción próxima de 10 mg l^{-1} cuando se cultivaban a gran escala en tanques al aire libre. Aunque la continua adición del inhibidor tiene un alto coste añadido, los altos niveles de fitoeno obtenido son muy prometedores. La producción continua alternando ciclos productivos sin nitrógeno y con norflurazón, y ciclos de recuperación con nitrato, es una posibilidad interesante.

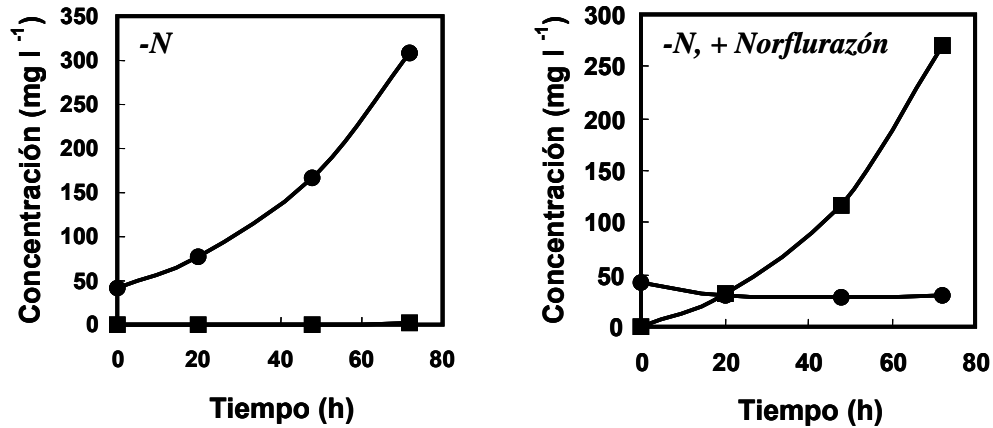


Fig.27. Producción de fitoeno por células de *Dunaliella bardawil* sometidas a carencia de nitrógeno en presencia del herbicida norflurazón. Evolución a lo largo del tiempo del contenido en fitoeno (■) y β -caroteno (●) de células de *D. bardawil* cultivadas durante 72 horas en carencia de nitrógeno con y sin norflurazón

1.4. SUCEPTIBILIDAD DE CÉLULAS DE *Dunaliella bardawil* TRATADAS CON NORFLUZARÓN EN CONDICIONES FOTOOXIDATIVAS

La capacidad de las células de *D. bardawil* con alto contenido de fitoeno, para sobrevivir a altas intensidades de luz y a moderadas radiaciones de luz ultravioleta B (UVB) es esencial para definir las condiciones más adecuadas de fotoproducción de carotenoides en esta microalga. Hemos comparado la capacidad del β -caroteno y del fitoeno para la protección "in vivo" de células de *D. bardawil* sometidas a daño oxidativo como consecuencia de la exposición a elevadas intensidades de luz o a luz UVB. Para ello incubamos células de *D. bardawil* durante 24 horas con y sin norflurazón, obteniendo de este modo células de *D. bardawil* con altos contenidos en los carotenoides β -caroteno y fitoeno. Tras este tiempo, los cultivos se repartieron en matraces erlenmeyer de 0,5 l y fueron iluminados con lámparas halógenas regulables a intensidades luminosas crecientes durante 30 minutos. Los matraces se sumergieron en un baño

termostatzado de cristal conectado a un refrigerador circular para mantener la temperatura de los cultivos constante a 25 °C. La intensidad de luz se midió con un foto-radiometro delta OHM quantum equipado con una sensor para luz PAR. Transcurrido este tiempo medimos su actividad fotosintética.

La actividad fotosintética en las células tratadas con norflurazón disminuyó dramáticamente con intensidades de luz blanca de 400 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ o superiores (Fig. 28), mientras que la capacidad fotosintética de las células control permanecía constante al menos hasta una irradiancia de 1.200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el caso de la luz UV, a 1.400 mW m^{-2} la actividad fotosintética de células tratadas con norflurazón se redujo un 20% respecto a las células no irradiadas, mientras que las células no tratadas mostraban sólo una leve reducción, llegando a alcanzar el 90% de la capacidad fotosintética de las células no irradiadas.

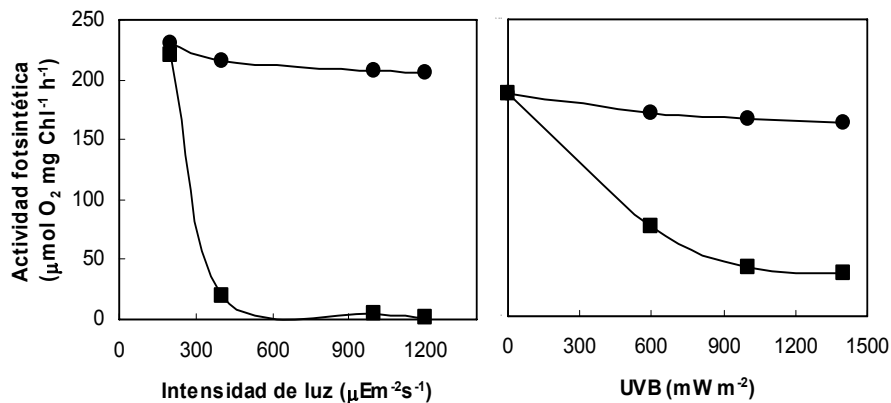


Fig.28. Efecto de la intensidad de luz visible (A) y de la luz UVB (B) en la actividad fotosintética de células control y de células de *Dunaliella bardawil* tratadas con norflurazón. Las células se cultivaron con (■) y sin norflurazón (●) y con irradiación estándar ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz blanca). Tras 24 horas de cultivo en estas condiciones, se obtuvieron cultivos ricos en β -caroteno (●) y fitoeno (■). Estos cultivos fueron expuestos durante 30 minutos a luz blanca de intensidades crecientes desde 150 a $1.200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (A) o luz UVB en intensidades crecientes desde 0 a 1.400mW m^{-2} (B). La actividad fotosintética fue determinada tras ese tiempo de exposición.

1.5. DISCUSIÓN

Son muchos los factores que favorecen la acumulación de carotenoides en microalgas y otros microorganismos. Se pueden agrupar en factores ambientales, como calidad e intensidad de luz (Loeblich 1982; Ben-Amotz 1987) y temperatura (Ben-Amotz 1996; Orset y Young 2000), y en factores nutricionales como compuestos químicos (Govind *et al* 1982), sales (Borowitzka y Borowitzka 1990) y limitaciones de nutrientes (Mil'ko 1963, Ben-Amotz y Avron 1983; Ben-Amotz 1987; Phadwal y Singh 2003). Tras estudiar el efecto combinado de algunos de estos factores, concluimos que la aplicación de condiciones de estrés fisiológico, junto con inhibidores de la ruta de carotenogénesis en células de *Dunaliella bardawil* constituye un buen método para inducir la acumulación de carotenoides de los deseados.

La fotooxidación ocurre cuando la energía absorbida de la luz por el aparato fotosintético excede su capacidad para la disipación de ésta mediante reacciones fotoquímicas y/o mecanismos de protección (“*quenching*”). Este exceso de energía causa la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres que pueden dañar las estructuras fotosintéticas. Las células fotosintéticas cuentan con enzimas específicas especializadas en la eliminación de especies tóxicas, y con los carotenoides, cuyo papel en la protección de los fotosistemas está bien descrito (Niyogi 1999). Niyogi y colaboradores (1997) demostraron que varios carotenoides y xantofilas pueden asumir este papel fotoprotector en microalgas. Pero tras nuestro resultados, podemos concluir que el fitoeno, carotenoide incoloro, no es tan eficiente en este papel como los carotenoides coloreados.

Existe una gran polémica a cerca de los mecanismos exactos de fotoprotección por parte de los carotenoides. Algunos estudios apoyan la idea de que los carotenoides actúan como una pantalla, absorbiendo el exceso de radiación (Benz-Amontz *et al* 1987). Otros autores apoyan la idea de que protegen el aparato fotosintético secuestrando los radicales libres de oxígeno

generados por la fotooxidación (Niyogi, 1999). Tras nuestros estudios, llegamos a la conclusión de que las células de *D. bardawil* ricas en β -caroteno, con una capacidad para absorber luz UV muy similar a la del fitoeno, tienen una mejor protección frente a la radiación UV que las células con niveles equivalentes de fitoeno. Esto indica que la capacidad antioxidante del β -caroteno, más que su poder apantallante, debe jugar un papel importante en la fotoprotección. La pérdida del β -caroteno en células de *D. bardawil* tratadas con norflurazón, hace que estas células sean particularmente sensibles a altas intensidades de luz y a radiaciones de luz UV, tal y como se ha descrito en mutantes deficientes en carotenoides en numerosas plantas y en algas (Baroli y Niyogi 2000; Rossel *et al.*, 2004). La fotosensibilidad de las células de *D. bardawil* que carecen de β -caroteno, nos impide el uso de altas intensidades de luz como estimuladores de la ruta de carotenogénesis. Concluimos que el fitoeno no es tan eficiente como fotoprotector, en células de *D. bardawil*, como sus carotenoides derivados.

El ciclo de las xantofilas bien descrito en plantas y algas (Yamamoto, 1979; Hager, 1980), es un proceso flexible que responde no sólo a las condiciones lumínicas (fluctuaciones diurnas, insolaciones puntuales o transiciones sol-sombra) sino también a otros factores ambientales como las temperaturas extremas, el déficit hídrico o la disponibilidad de nutrientes (Demmig-Adams *et al.* 1996). Tras su activación, la enzima violaxantina de-époxidasa es la encargada de transformar el diepóxido violaxantina en zeaxantina deepoxidada a través del intermediario monoepoxidado anteraxantina (Fig. 29). En cada paso la violaxantina pierde uno de los dos grupos epoxi que posee en cada uno sus anillos. Esto implica un alargamiento del sistema de dobles enlaces conjugados pasando de 9 en violaxantina a 10 en anteraxantina y 11 en zeaxantina. En condiciones óptimas de crecimiento, la ruta se produce a la inversa, sintetizándose violaxantina a partir de zeaxantina (Demmig-Adams 1996). Este fenómeno explica el perfil de pigmentos obtenido en el apartado 1.3 de este capítulo, donde el incremento en los niveles de zeaxantina, en células cultivadas en carencia de nitrógeno y con norflurazón, se ve justificado por la activación de este ciclo. Está bien descrito el papel de las xantofilas en la fotoprotección en plantas superiores y algas (Niyogi, 1999), destacando la zeaxantina, cuya actividad como antioxidante este demostrada en

Chlamydomonas reinhardtii (Baroli *et al.*, 2003a y b), en bacterias no fotosintéticas (Tatsuzawa *et al.*, 2000) y hongos (Schroeder y Jonson, 1995), activándose en la célula mecanismos para la síntesis de zeaxantina, ante cualquier situación de estrés.

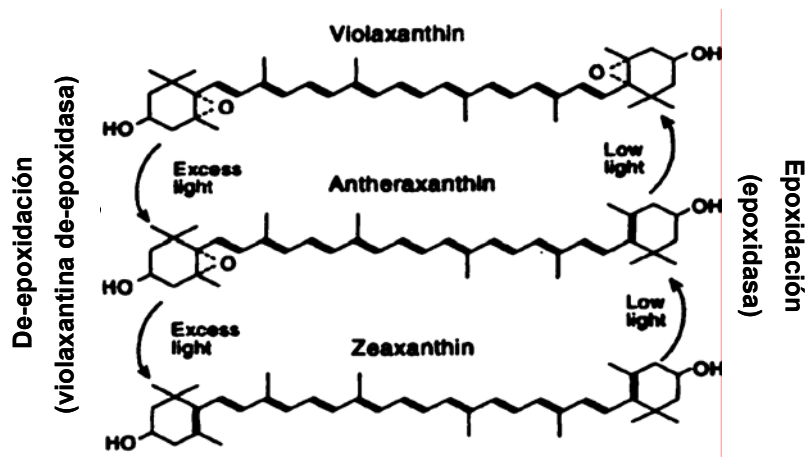


Fig.29. Ciclo de las xantofilas. En células sometidas a situaciones de foto estrés, se activa el ciclo de las xantofilas para la síntesis de zeaxantina a partir de violaxantina. La enzima violaxantina de-epoxidasa cataliza la conversión de violaxantina en zeaxantina, mientras que la enzima epoxidasa cataliza la reacción inversa.

2. Construcción de vectores de expresión para *Chlamydomonas reinhardtii*

Un vector es todo plásmido, cósmido o fago, que nos permite incluir un gen de interés dentro de la célula hospedadora, junto a secuencias que aseguran su replicación, y en ocasiones, su expresión dentro de la misma. Los vectores de clonación son utilizados para la multiplicación del gen de interés y su conservación en la población de células hijas derivadas de la célula hospedadora inicial. Deben poseer uno o varios sitios de restricción, únicos para las principales endonucleasas que permitan la clonación de insertos de DNA; marcadores genéticos de selección, que permitan diferenciar qué células han incorporado el vector y cuáles no; y un origen de replicación, que es el sitio de unión de la DNA polimerasa. Por su parte, los vectores de expresión, además de todos los elementos propios de un vector de clonación, poseen otros, que posibilitan la expresión del gen; entre ellos, un promotor específico que permite la transcripción del mismo por la RNA polimerasa del hospedador. Además, como en la mayoría de los casos el producto de interés es una proteína, el vector también ha de contar con secuencias que posibiliten la traducción del RNA generado.

En este trabajo hemos obtenido nuevos vectores de expresión para *C. reinhardtii*, basados en algunos de los plásmidos ya existentes; el pSI104PLK en el que una región polilinker (PLK) se encuentra flanqueada por las regiones promotoras y terminadoras del gen de la subunidad pequeña de la rubisco; el pSI105, que incluye además un gen marcador flanqueado por las correspondiente regiones promotoras y terminadoras; y el pSI104PLKpNia1 en el que el promotor regulable de la nitrato reductasa precede a una región PLK y nos permite la expresión regulada de genes exógenos.

Para la obtención de estas construcciones hemos hecho uso de los promotores y genes marcadores que se resumen a continuación (Tabla V).

Tabla V. Promotores y genes marcadores utilizados en construcciones para vectores de expresión para microalgas

Promotor	Procedencia
RbcS2 (subunidad pequeña de la rubisco)	<i>Chlamydomonas</i>
Nia1 (Nitrato reductasa)	<i>Chlamydomonas</i>
Gen marcador/Resistencia	Procedencia
<i>AphVIII</i> /Paromomicina y derivados	<i>Streptomyces rimosus</i>
<i>Ble</i> /Talisomicina y derivados	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>

2.1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pSI104PLK

El vector pSI104PLK es una modificación del plásmido pSI103 (Sizova *et al.*, 2001). Ha sido obtenido en colaboración con el Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba. La modificación se basa en la sustitución del gen *AphVIII* por una región con múltiples sitios de clonaje o región polilinker (PLK).

Con este objetivo, se eliminó el fragmento *NotI/NotI* del plásmido pSI103, eliminando así sitios de corte no deseados. El fragmento *BstBI/BamHI* que contiene el gen *AphVIII* de resistencia a paromomicina se sustituyó por la región polilinker que había sido aislada por PCR a partir del plásmido pBluescript.

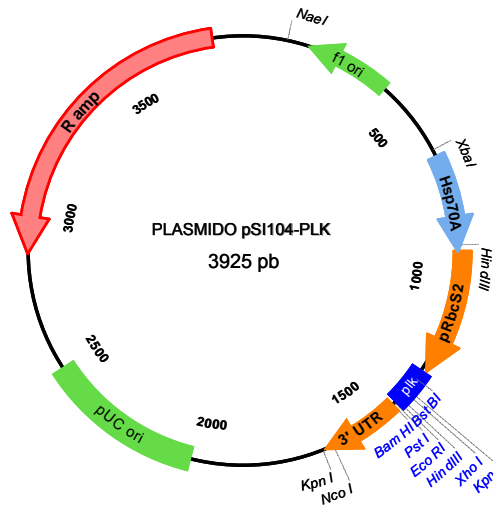


Fig. 30. Diagrama del plásmido pSI104PLK: vector de expresión para microalgas. *pRbcs2*: promotor (constitutivo) de la subunidad pequeña del gen de la rubisco; *Hsp70A*: promotor de la chaperona de la familia heat Shock protein; PLK: región de múltiple clonaje; 3'UTR: región terminadora de la subunidad pequeña del gen de la rubisco; pUC ori: origen de replicación en bacteria; R_amp: gen marcador en bacterias, que confiere resistencia a ampicilina; f1 ori: origen de replicación en virus.

Este vector (Fig.30) nos permite insertar fácilmente genes exógenos en la región PLK, para su expresión en *Chlamydomonas*, bajo el control del promotor del gen de la subunidad pequeña de la rubisco, unido al promotor de una chaperona de la familia Hsp70A (Schroda 2004). Carece de gen marcador por lo que en todas las transformaciones debe ir acompañado de otro plásmido con algún gen marcador, suponiendo una disminución de la eficiencia de la transformación. Esto nos ha llevado a abordar la construcción de un nuevo plásmido, el pSI105, en el que el gen marcador y la región PLK se incluyan dentro de una misma construcción.

2.2. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPESIÓN pSI105

Una de las dificultades para expresar genes heterólogos en microalgas, es la selección de transformantes. La cotransformación con dos plásmidos diferentes, uno de los cuales contenga un gen marcador, supondría la solución, aunque la frecuencia de expresión de ambos genes suele ser reducida, en algunos casos alrededor del 10% (Kindle 1998; Stevens *et al.*, 1996). La eficiencia de la transformación se ve incrementada notablemente cuando los dos genes se encuentran en la misma construcción, y si ésta es relativamente pequeña (Lohuis y Miller 1998; Fuhrmann *et al.*, 1999). Para la construcción del plásmido pSI105, nos basamos en el vector pSI103, descrito en Materiales y Métodos.

Amplificamos el cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* a partir del plásmido pSI103, cedido amablemente por el Dr. E. Fernández de la Universidad de Córdoba. Se diseñaron cebadores que incluyesen los sitios de corte para *NaeI* y *XbaI*: for-*AphVIII-NaeI* (5'-CGCGCCGGCTTGACATGATTGGTG-3') y rev-*AphVIII-XbaI* (5'-CACTCTAGACTTCCGGCTCGTATG-3'). Las condiciones para la PCR fueron: 96 °C, 3 minutos; 29X (desnaturalización a 96 °C, 30 segundos; hibridación de los cebadores a 54 °C, 30 segundos; elongación a 72 °C, 1,30 minutos); 72 °C, 5 minutos. El amplicón era de 1.932 pb (Fig.31).

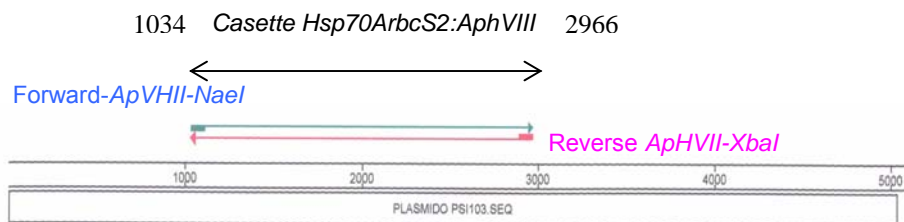


Fig.31. Cebadores diseñados para amplificar el cassette *Hsp70ArbcS2:AphVIII*. Cebadores forward-*AphVIII-NaeI* y reverse-*AphVIII-XbaI*, diseñados para amplificar el cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* a partir del plásmido pSI103.

El resultado de la PCR se visualizó electroforéticamente en un gel de agarosa (Fig.32). La banda de 1,9 kb correspondiente al cassette se aisló, se purificó, y se comprobó mediante restricción con la enzima *BstI* (Fig.33).

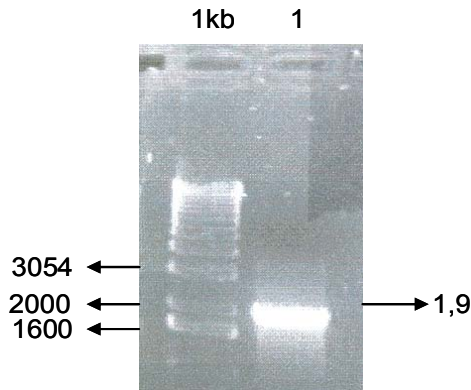


Fig.32. Amplificación del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* por PCR. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualiza la banda obtenida por PCR, con los cebadores forward-*AphVIII-NaeI* y reverse-*AphVIII-XbaI* a partir de plásmido pSI103. 1kb, marcador de peso molecular. 1: banda de 1,9 kb correspondiente al cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* amplificado.

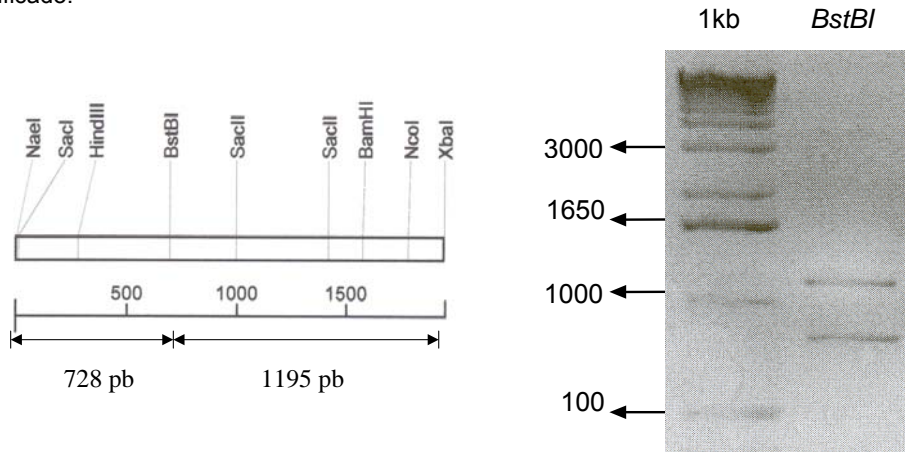


Fig.33. Mapa de restricción y electroforesis de la digestión del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*. Mapa de restricción y resultado de la digestión del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* con la endonucleasa *BstBI*. Las bandas visualizadas en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio corresponden con los tamaños indicados en el mapa de restricción.

El *cassette Hsp70A:rbcS2:AphVIII* se ligó al vector de clonación comercial pGEM-T, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante, y con el resultado de la ligación, el vector pGEM-T-*AphVIII*, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . Se aisló el DNA plasmídico de 5 de las colonias blancas obtenidas, elegidas al azar, y mediante restricción se comprobó la construcción. Las 5 colonias resultaron positivas, una de ellas se cultivó en LB líquido con ampicilina 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, y se conservó a -80 °C en glicerol al 15%.

2.2.1. Clonación del *cassette Hsp70A:rbcS2:AphVIII* en el vector pSI104PLK

La región *NaeI/XbaI* de 538 pb, del plásmido pSI104PLK fue eliminada, y sustituida por el *cassette Hsp70A:rbcS2:AphVIII* aislado del plásmido pGEM-T-*AphVIII* con las mismas enzimas. El nuevo plásmido, pSI105, fue clonado en células competentes de *E. coli* DH5 α . Las colonias obtenidas se verificaron por restricción con *EcoRI* y *BamHI* (Fig.34).

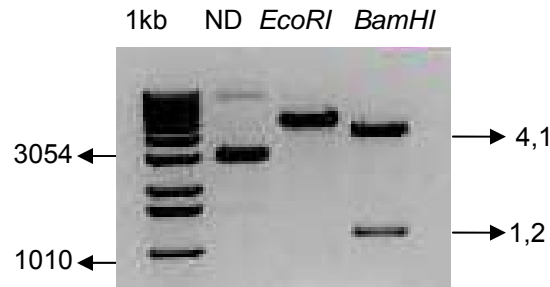


Fig.34. Digestión del plásmido pSI105 para la clonación del *cassette Hsp70A:rbcS2:AphVIII*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas obtenidas de la digestión del plásmido pSI105, aislado de células competentes de *E. coli* DH5 α , con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. 1kb: marcador de peso molecular; ND: plásmido pSI105 sin digerir.

En la figura 34 se observa el patrón de digestión típico del plásmido pSI105, obtenido de una de las colonias positivas, con *EcoRI*, para la que sólo

presenta un sitio de corte, y con *Bam*HI, para la que presenta dos sitios de corte que distan 1,2 kb. El resultado final es el vector de expresión con el gen de resistencia a paromomicina como marcador y una región polilinker (Fig.35), ambos flanqueados por las regiones promotoras y terminadoras de la subunidad pequeña de la rubisco.

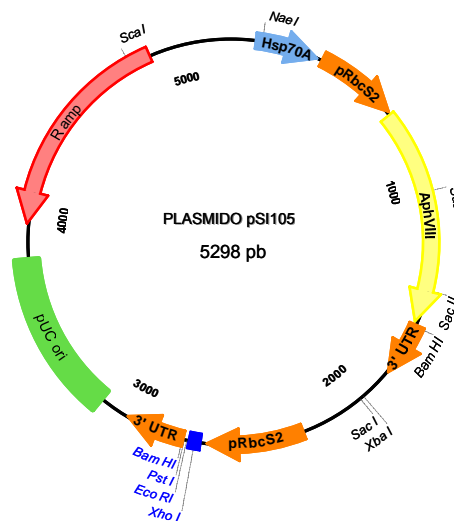


Fig.35. Diagrama del plásmido pSI105: vector de expresión para microalgas. *pRbcS2*: promotor (constitutivo) de la subunidad grande de la rubisco; *Hsp70A*: chaperona de la familia Hsp70A (Heat Shock protein); *AphVIII*: gen marcador que confiere resistencia a paromomicina; 3'UTR: región terminadora de la subunidad grande de la rubisco; PLK: región polilinker; pUc origing: origen de replicación en bacteria; Ramp: gen marcador que confiere resistencia a ampicilina.

2.3. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DEL VECTOR pSI105

Para comprobar la funcionalidad del vector pSI105, y comprobar como mejora la eficiencia de la transformación con dos genes, si estos se encuentran en la misma construcción, subclonamos el gen *Ble*, que confiere resistencia al antibiótico bleomicina, en el recién obtenido, vector de expresión pSI105, resultando el nuevo vector pSI105-*Ble*.

2.3.1. Aislamiento del gen *Ble*

El gen *Ble* procedente de la especie de actinomicetos *Streptoalloteichus hindustanus*, codifica una pequeña proteína de 13,7 KDa que confiere resistencia al antibiótico talisomicina y sus derivados, como la bleomicina o la zeomicina.

Un fragmento de 1.008 pb que incluye el gen *Ble* fue amplificado por PCR a partir del plásmido pSP124S descrito en Materiales y Métodos (Stevens *et al.*, 1996). Con este objetivo se diseñaron cebadores que incluyesen sitios de corte para *XhoI* y *PstI*: for-*Ble-XhoI* (5'-AGCGGTGCCCTCCAGATAAAC-3'), y rev-*Ble-PstI* (5'-CAGCCCGCCCCTGCAGAAAGAG-3'). Las condiciones para la PCR fueron: 96 °C, 3 minutos; 29X (desnaturalización a 96 °C, 30 segundos; hibridación de los cebadores a 51 °C, 30 segundos; elongación a 72 °C, 1,30 minutos); 72 °C, 5 minutos. El fragmento amplificado se purificó y se subclonó en el vector comercial pGEM-T siguiendo las instrucciones del fabricante. Transformamos células competentes de *E. coli* DH5 α con el plásmido pGEM-T-*Ble*. Aislamos el DNA de las colonias blancas resultantes y lo digerimos con las enzimas de restricción *PstI* y *XhoI* para verificar la construcción. El resultado de la digestión lo visualizamos por electroforesis en gel de agarosa (Fig.36).

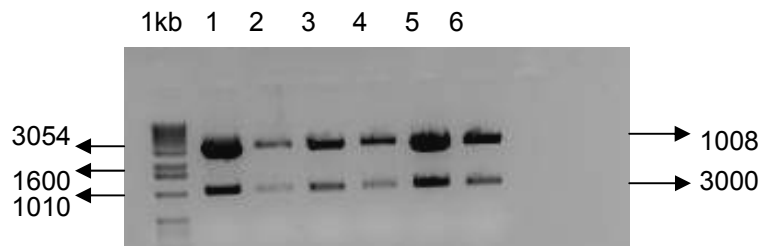


Fig.36. Comprobación por restricción de las colonias transformadas con el plásmido pGEM-T-*Ble*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas resultado de la digestión, con *XhoI* y *PstI*, del plásmido aislado de las colonias blancas obtenidas de la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α con el plásmido pGEM-T-*Ble*. 1kb: marcador de peso molecular. 1, 2, 3, 4, 5: DNA plasmídico de las distintas colonias analizadas.

En las 6 colonias analizadas se observó el patrón de bandas esperado; una banda de 1.008 pb correspondiente al gen *Ble*, y otra de 3000 pb correspondiente al pGEM-T.

2.3.2. Clonación del gen *Ble* en el vector pSI105

Aislamos la banda de una de las colonias analizadas, se purificó y se digirió con las endonucleasas *XhoI* y *PstI*. Paralelamente digerimos el plásmido pSI105 con las mismas enzimas. Los fragmentos de 1.008 pb correspondientes al gen *Ble* y de 5.263 pb correspondiente al plásmido pSI105 linearizado, se incubaron toda la noche a 16 °C en presencia de ligasa T4. La ligación fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Varias de las colonias obtenidas se analizaron por restricción (Fig.37) con las enzima *PstI* y *XhoI*.

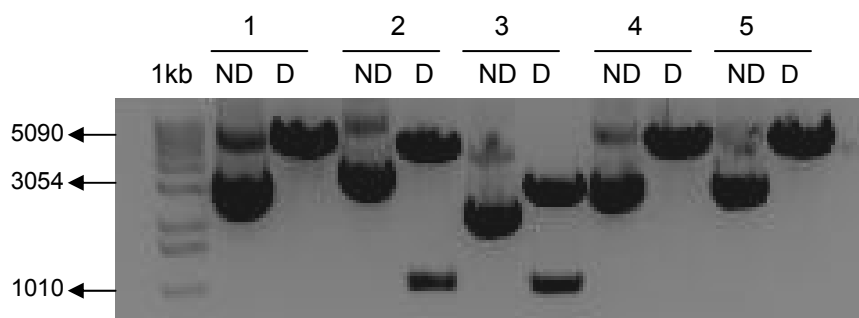


Fig. 37. Comprobación por restricción de las colonias transformadas con el plásmido pSI105-*Ble*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas resultantes de la digestión del DNA plasmídico aislado de las colonias obtenidas de la transformación de *E. coli* DH5 α con el plásmido pSI105-*Ble*. 1kb: marcador de peso molecular; ND: plásmido no digerido; D: plásmido digerido con las enzimas *PstI* y *XhoI*; 1, 2, 3, 4, 5: colonias analizadas.

De las 5 colonias analizadas al azar, dos de ellas mostraban el patrón de bandas esperado, colonia 2 y 3. Seleccionamos la colonia 2, se cultivó en LB con ampicilina 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, y se conservó a -80 °C en glicerol a 15%.

2.3.3. Estudio de sensibilidad a bleomicina

Realizamos un estudio de sensibilidad a la bleomicina para células de *C. reinhardtii*. Estudiamos concentraciones de 5, 10, 15 y 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Se tomaron 100 ml de un cultivo de *C. reinhardtii* que se encontraba en fase exponencial de crecimiento y se concentró 100 veces (100X) mediante centrifugación. Se prepararon placas de medio TAP al 1% de agar con las concentraciones indicadas del antibiótico, y sobre cada placa se inoculó una gota de 50 μl del cultivo 100X. Las placas se dejaron en la cámara de cultivo (25 °C, 150 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) durante 72 horas, realizándose registros cada 24 horas. Todas estas concentraciones resultaron letales a lo largo de ese tiempo (Tabla VI).

Tabla VI. Estudio de sensibilidad de células de *Chlamydomonas reinhardtii* al antibiótico bleomicina

Ble ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	24 h	48 h	72 h
20	-	-	-
15	+	-	-
10	+	+	-
5	+	+	-

Toxicidad del antibiótico bleomicina. Se tomaron 100 ml de un cultivo de células de *C. reinhardtii* concentrado 100 veces y se inoculó una gota de 50 μl en placas de medio TAP con agar al 1% y cantidades crecientes del antibiótico. 20, 15, 10 y 5 representan las concentraciones del antibiótico ensayado, en $\mu\text{g ml}^{-1}$. 24, 48 y 72 representan los tiempos del ensayo, en horas. El símbolo (+) indica resistencia, mientras que el (-) indica sensibilidad o muerte.

Seleccionamos la menor concentración de bleomicina capaz de inhibir el crecimiento de *C. reinhardtii*, para posteriores estudios. Durante el desarrollo de estos estudios, observamos que la presencia simultánea de otro antibiótico, como la paromomicina, potenciaba la toxicidad de la bleomicina.

2.3.4. Comparación de la eficiencia entre transformación y cotransformación.

Para estudiar el porcentaje de microalgas que adquieren resistencia a los antibióticos bleomicina (fenotipo codificado por el gen *Ble*) y paromomicina (fenotipo codificado por el gen *AphVIII*) cuando estos genes se encuentran en un mismo plásmido o en plásmidos diferentes, procedimos a transformar *C. reinhardtii* con: (A) el plásmido pSI105-*Ble* (con dos genes marcadores, *Ble* y *AphVIII*) y (B) el plásmido pSI103 (con el gen *AphVIII*) y el pSP124S (con el gen *Ble*).

Las células resultantes de estas transformaciones se seleccionaron en bleomicina 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (*Ble* 5), resultando de esta primera selección unos 450 transformantes por placa en ambos casos; 100 de las colonias obtenidas, transformadas con pSI105-*Ble* o cotransformadas con pSI103+pSP124S, que mostraban resistencia a bleomicina, se subcultivaron en placas con paromomicina 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (P30). Después de 5 días de cultivo en condiciones estándar, las colonias se traspasaron a placas con ambos antibióticos. La tasa de supervivencia nos permitió estimar el porcentaje de transformantes que habían incorporado en su genoma y expresado, los dos genes marcadores. El porcentaje de supervivencia fue mayor en el caso de la transformación con pSI105-*Ble*, 24%, tal y como esperábamos (Kindle 1998; Stevens *et al.*, 1996), mientras que tan sólo un 8% de las colonias cotransformadas con pSI103 y pSP124S sobrevivieron (Fig.38).

A. Transformación con pSI105-Ble **B. Cotransformación con pSI103 + pSP124S**

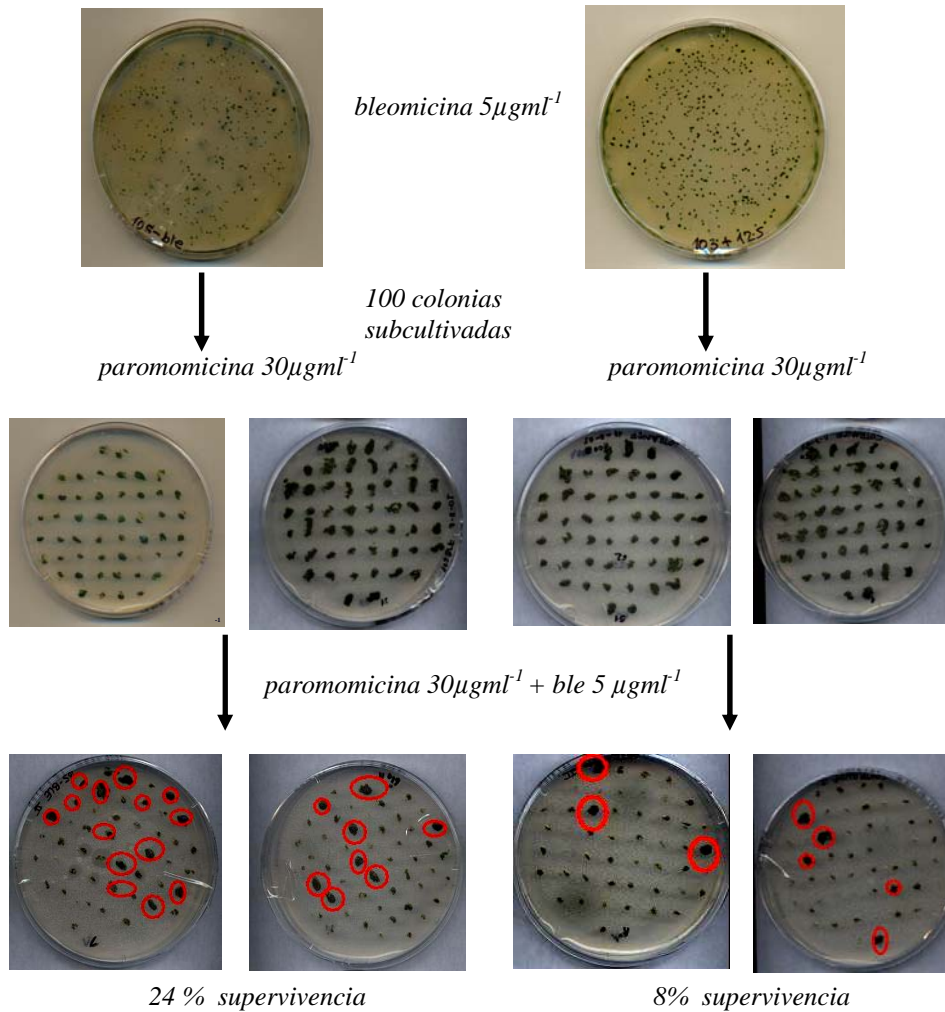


Fig.38. Comparación de la eficiencia entre la transformación con pSI105-Ble (A) y la cotransformación con pSI103+pSP124S (B). Células de *C. reinhardtii* transformadas con el plásmido pSI105-Ble (A) o cotransformadas con los plásmidos pSI103+pSP124S (B) fueron seleccionadas en primer lugar con bleomicina (5 µg ml⁻¹). 100 de estas colonias se subcultivaron en presencia paromomicina (30 µg ml⁻¹) y las que sobrevivieron se cultivaron en presencia de ambos antibióticos. Los círculos rojos indican las colonias con resistencia a ambos antibióticos.

2.4. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pSI104PLKpNia1

El uso de vectores diseñados bajo la expresión de un promotor constitutivo fuerte, como el promotor de la subunidad pequeña de la rubisco, *rbcS2*, usado hasta ahora, puede suponer un problema en aquellos casos en los que los efectos de las modificaciones genéticas fuesen letales, resultando imposible la obtención de transformantes. La alternativa a este problema es el uso de promotores inducibles que permiten la expresión de la construcción sólo cuando lo deseemos.

El promotor inducible pNia1 (Nitrato reductase gene) se reprime en presencia de amonio (NH_4^+), y se induce en ausencia de nitrato (NO_3^-) o nitrógeno en el medio de cultivo (Llamas *et al.*, 2002). Este promotor ha sido utilizado con éxito para dirigir genes reporteros en *Chlamydomonas*, como el de la arilsulfatasa. (González-Ballester *et al.*, 2005b; Ohresser *et al.*, 1997; Koblenz *et al.*, 2005). Para su aislamiento, digerimos el plásmido PBKs-pNia1, cedido amablemente por el Dr. Emilo Fernández de la Universidad de Córdoba, con las enzimas de restricción *EcoRI*, que presenta un único sitio de corte, y *XbaI* que presenta dos (Fig.39 y 40), obteniendo tres bandas de: 41pb *XbaI-EcoRI*, 1.015 pb *EcoRI-XbaI* y 5.314pb *XbaI-XbaI*. Aislamos y purificamos la banda de 1.015 pb, que corresponde al promotor, y la clonamos en el plásmido pSI104PLK digerido también con *EcoRI* y *XbaI* (Fig.40).

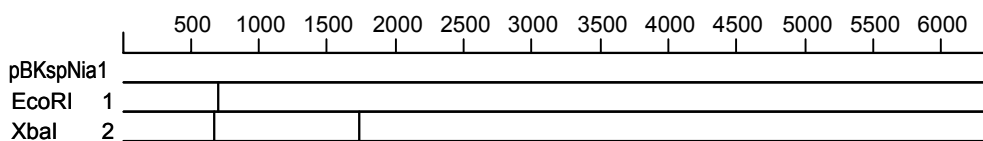


Fig. 39. Mapa de restricción del plásmido pBKs. Mapa de restricción del plásmido pBKs elaborado con el "MapDraw" del Dnastar, donde se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*.

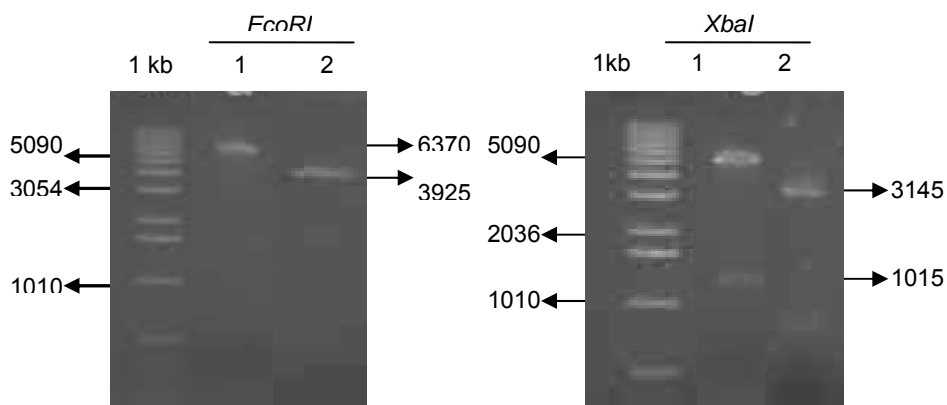


Fig.40. Digestión de los plásmido pBKs-pNia1 y pSI104PLK para la construcción del vector pSI104PLKpNia1. Gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas resultantes de la digestión del plásmido pBKs-pNia1 (1) y pSI104PKL (2) con *EcoR* y *XbaI*. 1 kb: marcador de peso molecular.

Las bandas de nuestro interés (1.015 y 3.145 pb) se aislaron, se purificaron y se ligaron. Con el resultado de la ligación transformamos células competentes de *E. coli* DH5 α . Analizamos las colonias obtenidas mediante restricción. El nuevo vector pSI104PLKpNia1 (Fig.41) presenta dos sitios de corte para la enzima *XhoI*, separados por 908 pb, y un sitio de corte para *EcoRI* (Fig. 42).

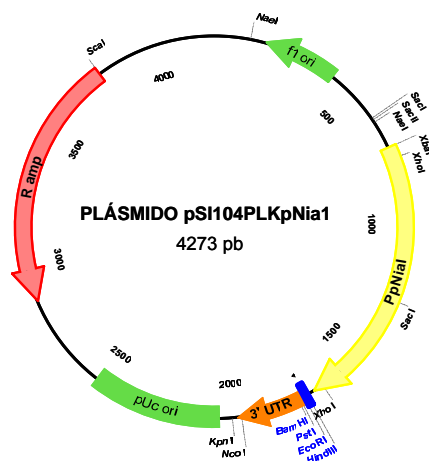


Fig.41. Diagrama del plásmido pSI104PLKpNia1 vector de expresión para microalgas. pNia1: promotor inducible de la nitrato reductasa; 3'UTR: región terminadora de la subunidad grande de la rubisco; PLK: región polilinker; pUc ori: origen de replicación en bacteria; Ramp: gen marcador que confiere resistencia a ampicilina; f1 ori: origen de replicación en virus.

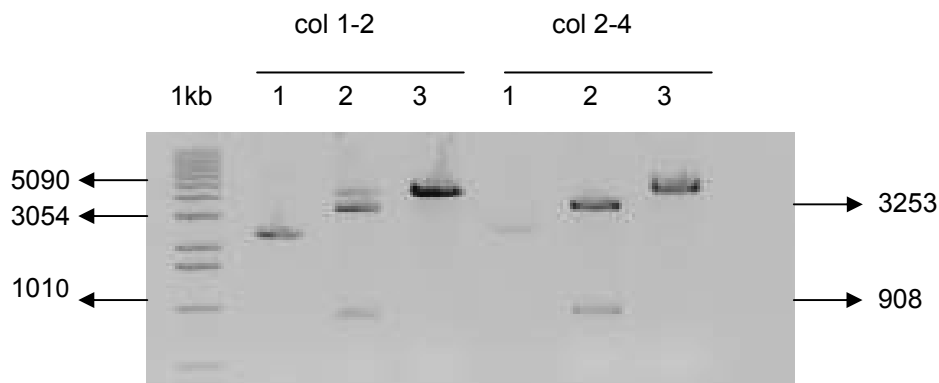


Fig.42. Comprobación por restricción de las colonias transformadas con el plásmido pSI104PLKpNia1 Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas obtenidas de la digestión, con las enzimas *XhoI* y *EcoRI*, del plásmido aislado de las colonias obtenidas de la transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α con el vector pSI104PLKpNia1. 1kb: marcador de peso molecular; 1: plásmido aislado sin digerir; 2; plásmido aislado digerido con *XhoI*; 3: plásmido aislado digerido con *EcoRI*; col 1-2 y 2-4 representan dos de las colonias, elegidas al azar.

Las colonias analizadas presentaron el patrón de bandas esperado que confirmaba que la construcción era buena. La colonia 2-4 se cultivó en LB con ampicilina $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, y se conservó a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ en glicerol a 15%.

2.5. DISCUSIÓN

Los vectores de expresión son esenciales en biología molecular. El diseño de vectores apropiados nos permite expresar genes exógenos en *Chlamydomonas*. La presencia de genes marcadores y genes reporteros es clave para la selección de transformantes. Durante muchos años, el único método establecido para la selección de microalgas transformadas era el uso de genes homólogos (Arg7, Nit1, Oee1 o AtpC) por complementación de mutantes específicos (Debuchy *et al.*, 1989). Un mutante defectuoso en el gen elegido era aislado y transformado con una copia funcional del gen requerido, procedente del mismo organismo. Pero esta estrategia no era aplicable a cepas silvestres o algas diploides como las diatomeas, que desarrollaban mutantes con ambos alelos del gen deficientes. Los marcadores más usados son los que confieren resistencia a antibióticos como bleomicina (*Ble*), estreptomycin (*aadA*) y paromomicina (*AphVIII*), y herbicidas como el gen *Acetolactato sintasa*, que confiere resistencia frente a la sulfonilurea (León *et al.*, 2004).

El uso del gen *AphVIII* (Sizova *et al.*, 2001; Llamas *et al.*, 2002) como marcador en *Chlamydomonas* está ampliamente descrito, al igual que el gen *Ble* (Stevens *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2003). Ambos genes marcadores han sido expresados eficientemente bajo el control de promotores constitutivos fuertes homólogos o promotores de especies muy cercanas (Dunahay *et al.*, 1995).

La elección de un promotor de fuerte actividad para conducir la expresión de genes marcadores y reporteros es un paso crítico en el desarrollo de una eficiente transformación, mientras que en el caso de estudios del nivel de expresión

de genes implicados en rutas metabólicas que han sido manipuladas, el diseño de vectores con promotores inducibles es de mayor utilidad.

La presencia de intrones es otro factor a tener en cuenta a la hora de diseñar un vector de expresión (Lumbreras *et al.*, 1998; Berthold *et al.*, 2002); el gen *Ble* y el *AphVIII*, bajo el promotor del gen de la *rubisco*, incrementan su expresión al introducir en su secuencia el primer intrón del gen de la subunidad pequeña de la *rubisco* (Kovar *et al.*, 2002), aunque no es un requisito para la expresión de genes (Auchincloss *et al.*, 1999). La unión al promotor de la chaperona *Hsp70A*, también ha demostrado ser un factor decisivo en el incremento de la eficiencia de la expresión de los transgenes (Schroda *et al.*, 2000).

La expresión de genes exógenos puede ser muy baja, y en ocasiones hasta inexistente, a pesar de la presencia de todos los elementos requeridos en la construcción para la transcripción. Cuando los transformantes obtenidos no se mantienen bajo las condiciones de selección, la expresión del gen exógeno puede llegar a desaparecer. Este silenciamiento ha sido atribuido a una variedad de mecanismos epigenéticos, similares a los observados en plantas y otras células eucariotas (Cerutti *et al.*, 1997; Wu-Scharf *et al.*, 2000).

En este trabajo, hemos podido comprobar, que efectivamente, la presencia de dos genes en el mismo vector mejora la eficiencia de la transformación respecto a la cotransformación con dos plásmidos (Lohuis y Millar 1998; Fuhrmann *et al.*, 1999; Berthold *et al.*, 2002), llegándose a triplicar en nuestro caso.

3. Silenciamiento génico en microalgas: aislamiento de transformantes con bajos niveles de expresión de la fitoeno desaturasa en *Chlamydomonas reinhardtii*.

3.1. ESTRATEGIA PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN DEL GEN *pds* EN *Chlamydomonas reinhardtii*

3.1.1. Fitoeno desaturasa

La fitoeno desaturasa (PDS) es una enzima asociada a membrana, de localización cloroplástica, que cataliza la conversión del carotenide incoloro fitoeno en fitoflueno, el cuál se convierte en ζ - caroteno y finalmente en licopeno, por actividad de las enzimas ζ -caroteno desaturasa (ZDS) y caroteno isomerasa (CrtIso). A partir del licopeno se forman el resto de carotenoides por reacciones de oxidación, hidroxilación o epoxidación (Fig.43).

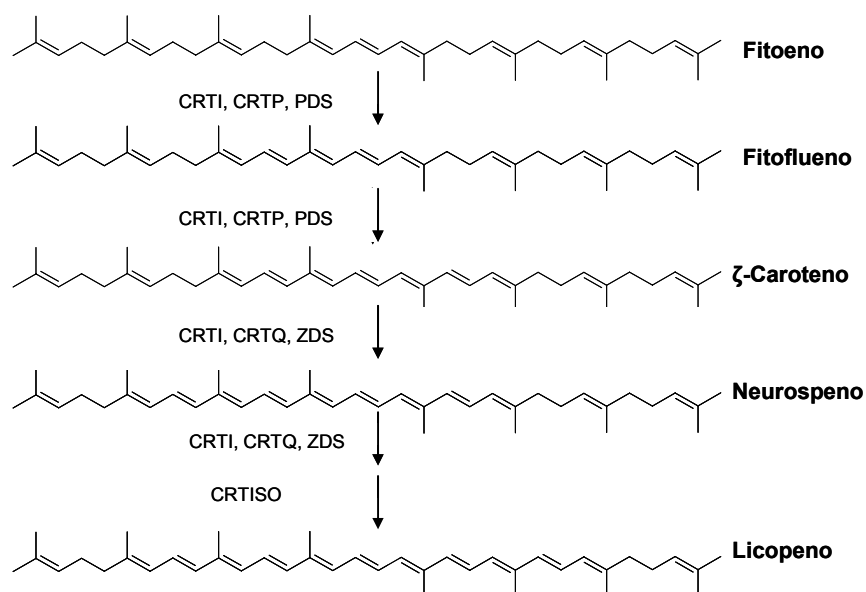


Fig.43. Ruta metabólica para la conversión de fitoeno en licopeno. CRTI: enzima fitoeno desaturasa en bacterias; CRTP: fitoeno desaturasa en cianobacterias; CRTQ: ζ -caroteno desaturasa en cianobacterias; PDS: fitoeno desaturasa en plantas o microalgas. ZDS: ζ - caroteno desaturasa en plantas o microalgas.

El carotenoide incoloro fitoeno, sufre cuatro desaturaciones secuenciales, catalizadas por dos enzimas en plantas y microalgas, fitoeno desaturasa (PDS) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS); siendo CRTP y CRTQ sus homólogas en cianobacterias respectivamente, mientras que en bacterias y hongos, el mismo resultado es llevado a cabo por una única enzima, CRTI (Cunningham y Gantt 1998).

Al estudiar la homología de algunas de las enzimas que participan en la ruta de carotenogénesis, entre distintas especies eucariotas y procariotas, encontramos una identidad del 79% y 75% entre la PDS de *C. reinhardtii* y la PDS de otras microalgas como *D. salina* y *H. pluvialis*. La similitud de la PDS de *C. reinhardtii* es también muy alta con la CRTP de cianobacterias como *Synechococcus sp* y *Prochlorococcus marinus*, con porcentajes de residuos idénticos del 68%, aunque el tamaño de las desaturasas de cianobacterias es significativamente menor. La presencia de una región conservada de unos 73 aminoácidos antes del inicio de la secuencia de la PDS de cianobacterias sugiere la posibilidad de que esta región N-terminal pudiera corresponder al péptido de tránsito (Fig. 44). Al comparar la secuencia de la PDS de *C. reinhardtii* con la PDS bacteriana de *Erwinia herbicola* (CRTI), la alineación se produce a partir de los primeros 76 aminoácidos de la PDS de *C. reinhardtii*, lo que apoya la teoría del péptido de tránsito, aunque la identidad es significativamente menor en este caso (36%).

<i>C. reinhardtii</i>	1	<u>MQTQVKPSSSRQANLVAKGASCPRVAVRRVAGRRALEVVARDYPRPAFETAETFOEAKAL</u>	60
<i>D. salina</i>	25RRVGRTRRLQVYARDFPAPQFDGTETYQEAVAL	57
<i>H. pluvialis</i>	1	<u>MQTTMRGQASGSGCTSGRQARG-HWSRRSVRREGALRVVAKDYPTPDFQSSDTYQEALSL</u>	59
<i>A. thaliana</i>	43KTRTRRRSTAGPLQVVCVDIPRPELENTVNFLEAASL	79
<i>Synechococcus</i>		
<i>P. marinus</i>		
<i>E. herbicola</i>		
		↓	
<i>C. reinhardtii</i>	61	<u>SSKLDAPRPAKPLKVVIAGAGLAGLSAAKYLSDAGHHPVILEGRDVLGGKVAAWKDEDG</u>	120
<i>D. salina</i>	58	<u>STKLQNAPRPVKPQRVVIAGAGLAGLSAAKYLSDAGHIPVLEARDVLGGKVAAWKDEDG</u>	117
<i>H. pluvialis</i>	60	<u>STKLRNAPRPAKPLRVVIAGAGLAGLSAAKYLADAGHHPVILEGRDVLGGKVAAWKDEDG</u>	119
<i>A. thaliana</i>	80	<u>SASFRSAPRPAKPLKVVIAGAGLAGLSTAKYLADAGHKPLLEARDVLGGKVAAWKDEDG</u>	139
<i>Synechococcus</i>	1MRVAIAGAGLAGLSCAKYLADAGHTPIVVEARDVLGGKVAAWKDEDG	46
<i>P. marinus</i>	1MRVAIAGAGLAGLSCAKYLDAGHIPVYVESRDVLGGKVAAWKDDDG	46
<i>E. herbicola</i>	1MKKTVVI-GAGFGGLALAIRLQAAGIPTVLEQRDKPGGRAYVWHDQGF	47

Fig.44. Estimación del posible péptido señal en la PDS por comparación entre secuencias eucariotas y procariotas. Alineamiento de los 120 primeros aminoácidos de la fitoeno desaturasa (PDS) de *C. reinhardtii* con la PDS de otros microorganismos. Los residuos homólogos están sombreados en azul. Las secuencias conservadas en las tres especies de microalgas se muestran subrayadas. La flecha indica el inicio del posible péptido de transito, propuesto por el programa ChloroP. Los números de acceso de las enzimas de estas especies en el GenBank son: *Chlamydomonas reinhardtii* PDS (AY604703); *Dunaliella salina* PDS (ABB51091.1); *Haematococcus pluvialis* PDS (AAV37090.1); *Arabidopsis thaliana* (NP_974545.1); *Synechococcus* PDS (ZP_01122599.1); *Prochlorococcus marinus* PDS (NP895829.1); *Erwinia herbicola* CRTI (BAB79603).

En la figura (Fig.44) podemos observar la identidad entre los primeros aminoácidos de las PDS de *C. reinhardtii* y otros organismos. Al ser la PDS una enzima codificada por un gen nuclear, la presencia de un péptido de transito o péptido señal es esencial para su localización cloroplástica. El programa ChloroP (www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP), sugiere la existencia de este péptido señal, que se correspondería con los 62 primeros aminoácidos de la secuencia de la PDS de *C. reinhardtii*.

3.1.2. Mecanismo para inhibir la expresión del gen *pds* en *Chlamydomonas reinhardtii*

Hay diversa información sobre los factores que influyen en la regulación de la expresión de la PDS, y aunque son numerosos los trabajos sobre la importancia de las rutas de síntesis de carotenoides, el control de los mecanismos de la ruta no está claro. En microalgas como *Haematococcus pluvialis* y *Dunaliella bardawil*, fuente natural de importantes carotenoides de gran interés comercial, se observó que el nivel de mRNA de la PDS incrementaba respecto a los niveles basales cuando las células eran sometidas a condiciones de estrés en *Haematococcus pluvialis* (Grünwald *et al.*, 2000), mientras que en *Dunaliella bardawil*, tanto el nivel de mRNA como la proteína, permanecían constantes durante la masiva producción de β -caroteno en cultivos sometidos a condiciones de estrés (Rabbani *et al.*, 1998). En *C. reinhardtii*, la actividad de la PDS parece estar regulada por la luz (Bohne y Linden 2002).

El silenciamiento o “*knock out*” del gen *pds* de *Chlamydomonas* sería de gran utilidad para elucidar su papel en la ruta de la carotenogénesis de microalgas, pero la tradicional inactivación génica por recombinación homóloga no es posible en microalgas u otras células vegetales, en las que los genes exógenos se insertan de forma aleatoria en el genoma nuclear (León y Fernández 2007).

El silenciamiento génico post-transcripcional vía RNA interferencia (iRNA), cuyo mecanismo hemos detallado en la Introducción, es un proceso post-transcripcional de degradación del RNA mensajero (mRNA), desencadenado por pequeños RNA interferentes (siRNA) de 21-26 nucleótidos, que se forman a partir de dobles cadenas de RNA (dsRNA) o de horquillas de RNA (shRNA) (Vance y Vaucheret 2001; Waterhouse *et al.*, 2001; Hannon 2002; Pickford y Cogni 2003). Debido a su alta especificidad y eficacia, ha demostrado ser una herramienta de gran valor para analizar la función biológica de genes en muchos organismos, entre ellos *Chlamydomonas* (Schroda 2006). Fragmentos de DNA complementario (cDNA) antisentido que pudiesen hibridar con el mRNA en sentido directo

correspondiente (Schroda 2006; Fuhrmann *et al.*, 2001), y construcciones basadas en pequeñas repeticiones invertidas que pudiesen generar hairpins de RNA al transcribirse (Rohr *et al.*, 2004) han sido algunas de las estrategias empleadas para generar las dobles cadenas de mRNA que finalmente producen los siRNA “*in vivo*”. Sin embargo, el nivel de silenciamiento de la expresión génica es variable, dependiendo del tipo de construcción, del número de copias del transgen y de su integridad. (Schroda 2006; Fuhrmann *et al.*, 2001)

Con estos antecedentes y dado el importante papel que la PDS juega en la síntesis de carotenoides, nos planteamos centrar nuestro estudio en esta enzima, y aportar mediante silenciamiento génico más datos sobre su importancia en la síntesis de carotenoides en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

3.2. CONSTRUCCIONES PARA INHIBIR LA FITOENO DESATURASA DE *Chlamydomonas reinhardtii*

El silenciamiento total de genes vitales puede resultar un problema ya que puede bloquear vías esenciales y en consecuencia, limitar el crecimiento celular o causar letalidad. Las cepas de *C. reinhardtii* con el gen *pds* constitutivamente reprimido probablemente podrían mostrar limitaciones en el crecimiento debido a la falta de carotenoides coloreados y a la limitación en las funciones que éstos desempeñan. Para evitar estos posibles problemas trabajamos con el promotor inducible pNia1 (Nitrate reductase gene) cuya expresión se ve inducida por nitrato o medio sin nitrógeno (Llamas *et al.*, 2002), y reprimida por amonio, tal y como describimos en Resultados y Discusión 2. A continuación se describen las construcciones empleadas para inducir el silenciamiento.

3.2.1. Construcciones para generar siRNA

Utilizando el programa específico “siRNA target finder software” (Wang y Mu 2004) (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/rnai>) se diseñaron dos

construcciones generadoras de pequeñas horquillas de RNA, (siRNA 1 y 2), con distintas regiones diana en la secuencia de la PDS de *Chlamydomonas* (GeneBank accession nº AY604703) (Fig.45). Estas construcciones fueron sintetizadas por GeneScript Corp (NY, USA) y clonadas en el sitio de policlonaaje, MCS, del plásmido pUC57, con la enzima de restricción *EcoRV*.

siRNA 1: 94 pb (región diana: 457-486)

CTCGAGCGTTAGCTCCTTGAAGACATTCATCATGTTGGTTGATATCCGCCAAC
ATGATGAATGTCTTCAAGGAGCTAATTTTTTCCAAGTGCAG

siRNA 2: 94 pb (región diana: 1424-1453)

CTCGAGCGTTGATGACCTTGTACTTGCGGATCTTGGCCTTGATATCCGGGCC
AAGATCCGCAAGTACAAGGTCATCAATTTTTTCCAAGTGCAG

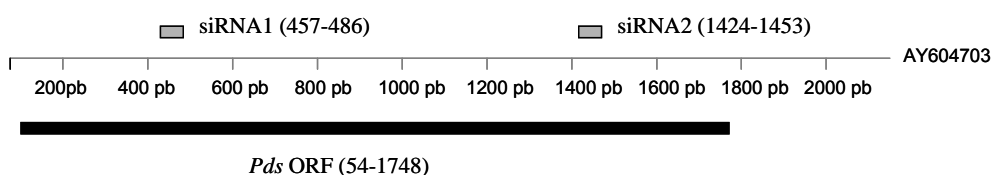


Fig.45. Secuencias dianas elegidas para generar dsRNA. Secuencias dianas de las construcciones diseñadas para generar RNA de doble cadena e inhibir la expresión del gen *pds* de *C. reinhardtii*.

Ambas construcciones presentan la misma estructura que consiste en: 30 nucleótidos de la secuencia del gen *pds* de *C. reinhardtii* en sentido directo, 10 nucleótidos como "loop" o espaciador, los mismos 30 nucleótidos de la secuencia del gen *pds* de *C. reinhardtii* pero en antisentido y cola poli T tal y como se esquematiza en la figura 46.

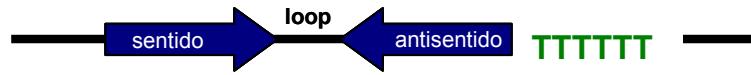


Fig.46. Esquema de las construcciones diseñadas para inhibir la PDS de *Chlamydomonas reinhardtii*. Esquema de las construcciones diseñadas para generar horquillas de RNA: 30 nucleótidos en sentido directo, separados por 10 nucleótidos que actúan como espaciador, de la misma secuencia de 30 nucleótidos pero en sentido contrario, y cola poliT.

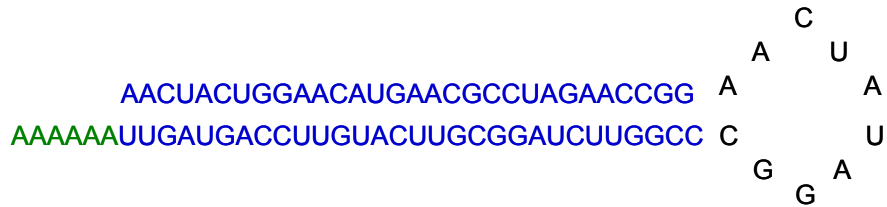


Fig.47. Horquilla de RNA. Ejemplo de horquilla de RNA formada tras la transcripción a partir de la construcción siRNA2, que desencadenará el mecanismo de RNA interferencia.

Estas construcciones se clonaron en la región PLK del vector pSI104PLKpNia1 para formar, tras su transcripción, una horquilla de RNA (Fig.47) que desencadenará el mecanismo de silenciamiento génico mediado por RNA interferencia. Con este fin digerimos ambos plásmidos, pUC57-siRNA y pSI104PLKpNia1 con las mismas enzimas de restricción, *EcoRI* y *BamHI*, para crear extremos cohesivos. Se realizó una digestión doble con el tampón One For All (OFA). La digestión generó dos bandas de 4,2 kb y 23 pb en el caso del plásmido pSI104PLKpNia1 y otras dos de 2,6 kb y 130 pb en la digestión del plásmido pUC57-siRNA (Fig.48).

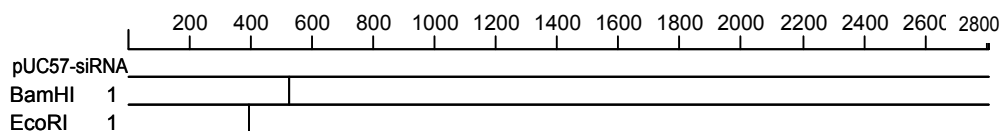


Fig.48. Mapa de restricción del plásmido pUC57-siRNA. Mapa de restricción del plásmido pUC57 elaborado con el “MapDraw” del Dnastar, donde se muestran los sitios de corte para las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*.

El resultado de la digestión se visualizó electroforéticamente en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Para visualizar bandas de pequeño tamaño preparamos el gel al 2% de agarosa y utilizamos como marcador de peso molecular el 1kb ladder plus (1kb plus). Aislamos las bandas de 4,2 kb y 130 pb, se purificaron y se ligaron, resultando el nuevo vector de expresión pSI104PLK-pNia1-siRNA1 y pSI104PLK-pNia1-siRNA2 (Fig.49).

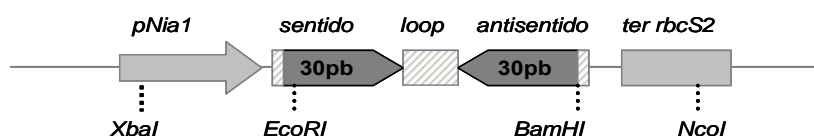


Fig.49. Esquema del plásmido pSI104PLKpNia1-siRNA (4,3 kb). Vector de expresión para silenciar la expresión del gen *pds* en *C. reinhardtii*. pNia1: promotor inducible por nitrato; ter rbcS2: región terminadora de la subunidad pequeña de la rubisco. *XbaI*, *EcoRI*, *BamHI* y *NcoI* representan los sitios de corte para dichas enzimas que son de interés en el vector.

Con el resultado de la ligación, transformamos células competentes de *E. coli* DH5 α y mediante restricción con *EcoRI* y *BamHI* comprobamos nuestras construcciones. Dos de las 5 colonias analizadas mostraban el patrón de bandas esperado, una de ellas, elegida la azar, se cultivó en LB ampicilina 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y se conservó a -80 $^{\circ}\text{C}$ en glicerol al 15%, tras comprobar mediante secuenciación la ausencia de errores.

3.2.2. Construcciones RNA antisentido

Amplificamos por RT-PCR un fragmento de DNA de 1.300 pb del gen *pds* de *C. reinhardtii*, a partir de mRNA total. El fragmento fue clonado en el vector de expresión pSI104PLKpNia1 en sentido contrario, o antisentido, al cromosómico, de forma que al transformar *C. reinhardtii* con este vector de expresión, el mRNA formado a partir del fragmento antisentido, hibridará con el mRNA del gen, formando RNA de doble cadena (dsRNA) desencadenándose el mecanismo silenciamiento génico (Fig.50).

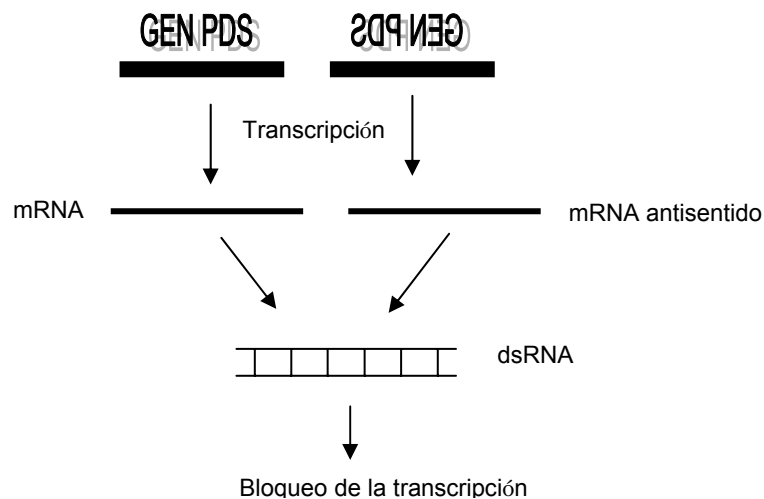


Fig.50. Mecanismo de silenciamiento por RNA antisentido. Mecanismo de inhibición de la expresión de un gen mediante construcciones RNA antisentido. mRNA: RNA mensajero; dsRNA: RNA de doble cadena.

Para aislar el fragmento de 1.300 pb (Fig.51) diseñamos cebadores específicos con sitio de corte para *EcoRI* y *XhoI*, basándonos en la secuencia del

DNA de *C. reinhardtii* publicada por McCarthy y colaboradores (2004): for-*pds1300-BamHI* (5'-GGATCCCACCCAATCGTT-3') y rev-*pds 1300-EcoRI* (5'-TGAATTCGCCAGCCAGGAAGAAGT-3'). Las condiciones para la PCR fueron las descritas en Materiales y Métodos, con una temperatura de hibridación de 45 °C y un tiempo de elongación a 72 °C de 1,5 min. El cDNA obtenido mediante retrotranscripción a partir del RNA total aislado de *C. reinhardtii* fue utilizado como molde. La banda amplificada de 1357 pb se ligó al pGEM-T, para finalmente clonarla en el vector de expresión pSI104PLKpNia1 entre los sitios de corte *EcoRI* y *BamHI* (Fig.52).

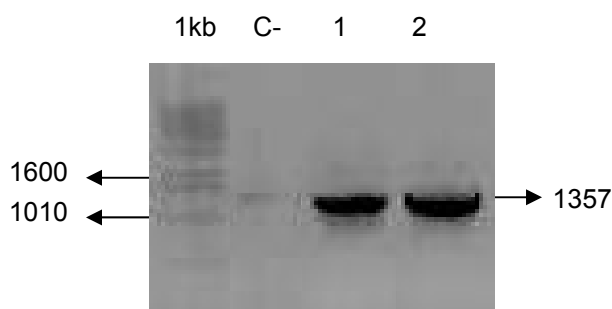


Fig.51. PCR para amplificar la banda *pds 1300*. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas amplificadas por PCR con los cebadores for-*pds1300-EcoRI* y rev-*pds1300-BamHI*, a partir del cDNA de *C. reinhardtii*. 1kb: marcador de peso molecular; C-: Control negativo (sin DNA). 1: cDNA dilución 1/10; 2: cDNA dilución 1/100.

Para verificar nuestra construcción elegimos la enzima de restricción *PstI* que se localiza únicamente en el fragmento *pds1300* dos veces, y comprobamos el patrón de digestión obtenido a partir del plásmido aislado de las colonias positivas. Dos de las seis colonias analizadas mostraban el patrón de bandas esperado. Una de ellas se mandó secuenciar y tras comprobar la ausencia de errores en su secuencia, se cultivó en LB ampicilina 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y se conservó a -80 °C en glicerol al 15%.

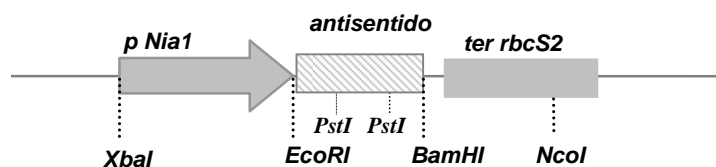


Fig.52. Esquema del plásmido pSI104PLKpNia1-pds1300 (5,4 kb). Vector de expresión para silenciar la expresión del gen de *pds* en *C. reinhardtii*. pNia1: promotor de la nitrato reductasa; ter rbcS2: región terminadora de la subunidad pequeña del gen de la rubisco. *XbaI*, *EcoRI*, *BamHI*, *PstI* y *NcoI* representan los sitios de corte para dichas enzimas que son de interés.

3.3. TRANSFORMACIÓN DE *Chlamydomonas reinhardtii* CON LAS CONSTRUCCIONES DISEÑADAS Y SELECCIÓN DE LOS TRANSFORMANTES

Con las construcciones pSI104plkpNia-siRNA1, pSI104PLKpNia-siRNA2 y pSI104PLKpNia-pds1300 antisentido, y con el plásmido pSI103, caracterizado por poseer el gen marcador *AphVIII*, que confiere resistencia a paromomicina, cotransformamos células de *C. reinhardtii*. El método de transformación utilizado fue agitación con perlas de vidrio, descrito en Materiales y Métodos. Preparamos 3 reacciones por cada construcción, e incluimos un control negativo (C-) sin DNA, y un control positivo, con el plásmido pSI104. Cada reacción contenía: 600 μl de células de *Chlamydomonas* $100 \times (25 \mu\text{Chl ml}^{-1}$ cultivo), 100 μl de PEG 8000 al 20%, 1 μg pSI103 y 1 μg pS104PLK-pNia1-siRNA1/2/*pds1300*. El tiempo de agitación fue de 8 segundos para cada muestra. Las colonias de cotransformantes aparecieron a los 4-5 días (Fig.53). El rendimiento de la transformación fue muy alto, obteniendo más de 300 colonias por cada construcción.



Fig.53. Transformación nuclear de células de *C. reinhardtii* con perlas de vidrio. Placa control positivo resultado de la transformación de célula de *C. reinhardtii* con el plásmido pSI104, con el método de agitación con perlas de vidrio.

La cotransformación con dos plásmidos, uno que lleve el gen de resistencia a un antibiótico, y otro que lleve la construcción de silenciamiento hace necesaria una selección de aquellos transformantes que han insertado ambas construcciones en su genoma. La selección se realizó por PCR. Diseñamos cebadores específicos, for-pNia1-ter rbcS2 (5'-CCCCGCTCCTCTGCTGCCTCTG-3') y rev-pNia1-ter rbcS2 (5'-CTTCCATCCACCGCCGTTTCGTCA-3'), que hibridaban con una región del promotor pNia1 y con la región terminadora de la subunidad pequeña del gen de la rubisco (ter rbcS2). En el caso de la construcción *pds1300*, el fragmento amplificado con estos cebadores era de 2085 pb (Fig.54A), mientras que en las construcciones siRNA era de 1015 pb (Fig.54B).

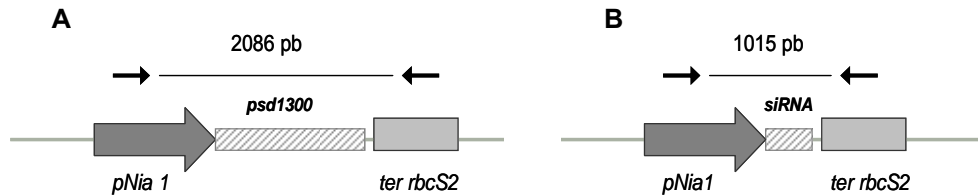


Fig.54. Cebadores diseñados para verificar la integración de las construcciones diseñadas para el silenciamiento de la PDS en el genoma de las células de *Chlamydomonas reinhardtii* cotransformadas. Los cebadores pNia1-ter rbcS2 fueron diseñados para seleccionar transformantes que hayan integrado en su genoma las construcciones pds antisentido (A) amplificando un fragmento de 2086 pb, y las construcciones siRNA (B) amplificando un fragmento de 1015 pb.

De forma aleatoria seleccionamos 270 transformantes, 90 para cada construcción, se cultivaron en medio TAP con amonio (NH_4^+) y con paromomicina ($30 \mu\text{g ml}^{-1}$). Aislamos el DNA genómico de estos transformantes obtenidos, con fenol-cloroformo, y realizamos una PCR (Fig.55 y 56) con los cebadores pNia1-ter rbcS2 descritos anteriormente (hibridación de los cebadores a 65°C ; elongación a 72°C , 1,5 minutos). Previamente, y a modo de control positivo, para comprobar el adecuado aislamiento del DNA genómico se realizaron reacciones de PCR con los cebadores for-*AphVIII* (5'-CGCGCCGGCTTGACATGATTGGTG-3') y rev-*AphVIII* (5'-CACTCTAGACTTCCGGCTCGTATG-3') que amplifican el cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* (1,8kb). Las condiciones para la PCR fueron las habituales, con una temperatura para la hibridación de los cebadores de 54°C y una temperatura de elongación de 72°C durante 1,5 min.

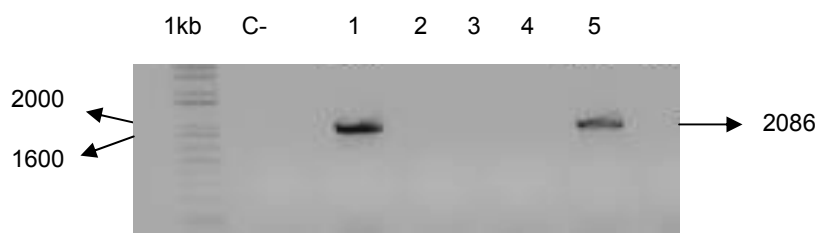


Fig.55. Ejemplo de PCR para verificar la integración de la construcción *pds1300* antisentido en el genoma de las células de *Chlamydomonas reinhardtii* cotransformadas. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas amplificadas por PCR con los cebadores pNia1-ter rbcS2, sobre el DNA genómico aislado de distintas colonias de transformantes. 1Kb: marcador de peso molecular; C-: control negativo; 1-5: banda amplificada sobre el DNA genómico extraído de los transformantes pds1300-1, pds1300-10, pds1300-26, pds1300-30 y pds1300-5.

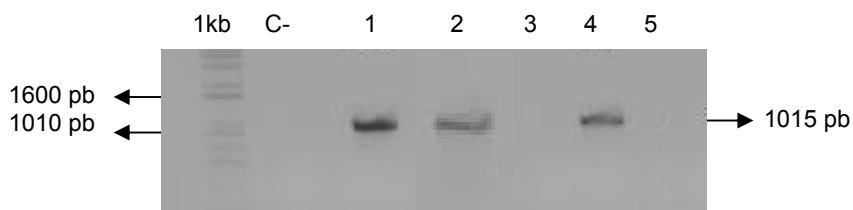


Fig.56. Ejemplo de PCR para verificar la integración de las construcciones siRNA en el genoma de las células de *Chlamydomonas reinhardtii* cotransformadas Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas amplificadas por PCR con los cebadores pNia1-ter rbcS2, sobre el DNA genómico aislado de distintas colonias de transformantes. 1Kb: marcador de peso molecular; C-: control negativo; 1-5: banda amplificada sobre el DNA genómico extraído de los transformante pds-siRNA2-5, pds-siRNA1-1, pds-siRNA1-16, pds-siRNA2-17 y pds-siRNA1-46.

De los 270 transformantes estudiados, 140 habían integrado correctamente la construcción (Fig.55 y 56); 48 en el caso de la construcción

pds1300 antisentido; 46 en el caso de la construcción siRNA1 y otros 46 en el caso de la construcción siRNA2. Esto supone que un 53% de los transformantes resistentes a paromomicina adquirieron la construcción *pds1300* antisentido, y un 51% integraron las construcciones diseñadas para generar hairpins de RNA

3.4. ESTUDIO DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL GEN *pds*

3.4.1. Cuantificación relativa por qPCR a tiempo real del nivel de expresión del gen *pds* en los transformantes obtenidos

Para comprobar la eficiencia de las construcciones de silenciamiento, estudiamos la expresión del gen *pds* en los transformantes obtenidos. El promotor de la nitrato reductasa se activa en presencia de nitrato, así que para inducir la transcripción de las construcciones de silenciamiento, inoculamos las colonias en 200 ml de medio TAP (NH_4^+), al llegar a la fase exponencial de crecimiento, los cultivos se centrifugaron, se lavaron con medio TAP sin nitrógeno (TAP-N) y se resuspendieron en medio TAP (NO_3^-) a una concentración final de $25 \mu\text{gChl ml}^{-1}$ de cultivo. Los cultivos permanecieron 48 horas en la cámara de cultivo a una intensidad de luz baja, de aproximadamente $25 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Posteriormente se aisló el RNA total utilizando el RNeasy Plant Mini kit (Quiagen), partiendo de 80 mg de peso fresco. El RNA obtenido se trató con DNasa para evitar contaminaciones con DNA genómico y se utilizó como molde para obtener DNA complementario (cDNA) por acción de la retrotranscriptasa reversa (SuperScript II).

En una primera aproximación y utilizando PCR tradicional con los cebadores *for-pds* (5'-GCGGCGGCGAGCTGAAGATGAAC-3') y *rev-pds* (5'-GGTGAAGTCGCCAGCCAGGAAGAA-3') especialmente diseñados para amplificar un fragmento de 602 pb del gen *pds* de *C. reinhardtii*, comprobamos que en todos los transformantes estudiados se amplificaba la banda correspondiente al gen. Esto indicaba que no habíamos obtenido silenciamiento total del gen en ninguno de los transformantes. La cuantificación más detallada de la cantidad de

transcrito presente en cada transformante no puede realizarse por PCR tradicional, que sólo puede discriminar entre presencia o ausencia de transcrito, así que recurrimos a la qPCR a tiempo real.

La tecnología PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real nos permite comparar la abundancia relativa del transcrito en múltiples muestras, por coamplificación de un control interno, con el cDNA en estudio. Los detalles de esta técnica se describen detenidamente en la Introducción.

La elección de un adecuado control interno, cuyo nivel de expresión permanezca constante en todas las condiciones estudiadas, y de los cebadores, es fundamental para obtener resultados fiables en la qPCR a tiempo real.

Gen de la ubiquitina ligasa como control interno

El control interno nos permite normalizar los valores del transcrito de la PDS de los transformantes, y para ello, es importante que tenga un nivel de expresión constante, como ya hemos comentado, y una eficiencia de amplificación similar a la del gen estudiado. Seleccionamos el gen de la *ubiquitina ligasa* (ubq-L) (BU648530, BE237749, BE237718 y BU648531) como “*housekeeping*” o control interno, debido que su expresión se mantiene constante bajo las diferentes condiciones estudiadas, tal y como ha sido previamente descrito (González-Ballester *et al.*, 2004). Los cebadores para su amplificación, for-Ubiq-L (5'-GTACAGCGGCGGCTAGAGGCAC-3') y rev-Ubiq-L (5'-AGCGTCAGCGGCGGTTGCAGGTATCT-3'), fueron diseñados específicamente (González-Ballester *et al.*, 2004) para amplificar un fragmento de 161 pb de cDNA. La región de unión del cebador for-Ubiq-L está situada en la unión entre dos exones contiguos, de forma que la amplificación de DNA genómico no es posible con estos cebadores.

Cebadores para la cuantificación del mRNA de la PDS por qPCR a tiempo real

Para el diseño de estos cebadores nombrados *for-pds-small* (5'-CCGCGTGAACGAGGAGGTCT-3') y *rev-pds-small* (5'-CCGCGGGCCGTGAAGTGG-3'), se consideró: que el amplicón no superase las 150 pb; que el contenido en Guanina/Citosina estuviese comprendido entre el 30% y 80%; que el extremo 3' no tuviese más de 3 Citosinas o Guaninas; se evitaron secuencias que contuvieran 4 o más Guaninas continuas; se procuró que la temperatura de hibridación estuviese comprendida entre 58 °C y 62 °C y que el fragmento amplificado por estos cebadores incluyera algún exón, de manera que se pudiesen detectar contaminaciones con DNA genómico. Para conseguir este último objetivo, elegimos como cebador *for* un oligonucleótido que hibrida con el cuarto exón de la PDS, y como reverso otro oligonucleótido que hibrida con el exón contiguo, separados ambos exones por un intrón. El amplicón era de 145 pb sobre mRNA, y 413 pb sobre DNA genómico (Fig.57) y la temperatura óptima de hibridación era de 61 °C.

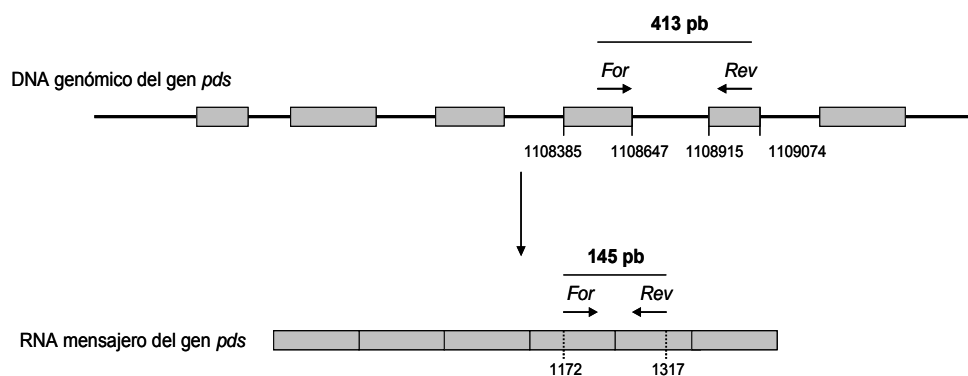


Fig.57. Localización de los cebadores diseñados para la amplificación de transcritos del gen *pds* por qPCR a tiempo real. Cebadores diseñados para amplificar 413 pb sobre DNA genómico, y de 145 pb sobre mRNA. Ambos cebadores se localizan en exones contiguos, separados por un intrón, lo que nos permitirá detectar contaminaciones de DNA genómico en nuestras muestras.

Condiciones para la reacción de qPCR a tiempo real

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un equipo Mx300P de Stratagene, utilizando el Master Mix Brilliant SYBRGreen (Materiales y Métodos) y el ciclo utilizado fue: desnaturalización a 95 °C, 10 minutos; 40 X (desnaturalización a 95 °C, 30 segundos; hibridación a 60 °C, 30 segundos; elongación a 72 °C, 30 segundos). Al final del proceso de amplificación se realizó una curva de disociación (Fig.57A) para comprobar la eficiencia de la amplificación. Las rampas se producen a 0,2 °C /segundo. El cDNA se obtuvo por RT-PCR a partir de mRNA aislado y cada muestra se analizó por triplicado. Incluyéndose también un control negativo sin cDNA.

La utilización del SYBRGreenI como fluoróforo, que se une de forma inespecífica a moléculas de doble cadena de DNA, obliga a realizar una curva de disociación (30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 95 °C) al final del proceso, que nos permite comprobar el adecuado funcionamiento de los cebadores. En la curva de disociación (Fig.58A) se observa un primer máximo de la derivada de la fluorescencia a una temperatura de 86,8 °C, correspondiente a los cebadores *pds small*, y otro segundo máximo a 84 °C para los cebadores *Ubq-L*. El primer máximo corresponden a la desnaturalización del fragmento de 145 pb del gen *pds* y el segundo a la del fragmento de 161 pb del gen *ubq-L*. La ausencia de otros máximos en la curva de disociación indica que no se forman dímeros de los cebadores, ni hay otras amplificaciones inespecíficas.

Los productos de qPCR de algunas de las muestras amplificadas con estas parejas de cebadores se sometieron a una separación electroforética en gel de garosa (Fig. 58B) donde se verificó el tamaño de los productos, y se corroboró la ausencia de amplificaciones inespecíficas.

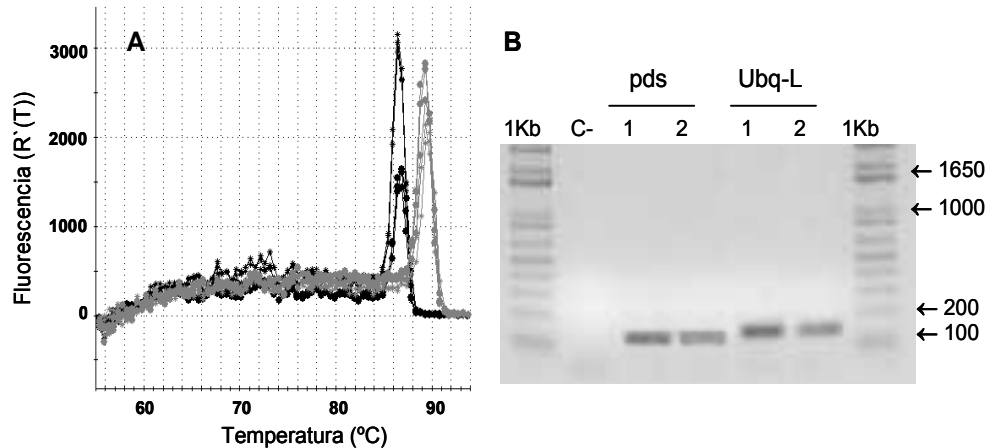


Fig.58. Funcionalidad de los cebadores para qPCR a tiempo real. Los cebadores para la qPCR a tiempo real fueron optimizados realizando una curva de disociación al final del proceso de amplificación (A) y llevando a cabo la separación electroforética de los productos de qPCR obtenidos (B). En la figura A se muestran el resultado para dos muestras elegidas de forma aleatoria, “*pds 1,3 antisense-3'*” (*) y “*pds-siRNA2-5'*” (•). En la curva de disociación (A) (30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C, y 30 segundos a 96 °C) el primer máximo de la gráfica corresponde al fragmento de 145 pb del gen *pds*, amplificado con los cebadores *pds small* (curva negra). El fragmento se desnaturaliza a 86,8 °C. El segundo máximo corresponde al fragmento de 161 pb del gen *ubiquitina ligasa*, amplificado con los cebadores *Ubq-L*. El fragmento se desnaturaliza a 89, 4°C (curva gris). En el gel de agarosa (B); M1: cDNA del transformante “*pds 1,3-3'*” amplificado con los cebadores *pds small* y *Ubq-L*; M2: cDNA del transformante “*pds-siRNA2-5'*” amplificado con los cebadores *pds small* y *Ubq-L* respectivamente; C-: control negativo, sin cDNA; 1kb: marcador de peso molecular.

Curvas de calibrado y eficiencia de los cebadores utilizados para amplificar el gen pds y el gen ubiquitina ligasa

El método de la curva estándar se basa en la cuantificación absoluta de los genes estudiados. Para esto es imprescindible realizar una curva de calibrado en la que se representa el logaritmo de los ng o las moléculas del DNA molde frente al Ct (ciclo umbral en el cual la fluorescencia comienza a ser detectable).

Las curvas de calibrado nos permiten, además, calcular la eficiencia de los cebadores.

La curva de calibrado para el gen *pds* (Fig.59 y 61) se realizó con diluciones seriadas del plásmido pGEM-T *pds* con valores comprendidos entre 0,00003 y 30 ng de DNA. En la figura 59 se muestran los valores C_t , que están inversamente correlacionados con el logaritmo de la cantidad de plásmido (ng).

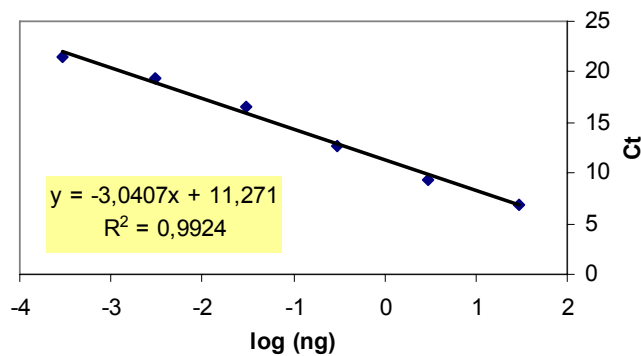


Fig.59. Curva de calibrado para el gen *pds*. Recta de calibrado para el gen *pds*, realizada con diluciones seriadas de cantidades conocidas (0,00003-30 ng) del plásmido pGEM-T *pds* 1 300. Coeficiente de regresión lineal igual a 0,9924.

De igual modo, se realizó la curva de calibrado para el gen *ubiquitina ligasa* (Fig. 60), utilizado como control interno, con diluciones seriadas de cantidades crecientes (0,00003-30 ng) de DNA obtenido por PCR con los cebadores *Ubq-L*. En la figura 60 se muestra los valores de C_t para el logaritmo de las distintas cantidades de DNA (ng).

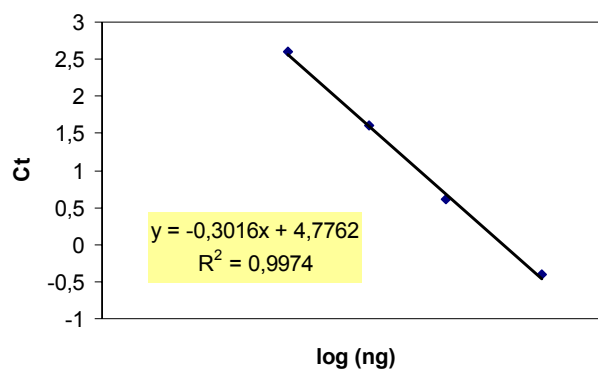


Fig. 60. Curva de calibrado para el gen *ubiquitina ligasa*. Recta de calibrado para el gen *ubiquitina ligasa* realizada con diluciones seriadas de cantidades conocidas (0,00003-30ng) del fragmento del gen *ubiquitina ligasa* amplificado con los cebadores Ubq-L. Coeficiente de regresión lineal igual a 0,9974.

En ambos casos la concentración de DNA se cuantificó con anterioridad, espectrofotométricamente ($A_{260\text{nm}}$). Los pesos moleculares para el plásmido pGEM-T *pds* y para el fragmento correspondiente al gen *ubiquitina ligasa*, utilizados como molde para el cálculo de las rectas de calibrado son 2.679 kDa y 100,26 kDa respectivamente, calculados con el programa http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/dna_mw.html. Los valores de los coeficientes de regresión lineal de las rectas de calibrado obtenidos fueron: 0,9924 y 0,9974 para el gen *pds* y *ubiquitina ligasa* respectivamente. La eficiencia se calculó en función de la pendiente de las rectas de calibrado con la ecuación:

$$Eficiencia = 10^{(-1/slope)} - 1$$

Los valores de eficiencia obtenidos, 113% para el gen *pds* y 100% para el gen *ubiquitina ligasa*, están dentro del rango recomendado, y tienen una diferencia entre ellos menor al 5%. La eficiencia obtenida, junto con la especificidad de los cebadores, comprobada previamente, nos indica que ambas parejas de cebadores son adecuados y nos permitirán la cuantificación fiable del gen en estudio.

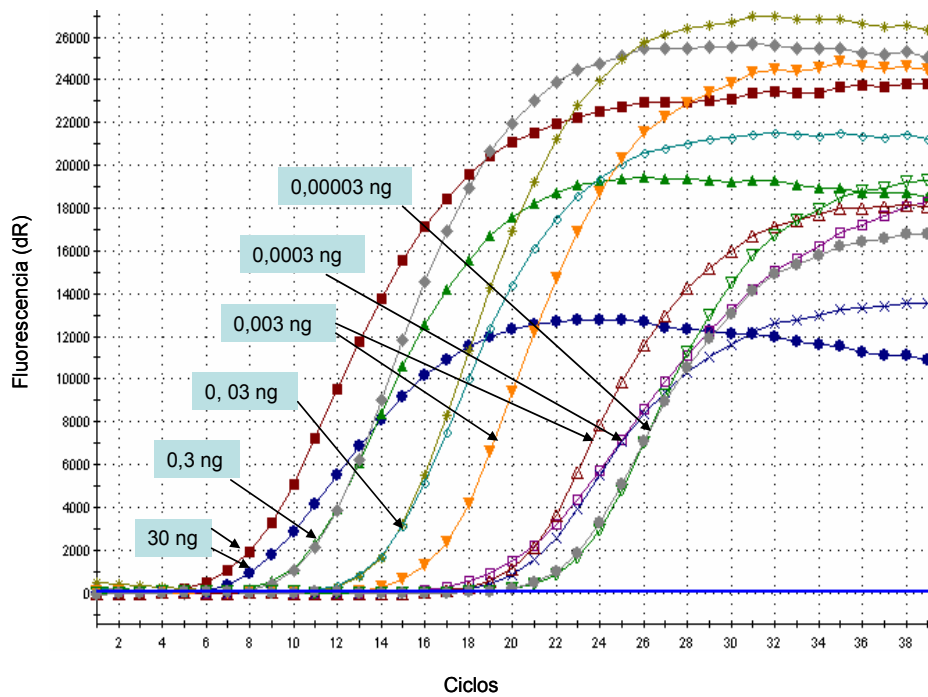


Fig.61. Ejemplo de qPCR a tiempo real para la obtención de la recta de calibrado del gen *pds*. A partir de esa gráfica, y con el software MxPro de Stratagen, podemos calcular el valor del C_t correspondiente a cada una de las cantidades de gen *pds* analizadas.

Análisis de los resultados

Hay dos métodos, ambos igualmente válidos, para el análisis de los datos obtenidos: método relativo de la curva estándar, y el método comparativo de los C_{ts} o " $\Delta\Delta C_t$ ", en el que se asume que las eficiencias de los cebadores son prácticamente iguales, y se omite la curva estándar (<http://www.uic.edu/depts/rrc/cgf/realtime/stdcurve.html>). El primero, utilizado en nuestro caso, se basa en la utilización de una curva estándar a partir de cDNAs de

concentraciones conocidas, y en extrapolar la concentración del gen en la muestra a partir del C_t obtenido. Posteriormente se calcula la relación entre la cantidad del gen estudiado y del gen de referencia o “housekeeping”, y se compara dicha relación entre las distintas muestras. Se denomina cuantificación relativa ya que compara entre diferentes muestras la cantidad relativa del mRNA de un gen específico respecto a la cantidad del mRNA de un gen constitutivo.

1º- Calculamos los ng del gen *pds* y del gen *ubiquitina ligasa* para cada muestra y para el control sin transformar, por interpolación con las rectas de calibrado obtenidas.

$$\log(ng) = \frac{(C_t - n)}{m}$$

Donde m y n vienen dados por la recta de calibrado descrita anteriormente para cada gen.

2º- Normalizamos los valores obtenidos de cada muestra, y del control sin transformar, respecto a la cantidad del gen *ubiquitina ligasa*, utilizado como control interno.

$$ng\ pds\ normalizados = \frac{ng\ pds\ muestra}{ng\ ubiquitina\ ligasa\ muestra}$$

En la figura 62 se muestra un ejemplo de la curva de amplificación obtenida por qPCR para dos de las muestras estudiadas, elegidas al azar.

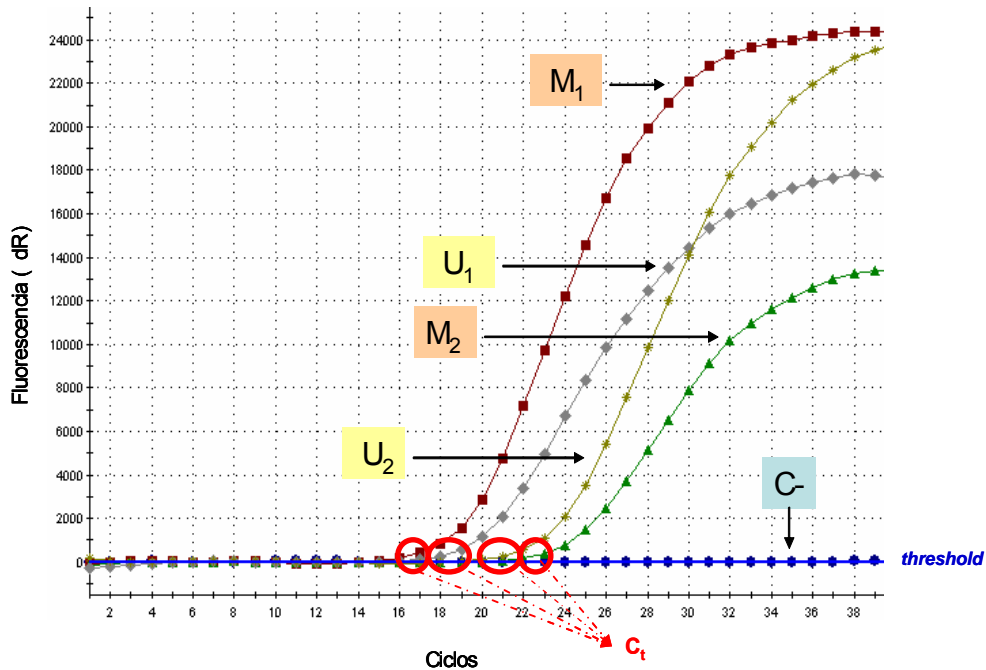


Fig.62. Ejemplo de curva de amplificación por qPCR a tiempo real. Amplificación por qPCR a tiempo real de los transformantes *pds1300-10* (1) y *iRNA2-pds5* (2) con los cebadores *pds-small* (M) y *Ubiq-L* (U). En la figura se representa el valor de la fluorescencia emitida en cada ciclo. Se incluye un control negativo (NTC) en el que la fluorescencia no cruza el "threshold" o línea base.

3º- Relativizamos los ng normalizados obtenidos de cada muestra en el paso 2, respecto al control sin transformar también normalizado, suponiendo el nivel de transcrito en el control sin transformar como el máximo valor (100%).

Analizamos el nivel de transcrito de la fitoeno desaturasa, normalizado frente a la concentración de *ubiquitina ligasa*, en los 140 transformantes que habían integrado la construcción de interferencia en su genoma y lo expresamos

en relación al valor de transcrito *pds* normalizado en las células control no transformadas de *C. reinhardtii* (Fig.63).

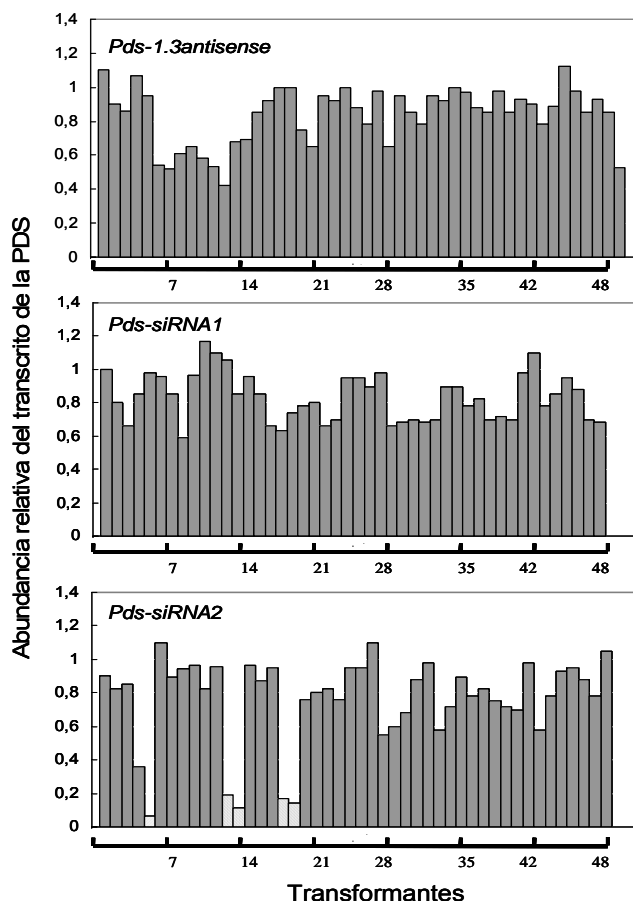


Fig.63. Abundancia relativa del transcrito de la fitoeno desaturasa en los transformantes aislados. Nivel de expresión de la PDS en los diferentes transformantes obtenidos por cotransformación con construcciones antisentido (*pds1300antisentido*) y construcciones RNA interferencia (siRNA1 y 2). Los niveles de transcrito de la PDS fueron normalizados respecto a un control interno o "housekeeping" (gen *ubiquitina ligasa*) y expresados como valor relativo normalizado con el nivel de expresión de la PDS de la células del control sin transformar (119 ng *pds* /ng *ubq*). Todos los datos se obtuvieron por triplicado. El RNA utilizado como molde se obtuvo de cultivos de *C. reinhardtii* incubados durante 48 h en presencia de NO_3^- a baja intensidad luminosa ($25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Como se muestra en la figura 63, las tres construcciones de silenciamiento estudiadas inducen cierta disminución en la transcripción de la PDS, pero ninguna de las tres causó un “*knock out*” total de la expresión del gen *pds*. El grado de silenciamiento fue muy variable, y la mayor eficiencia se obtuvo en el caso de la construcción llamada siRNA-2, que permitió el aislamiento de 5 transformantes (*pds-siRNA2-5*, *pds-siRNA2-12*, *pds-siRNA2-13*, *pds-siRNA2-17* y *pds-siRNA2-18*) en los cuales el nivel de transcrito para la *pds* era inferior al 20% de su nivel en el control no transformado. El porcentaje de silenciamiento obtenido se encuentra dentro del rango descrito para silenciamiento por antisentido o iRNA en *Chlamydomonas* descrito por Schroda (2006). En la mayoría de los trabajos descritos sobre silenciamiento en *Chlamydomonas*, se describe un silenciamiento parcial del gen diana, pero no silenciamiento total.

Una vez confirmado el bajo nivel de expresión para la PDS en algunos de los transformantes obtenidos, estudiamos el fenotipo asociado a este genotipo, esperando ver alguna variación en el perfil de pigmentos producidos.

3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS TRANSFORMANTES AISLADOS

Para la caracterización de los 5 transformantes de la PDS aislados, *pds-siRNA2-5*, *pds-siRNA2-12*, *pds-siRNA2-13*, *pds-siRNA2-17* y *pds-siRNA2-18*, estudiamos su contenido en pigmentos y su actividad fotosintética, siempre en comparación con un control sin transformar. Los transformantes elegidos se inocularon en medio TAP (NH_4^+), cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento, se centrifugó, se lavó con medio TAP sin nitrógeno, y se resuspendió en medio TAP (NO_3^-) con una densidad celular aproximada de $10 \mu\text{gChl ml}^{-1}$. Se incubaron con luz blanca a baja intensidad ($25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y tras 48 horas se tomaron muestras de cada uno de los cultivos para su caracterización (Tabla VII).

Los transformantes con un nivel de transcrito para la PDS menor que el 20% respecto al control, no presentaban una menor actividad fotosintética. Tampoco se observó un menor contenido en carotenoides coloreados, ni una acumulación de fitoeno. Sorprendentemente, podemos concluir que el perfil de pigmentos en estos mutantes con bajo nivel de expresión para la PDS es prácticamente igual que el de las células no transformadas.

Tabla VII. Caracterización de los transformantes que presentan bajo nivel de expresión para la PDS.

	Pigmentos (mg g ⁻¹ DW)								Act. Foto. (μmolesO_2 mg ⁻¹ Chl h ⁻¹)
	β -car	Fit	Chl a	Chl b	Lut	Zea	Viol	Neo	
Control	18,5	0,0	11,8	38,1	36,4	5,2	11,6	8,5	185
<i>pds-siRNA2-5</i>	19,8	0,01	15,8	45,7	40,2	3,1	12,5	7,5	180
<i>pds-siRNA2-12</i>	20,2	0,0	12,5	42,7	39,5	2,2	12,2	6,8	155
<i>pds-siRNA2-13</i>	15,6	0,0	10,2	35,7	35,6	3,8	11,9	8,2	168
<i>pds-siRNA2-17</i>	18,7	0,02	12,7	35,6	38,2	4,7	14,7	10,2	178
<i>psd-siRNA2-18</i>	17,9	0,0	9,5	40,1	37,5	4,2	11,3	9,7	182

Perfil de pigmentos en los transformantes *pds-siRNA2-pds* de *Chlamydomonas reinhardtii* seleccionados. Tras 48h de cultivo en medio TAP (NO₃⁻), se tomaron muestras de cada uno, y de un control no transformado. Se midió la concentración de pigmentos, y se determinó la actividad fotosintética. β -car: β -caroteno; Fit: Fitoeno; Chl a: Clorofila a; Chl b: Clorofila b; Lut: Luteína; Zea: Zeaxantina; Viol: Violaxantina; Noe: Neoxantina. Todos los datos representan el promedio de tres medidas.

3.6. DISCUSIÓN

Los intentos realizados hasta la fecha para aislar mutantes de la fitoeno desaturasa (PDS) en *C. reinhardtii* mediante mutagénesis con radiación UV o mutágenos químicos no han tenido éxito. Aunque se han conseguido aislar

muchos mutantes deficientes en carotenoides, ninguno de ellos estaba afectado en la enzima fitoeno desaturasa. McCarthy y colaboradores (2004) analizaron el fenotipo y genotipo de "mutantes blancos" de *C. reinhardtii* previamente aislados, y de otros nuevos mutantes aislados por ellos, y describieron que el color blanco o verde pálido que presentaban estos mutantes era debido a la pérdida de carotenoides y al bajo contenido en clorofilas, y demostraron que este fenotipo era consecuencia de mutaciones en el gen *psy*, que codifica la enzima fitoeno sintasa (PSY), paso inmediatamente anterior al catalizado por la PDS en la ruta de carotenogénesis. De igual modo, los estudios genéticos realizados a muchos mutantes de plantas y algas deficientes en carotenoides, revelan que éstos presentaban la fitoeno sintasa afectada (McCarthy *et al.*, 2004) o enzimas involucradas en la síntesis de plastoquinonas (Norris *et al.*, 1998), pero nunca presentaban modificaciones en el gen que codifica la enzima fitoeno desaturasa. Ante este panorama, plantearon la posible existencia de un segundo gen funcional para la PDS de *Chlamydomonas* como posible explicación ante la dificultad de aislar mutantes para esta enzima. También proponían que una posible toxicidad al fitoeno, en *Chlamydomonas*, impidiese el aislamiento de estos mutantes, aunque en *Arabidopsis* no se ha descrito nada acerca de este efecto letal en células con altas concentraciones intracelulares de fitoeno (Norris *et al.* 1998). Datos sobre células de *D. bardawil* tratadas con norflurazón, que también acumulan fitoeno, descartan la idea de una supuesta letalidad en células de *Chlamydomonas* con altos niveles intracelulares de fitoeno (León *et al.*, 2005).

En un reciente trabajo, Sun y colaboradores (2008) describen la inhibición del gen *pds* de *Dunaliella salina* vía siRNA. Utilizando construcciones que generaban hairpins; observaron una reducción transitoria de la expresión del gen del 28% de lo normal, pero no estudiaron el efecto de esta reducción sobre el contenido de carotenoides.

Con estos antecedentes decidimos abordar el silenciamiento específico de la PDS mediante la técnica de RNA interferencia. Esta técnica nos ha permitido aislar 5 transformantes de *C. reinhardtii* con niveles de transcrito para la PDS

notablemente bajos, inferiores al 20% del nivel del mRNA de la PDS en la estirpe control no transformada. Esto supone que aproximadamente el 3,4% de los transformantes que habían integrado las construcciones de silenciamiento en su genoma, mostraban una significativa disminución en su transcripción (Vila *et al.*, 2008). Este porcentaje de silenciamiento entra en el rango observado en estudios realizados previamente con iRNA o antisentido en *C. reinhardtii* (Schroda 2006) pero sorprendentemente, este genotipo no causaba cambios en el contenido de carotenoides coloreados ni una masiva acumulación de fitoeno, como era de esperar. En el mutante *pds-siRNA2-5*, que presentaba un nivel de expresión para la PDS del 6,7%, su contenido en pigmentos era muy similar al perfil del control. Ante los resultados obtenidos nos planteamos dos posibles hipótesis:

i) la existencia de pasos previos más limitantes podría explicar que bajos niveles de expresión de la PDS no influyeran significativamente en la síntesis de carotenoides. La PSY ha sido propuesta como un paso limitante en la ruta de carotenogénesis (Burkhardt *et al.*, 1997; Hirschberg, 2001). De hecho, la sobreexpresión de esta enzima PSY ha conducido al incremento de la producción de carotenoides en muchas plantas (Stalberg *et al.*, 2003; Shewmaker *et al.*, 1999; Lindgren *et al.*, 2003).

ii) la existencia de un segundo gen funcional para la fitoeno desaturasa, como proponía McCarthy y colaboradores (2004), explicaría el hecho de que los transformantes con niveles muy bajos de PDS no muestren ninguna alteración en su perfil de carotenoides, y además justificaría también la imposibilidad de aislar mutantes deficientes en la fitoeno desaturasa por mutagénesis tradicional.

Aunque en *Chlamydomonas*, con más del 95% del genoma secuenciado (Merchant *et al.*, 2007) la existencia de una segunda fitoeno desaturasa parecía poco probable, en la última versión de su genoma (4ª), que será publicada próximamente, aparece un segundo gen con un elevado porcentaje de identidad con la fitoeno desaturasa (Lohr y Mólnar, comunicación personal).

4. AISLAMIENTO DE MUTANTES SENSIBLES A LA LUZ EN *Chlamydomonas reinhardtii* POR MUTAGÉNESIS INSERCIONAL

La disponibilidad de mutantes ha sido y es una herramienta de valor inestimable ya que nos permite abordar el estudio de una ruta metabólica, determinando la funcionalidad, regulación y el papel de cada una de las enzimas implicadas; además nos permite valorar el impacto de la modificación de la expresión de ciertos genes, sobre el metabolismo global de las microalgas. *Chlamydomonas* cuenta con una importante colección de mutantes (<http://chlamy.org>) estables y bien caracterizados a nivel fisiológico, y aunque en algunos casos se ha llevado a cabo el mapeo de los genes afectados, la base molecular de la mayoría de estos mutantes no se ha determinado.

La mutagénesis insercional se ha convertido en un método muy usado para la interrupción de genes nucleares en *Chlamydomonas*, permitiendo avanzar en aproximaciones genéticas basadas en el escrutinio de fenotipos particulares, y en la identificación de la región genómica afectada (Galván *et al.*, 2007). En contraste con la mutagénesis química, los fenómenos de integración del DNA suelen ocurrir con baja frecuencia lo que evita la aparición de múltiples mutaciones, y en consecuencia, las deleciones o inserciones son fácilmente identificables. Desde que se describió por primera vez el empleo de esta técnica para clonar genes del flagelo en *C. reinhardtii* (Tam y Lefebvre 1993), ha sido ampliamente usada para aislar mutantes afectados en diferentes procesos biológicos, como fotosíntesis y estrés oxidativo (Dent *et al.*, 2005), fototaxis (Pazour *et al.*, 1995), metabolismo del nitrógeno (González-Ballester *et al.*, 2005b; Prieto *et al.*, 1996), metabolismo del azufre (Pollock *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 1996), metabolismo del carbono (Yoshioka *et al.*, 2004; Zabawinski *et al.*, 2001), producción de hidrógeno, sistema circadiano (Matsuo *et al.*, 2008), etc.

El proceso básico de mutagénesis insercional consta de los siguientes pasos:

- Transformación celular
- Selección de transformantes
- Escrutinio de fenotipos determinados
- Localización de la inserción

La técnica requiere dos condiciones: alta eficiencia de transformación y bajo número de copias de DNA marcador insertadas.

4.1. OBTENCIÓN DE MUTANTES INSERCIONALES DE *Chlamydomonas reinhardtii*

La estirpe 704 de *C. reinhardtii*, que carece de pared celular fue mutageneizada por la inserción aleatoria del plásmido pSI104 linearizado (4.704 pb) o del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* (1,8 pb) aislado a partir del mismo plásmido pSI104. La transformación se llevó a cabo mediante agitación con perlas de vidrio tal y como se describe en materiales y métodos utilizando aproximadamente 1 µg del plásmido pSI104 linearizado, y entre 100 y 200 ng en el caso del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*.

4.1.1. Linearización del plásmido pSI104 y obtención del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*

El plásmido pSI104 fue linearizado (Fig.64) con la enzima de restricción *NotI*, que presenta un sitio único de restricción en el plásmido pSI104 situado unas 300 pb antes del cassette, y unas 2000 pb después del mismo. Así se evita la posible pérdida de elementos del cassette durante los reordenamientos que generalmente acompañan la integración en el genoma, pero dificulta la amplificación de las regiones genómicas que flanquean el inserto si utilizamos cebadores específicos para el gen *AphVIII*.

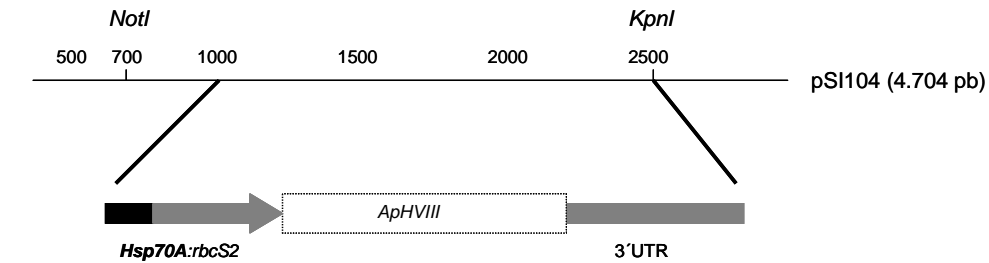


Fig. 64. Esquema del plásmido pSI104 linearizado. Esquema del plásmido pSI104 linearizado de 4.704 pb y localización del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* flanqueado por los sitios de corte para las endonucleasas *NotI* y *KpnI*.

La inserción en el genoma de *Chlamydomonas* del cassette sin el resto del plásmido facilitará la resolución por PCR de las regiones genómicas que flanquean el inserto. Para esto, el plásmido pSI104 aislado con Plasmid Midi Kit (Quiagen) se sometió a una digestión doble con las enzimas *NotI* y *KpnI* (Fig.65) utilizando el tampón *BamHI*. El fragmento de 1800 pb correspondiente al cassette se separó por electroforesis (Fig. 65) y se purificó.

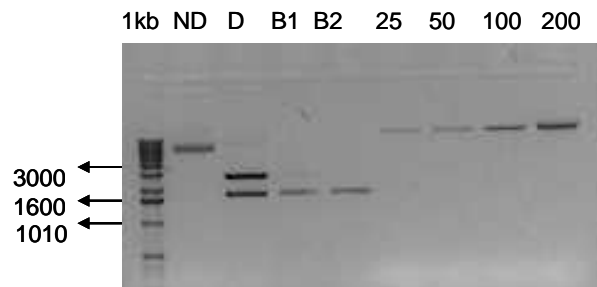


Fig. 65. Aislamiento y cuantificación del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*. Gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio donde se visualiza y cuantifica el cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* aislado a partir del plásmido pSI104. ND: pSI104 sin digerir; D: pSI104 digerido con *kpnI* y *NotI*; B1 y B2: banda correspondiente al cassette aislada y purificada. 25, 50, 100 y 200 representan los ng de DNA del fago lambda.

En la figura 65 vemos la separación electroforética del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* (1,8 pb) tras su digestión a partir del pSI104 y la cuantificación del fragmento purificado. La cuantificación es importante pues optimizando la cantidad de DNA utilizada en los experimentos de mutagénesis, puede asegurarse una buena eficiencia de la transformación y pueden minimizarse el número de inserciones múltiples.

4.2. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS MUTANTES

El objetivo general de nuestro trabajo es ampliar el conocimiento sobre la ruta de carotenogénesis. El aislamiento de mutantes deficientes en pigmentos o sensibles a luz, utilizando mutagénesis insercional, puede permitirnos encontrar mutantes etiquetados afectados no sólo en los genes estructurales que codifican las enzimas de la ruta, sino también en genes que codifican elementos reguladores u otras enzimas implicadas en la síntesis de precursores de la ruta, y ofrecernos así una visión más amplia de la ruta y de su regulación.

Los transformantes obtenidos por agitación con perlas de vidrio se seleccionaron en función a la resistencia adquirida frente a la paromomicina, proporcionada por el gen marcador *AphVIII* (Sizova 2001). Este gen marcador evita, o al menos nos permite detectar, la pérdida de la etiqueta, siempre que los mutantes se mantengan en un medio selectivo. La paromomicina, a diferencia de otros medios selectivos, no provoca la aparición de mutaciones espontáneas como se he descrito con el antibiótico glicopeptídico bleomicina, que se inserta en el DNA y provoca su ruptura. Para esta selección, las células transformadas se plaquearon en medio TAP con $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ de paromomicina. En el caso de la transformación llevada a cabo con el plásmido linearizado las placas se mantuvieron en luz baja, de aproximadamente $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 5-7 días, tiempo en el que empezaron a aparecer los primeros mutantes, obteniendo un total de 300. En el caso de la transformación con el cassette, las placas se mantuvieron en oscuridad durante 10-12 días, tiempo en el que empezaron a aparecer los primeros mutantes, aislando un total de 800.

De entre los 1100 transformantes resistentes a paromomicina realizamos el escrutinio para seleccionar dos tipos de mutantes:

- mutantes deficientes en pigmentos, que presentan coloración verde pálida
- mutantes sensibles a la luz

Debido al papel que juegan los carotenoides en la protección frente al estrés oxidativo, aquellos mutantes que presenten una mutación en algún gen implicado en la síntesis de estos carotenoides serán mucho más sensibles a la luz. También está demostrado que los mutantes deficientes en carotenoides suelen ser deficientes en clorofila debido a problemas en el ensamblado de los complejos pigmento-proteína que constituyen los fotosistemas (Grosmann *et al.*, 2004). Por este motivo, los mutantes se seleccionaron en oscuridad o bajas intensidades de luz.

Mutantes con alteraciones en su pigmentación (Defpig)

Estos mutantes se seleccionaron por simple observación directa de las placas, encontrando dos mutantes de color verde amarillento (Fig. 66).

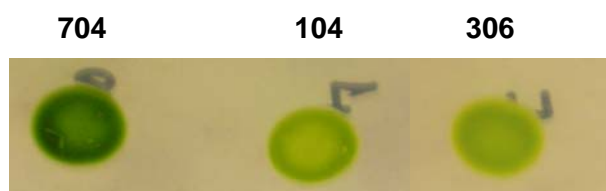


Fig. 66. Mutantes deficientes en pigmentos. Foto de mutante Defpig 306 y DefPig 104, deficientes en pigmentos, en comparación con el 704.

Estos mutantes que habían sido aislados en oscuridad y en presencia de paromomicina se subcultivaron en placas de medio TAP con paromomicina 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en oscuridad y en pequeños volúmenes de medio TAP, en oscuridad y

agitación, para su caracterización fenotípica detallada. Además, ambos mutantes resultaron sensibles a alta intensidad de luz ($700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) como se muestra más adelante.

Para su caracterización fenotípica se estimó el número de células y se determinó espectrofotométricamente el contenido en pigmentos (Tabla VIII), tal y como se detalla en Materiales y Métodos. Estos resultados confirmaron el menor contenido en pigmentos de estos dos mutantes respecto al control 704.

Tabla VIII. Caracterización fenotípica de los mutantes deficientes en pigmentos

Muestra	Nº cel/ml	Chl a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Chl b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Chl total (pg cel^{-1})	Carotenos (pg cel^{-1})
704	$0,19 \times 10^7$	2,78	1,27	4,06	0,39
Defpig 104	6×10^7	1,44	0,924	0,039	1×10^{-2}
Defpig 306	$9,3 \times 10^7$	1,75	1,20	0,032	7×10^{-3}

Tabla donde se muestra la caracterización de dos mutantes deficientes en pigmentos, 104 y 306, en comparación con un cultivo control de 704 crecido en las mismas condiciones que los mutantes. Los mutantes cultivaron en 2 ml de medio TAP en oscuridad y con agitación durante 7 días. El número de células ($\text{N}^\circ \text{ cel ml}^{-1}$) se determinó con la cámara de Neubauer. Los pigmentos se determinaron espectrofotométricamente: clorofila a (Chl a), clorofila b (Chl b), clorofila total (Chl a + Chl b) y carotenos totales.

Mientras que en el cultivo control de 704, crecido en las mismas condiciones de oscuridad, la concentración de clorofila y carotenoides totales rondaba los 2,1 y 0,39 pg cel^{-1} respectivamente, en los dos mutantes aislados la concentración de clorofila y carotenoides era unas 50 veces menor, con valores de 0,039 y 0,01 respectivamente para el mutante Defpig 104, y de 0,032 y 0,007 pg cel^{-1} de clorofila y carotenoides en el mutante Defpig 306. Estos valores confirman el fenotipo visible que presentaban estos dos mutantes.

Mutantes sensibles a la luz

Las colonias aisladas y resistentes a paromomicina se cultivaron en un pequeño volumen de medio TAP líquido a muy baja intensidad luminosa ($25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Cuando los cultivos adquirieron suficiente densidad celular se concentraron 10 veces y se inocularon en forma de gotas de $25 \mu\text{l}$ ordenadamente en dos placas de TAP con paromomicina $30 \mu\text{g ml}^{-1}$. Una de las placas se mantuvo en oscuridad para conservar las colonias y la otra réplica se expuso a altas intensidades de luz ($700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En este caso, la luz era suministrada por un foco halógeno (Fig. 67) de intensidad regulable, que atravesaba un baño termostatzado conectado a un criostato. De este modo se evitaba el sobrecalentamiento de las placas, manteniéndose una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

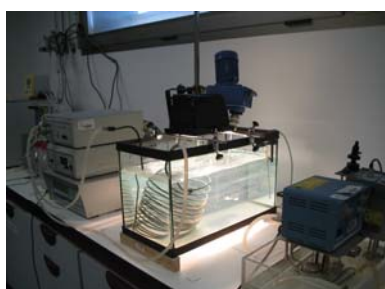


Fig. 67. Montaje para someter a los mutantes a altas intensidades de luz. Las placas con los mutantes se colocaban bajo focos halógenos de luz regulable. La alta temperatura se amortiguaba con un baño de agua conectado a un criostato que refrigeraba el agua a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Además se acoplaba un agitador para que el agua fría recirculase. La temperatura bajo el baño era de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, y la luz que llegaba a las placas de $700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las células control de 704 se sometieron al mismo tratamiento. De los mutantes sometidos a altas intensidades de luz, encontramos dos fenotipos: mutantes que sufrían blanqueamiento y mutantes incapaces de crecer.

Mutantes que sufrían blanqueamiento

Seleccionamos dos mutantes que tras 48 horas de exposición a altas intensidades de luz sufrían fotoblanqueamiento o “Photobleaching” (Fig. 68). El fotoblanqueamiento comenzaba cuando permanecían más de 24 horas en alta luz, y era reversible, es decir, recuperaban su color característico y su composición de pigmentos cuando se crecían en luz baja o en oscuridad.

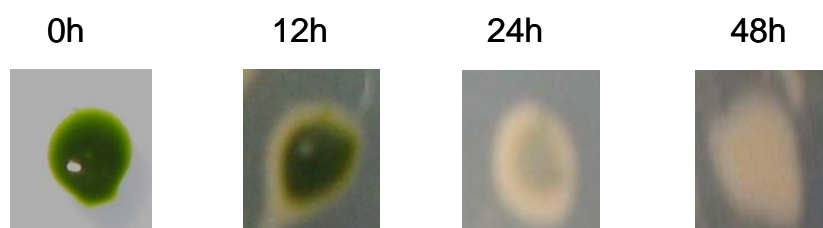


Fig. 68. Mutantes sensibles a la luz que sufren “Photobleaching”. Colonia de un mutante aislado que sufre “fotobleaching” cuando se expone a altas intensidades de luz. El fotoblanqueamiento es progresivo y reversible. 0, 12, 24 y 48 indican las horas de exposición a la luz alta ($700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Mutantes incapaces de crecer bajo altas intensidades de luz

Tras 24 horas de exposición a luz de alta intensidad ($700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) el control no transformado (704) y la mayoría de los transformantes estudiados experimentaron un activo crecimiento, pero encontramos algunos transformantes incapaces de sobrevivir en estas condiciones de alta irradiancia.

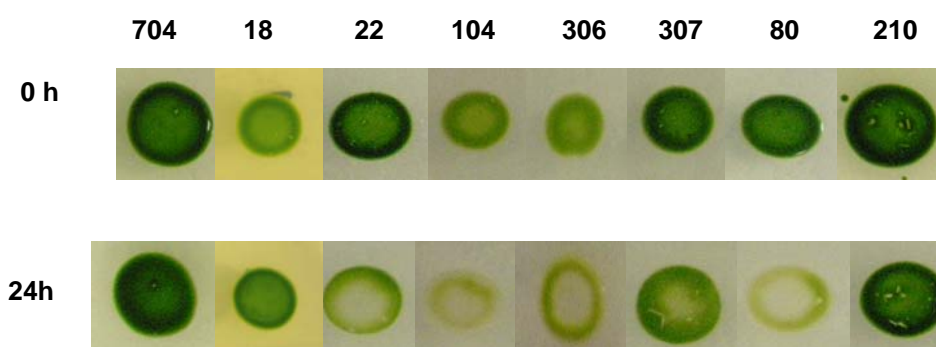


Fig. 69. Mutantes sensibles a alta intensidad de luz. Mutantes que tras 24 horas de exposición a altas intensidades de luz ($700 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no son capaces de crecer.

4.3. APROXIMACIÓN A LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS MUTANTES AISLADOS

Para la identificación de las regiones genómicas adyacentes al DNA marcador utilizado para la transformación se han descrito diferentes métodos, algunos de los cuales necesitan mucho tiempo y esfuerzo, (Tam y Lefebvre 1993; Yoshioka *et al.*, 2004). Nosotros elegimos para este fin la RESDA-PCR (Restriction Enzyme Site-Directed Amplification PCR), técnica diseñada por el Dr. Emilio Fernández y su grupo (Gonzalez-Ballester *et al.*, 2005a) y descrita en Materiales y Métodos. Para ello partíamos de DNA genómico aislado a partir de 1ml de cultivo de los mutantes aislados, siguiendo el protocolo que se detalla en Materiales y Métodos.

La técnica RESDA-PCR se basa en el uso de cebadores degenerados y en varios ciclos de amplificación. En el primer ciclo de amplificación se utilizaron los cebadores RB1 y RB3 (Fig. 70), específicos para el gen *AphVIII*, en combinación con los cuatro cebadores degenerados (Tabla IX). Se utilizaron en reacciones separadas para cada cebador degenerado. Para amplificar la región anterior del

genoma adyacente al gen marcador en el caso de utilizar en cebador RB3, y para amplificar la región posterior del genoma adyacente al gen marcador en el caso de usar el cebador RB1 (Fig. 70).

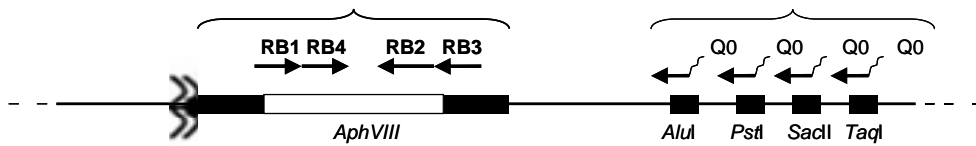


Fig.70. Cebadores utilizados en el primer ciclo de amplificación de la RESDA PCR

Las bandas obtenidas en esta primera amplificación se cortaron y purificaron, y sirvieron como molde para una segunda ronda de amplificación. En la segunda amplificación se utilizaron los cebadores RB4 (para las muestras amplificadas con el cebador RB1 en la primera ronda de amplificación) y RB2 (para las muestras amplificadas con el cebador RB3 en la primera ronda de amplificación) (Fig. 69) en combinación con el cebador universal Qo (Tabla IX). Esta segunda ronda nos permitió confirmar la especificidad de los productos obtenidos y obtener más cantidad de inserto.

Tabla IX. Cebadores utilizados para la RESDA PCR

Cebador	Secuencia (5'-3')
RB1	AGCTGGCCCACGAGGAGGAC
RB2	CCAGAGCTGCCACCTTGACA
RB3	CTTCCATCCACCGCCGTTTCGTCA
Q0	CCAGTGAGCAGAGTGACG
Deg <i>AluI</i>	CCAGTGAGCAGAGTGACGIIIIIIINNSWCAGCTT
Deg <i>PstI</i>	CCAGTGAGCAGAGTGACGIIIIIIINNSCTGCAGW
Deg <i>SacII</i>	CCAGTGAGCAGAGTGACGIIIIIIINNSCCGCGGW
Deg <i>TaqI</i>	CCAGTGAGCAGAGTGACGIIIIIIINNSWGTCGAA

Siendo W, A+T; S, G+C; N, A+T+G+C; I, inosina

Las condiciones para los ciclos de amplificación utilizados fueron los propuestos por Liu y Whittier (Liu y Whittier 1995; González-Ballester *et al.*, 2005a). Cada PCR se llevó a cabo para un volumen final de 25 μ l conteniendo: 0,2 pmol de cada cebador, 0,2 mM dNTPs, 0,5 U Taq polimerasa de biotools, 2,5 del buffer para la polimerasa, 50-100 ng de DNA y 2-3% de DMSO.

Amplificación I: RB1 ó RB3 + Deg *AluI* + Deg *PstI* + Deg *SacII* + Deg *TaqI*

Amplificación II: RB4 ó RB2 + Q₀

En el caso de la mutagénesis con el plásmido linearizado, como es el caso de los mutantes que sufren "*photoblacling*" y algunos mutantes incapaces de crecer bajo altas intensidad de luz, en la primera ronda se amplificó una única banda de 800 kb en varias calles que se visualizaron en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, se aislaron y purificaron, y se tomó 1 μ l como molde para la segunda ronda de PCR. En esta segunda amplificación se obtuvieron las mismas bandas que en la primera amplificación, para los mismos mutantes. El resultado se visualizó en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Fig.71). En todos los casos las bandas fueron obtenidas con el cebador RB1 y degenerado Deg *TaqI* y además, todas tenían exactamente el mismo tamaño. Las bandas se aislaron, purificaron, se ligaron a pGEM-T y se mandaron secuenciar. La secuenciación nos confirmó tal y como temíamos que el fragmento amplificado era en realidad el propio plásmido pSI104 y no una región del DNA genómico.

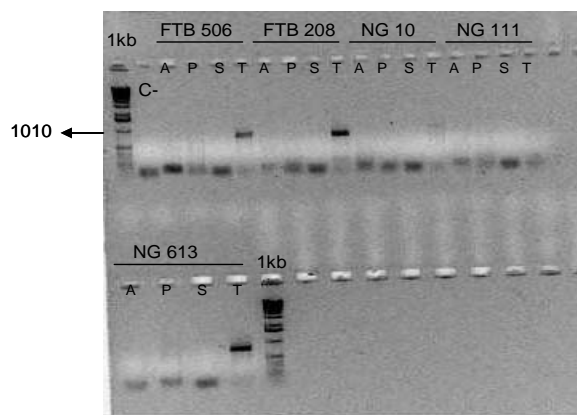


Fig. 71. Resultado de la segunda ronda de amplificación de la RESDA PCR. Gel de electroforesis teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas amplificadas en la segunda ronda de la RESDA PCR, con los cebadores RB4 y Q0. 1kb: marcador de peso molecular; FTB 506, FTB 208, NG10, NG111 y NG 613 son los mutantes estudiados; A (Deg *AluI*), P (Deg *PstI*), S (Deg *Sac I*) y T (Deg *TaqI*) indican los cebadores utilizados, en combinación con RB1, en la primera ronda de amplificación.

Un análisis del mapa pS104 ponía de manifiesto que efectivamente hay un sitio de corte para la enzima *Taq*, unas 800 bases después del sitio de hibridación del cebador RB1 en el cassette. En este caso, el uso del plásmido linearizado dificulta la amplificación de las regiones genómicas que flanquean el inserto si utilizamos cebadores específicos para el gen *AphVIII*.

En el caso de la mutagénesis con el cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII* se estudiaron los mutantes 104 y 306 deficientes en pigmentos. En la primera ronda de amplificación se obtuvieron varias bandas (Fig.72) que se visualizaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las bandas mayores de 450 pb amplificadas con el cebador RB1 y los degenerados, y las mayores de 1.648 pb amplificadas con el cebador RB3 y los degenerados se cortaron y se mandaron secuenciar. Las bandas menores de estos tamaños tienen mucha posibilidad de corresponder a la propia secuencia insertada, que presenta varios sitios de corte para *AluI* y *TaqI*.

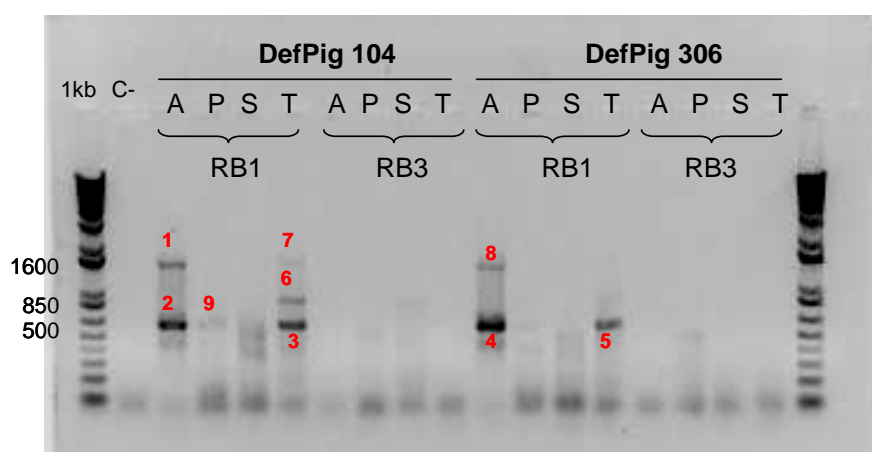


Fig. 72. Resultado de la primera ronda de amplificación de la RESDA-PCR. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio donde se visualizan las bandas obtenidas en la primera ronda de amplificación de la RESDA-PCR. Bandas amplificadas a partir del DNA genómico aislado de los mutantes DefPig 104 y 306. RB1 y RB3 indican los cebadores utilizados en cada caso. A: cebador degenerados *AluI*; P: cebador degenerado *PstI*; S: cebador degenerado *ScaII* y T: cebadores degenerado *TaqI*. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8 y 9 representan las bandas de interés.

De las bandas enviadas sólo fue posible secuenciar la 6 (Fig. 72); banda amplificada con el cebador RB1 y el degenerado *TaqI* en el mutante 104 deficiente en pigmentos. Esta secuencia, de 488 pb (Fig. 73), se comparó con las base de datos de *Chlamydomonas* ([www. Chlamy.org](http://www.Chlamy.org)) lo que nos permitió identificar la secuencia del genoma que había sido interrumpida por el gen marcador, como el fragmento 213.212-213.576 del scaffold 29 (versión 3.0 del genoma de *Chlamydomonas*, JGI) con un 98,78% de identidad (Fig. 74).

GTCGCGTCCGGTGGTGGCGGCGTCTTCTATGGCGTGGAGTAGATTTGGACTTGCCGTTCCGGTATT
 GCGGCCTCTGANAAAGCCTTCTTGTGACTCCGTGAAGATGTGGGCTTGTTCGCTAAACAGGGCGGC
 ATTCACAGTGATGAGGGAGGTATACAGCTTGTAGAGGGTGTTCGCCAGCGCGATGGGCCGCTTATT
 CTGTATCAGCAGGGGTCTCCTTTTTGGGTAAGAGGACGGTGTCCGACTGTGTCCAGTGTGTAGG
 GATGTGCGCTTTTACCCACATGAGAGTCATGAGTTGGTGTATGGCTGTTTGTAGGCTGGTGGGTNTN
 GNCTGNNNNNTTCGTTCCGGTATCCGTCGGGTCGCCGGGCTTTCGNNNANACNGGTGGTTGAC
 GCANCCAAAGAATGNGGNGCTGTCANCNATNCCTGGCAGTAAGGNGCGGGTGCCTCGGTTGGCT
 TAAATAGGGNCGGNATTTCCGTCGGGN

Fig. 72. Secuencia de la banda 6 amplificada por RESDA-PCR. Secuencia de la banda 6, amplificada por RESA-PCR en un primera ronda de amplificación con los cebadores RB1 y el degenerado *TaqI* en el mutante 104 deficiente en pigmentos.

La imposibilidad de aislar bandas correspondientes a las parejas de cabadores RB3/Deg nos impide conocer la región del genoma que flanquea la inserción por el otro lado y por tanto determinar exactamente el tamaño del área genómica posiblemente delecionada o reordenada como consecuencia de la inserción.

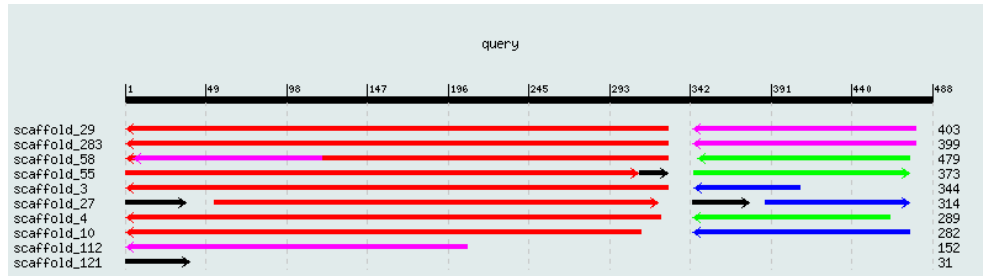


Fig.73. Localización de la mutación. Blast nucleótido-nucleótido realizado entre la secuencia de la banda 6 y la base de datos de *Chlamydomonas* (versión 3.0) para localizar la mutación en el mutante 104 deficiente en pigmentos.

Concretamente, la región donde se ha insertado el gen marcador corresponde al final del contig 24 del scaffold 29. Aparentemente el punto de inserción del marcador no se corresponde exactamente con ningún gen asignado como tal, aunque analizando los 3 contigs posteriores – 25, 26 y 27- y el contig

24 casi completo, obtenemos homología con el gen *ezy2* (AF399653.1) (Ferris *et al.*, 2002). Pudiendo concluir que en el mutante DefPig 104 la mutación se localiza en este gen, que según Ferris y colaboradores, participa en la herencia uniparental del DNA cloroplástico.

Actualmente se están analizando el resto de los mutantes de la colección obtenida.

4.4. DISCUSIÓN

La generación de mutantes blancos por mutagénesis tradicional y su caracterización genética mapeando los sitios de inserción por cruces genéticos ha permitido la obtención de mucha información sobre la síntesis de carotenoides, sobre el ciclo de las xantofilas y su papel en la respuesta al estrés oxidativo (Nigoyi *et al.*, 2001). Pero esta metodología es tediosa y difícil de aplicar a la caracterización de un gran número de mutantes.

La generación de mutantes etiquetados con un gen marcador por mutagénesis insercional, junto a la mejora de la metodología para secuenciar las secuencia genómicas que flanquean los sitios de inserción (González-Ballester *et al.*, 2005a) y la disponibilidad de versiones más completas de las secuencias genómicas de *Chlamydomonas* (Merchant *et al.*, 2007) y otros organismos relacionados (<http://genome.jgi-psf.org/>) permite la fácil generación, selección y caracterización de mayor número de mutantes. Este tipo de mutagénesis utilizada a gran escala ha permitido la obtención de extensas mutatecas cuyo escrutinio se ha utilizado para estudios de genómica funcional en procesos tan diversos como fotosíntesis y estrés fotooxidativo (Dent *et al.*, 2005), fototaxis (Pazour *et al.*, 1996), metabolismo del nitrógeno (González-ballester *et al.*, 2005b; Prieto *et al.*, 1996) metabolismo del azufre (Pollock *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 1996), producción de H₂ (Posewitz *et al.*, 2004), etc.

El número de mutantes de la colección debe ser bastante elevado; según Pazour y Witman (Pazour y Witman 2000), considerando el tamaño del genoma de *Chlamydomonas*, y el rango de delección descrito cuando el DNA se integra, estiman que 60.000 transformantes es un número razonable de escrutinio para obtener una probabilidad del 95% de que la mutación no afecte a un gen no letal. Este número se estima para una delección de 5 kb, pero podría cambiar significativamente si se considera otro rango de delección. Así, a mayor número de mutantes obtenidos, mayor será la probabilidad de obtener alguno de interés, ya que en ocasiones puede ocurrir que el marcador se inserte en una región no codificante o en un gen no esencial.

Aunque nuestra aproximación es bastante reducida, contando tan sólo con 1100 mutantes, la metodología y la puesta a punto de las técnicas nos permitirán en un futuro próximo realizar mutatecas mayores.

IV. CONCLUSIONES

Tras el análisis y discusión de los resultados presentados en este trabajo podemos concluir:

1. El herbicida norflurazón es capaz de inhibir la desaturación del fitoeno en *Dunaliella bardawil*, impidiendo así la síntesis de carotenoides coloreados. La aplicación combinada de carencia de nitrógeno y concentraciones moderadas de norflurazón permite una importante acumulación del carotenoide incoloro fitoeno y altera todo el perfil de carotenoides de la microalga. Las células de *D. bardawil* ricas en β -caroteno están mejor protegidas frente a la radiación UV o las altas intensidades lumínicas que las células con niveles equivalentes de fitoeno.
2. En condiciones de estrés oxidativo y bloqueo de los primeros pasos de la ruta de síntesis de carotenoides, se produce una apreciable síntesis de zeaxantina a expensas de la violaxantina acumulada. Esta es la primera evidencia de funcionamiento del ciclo de las xantofilas en *D. bardawil*.
3. Los plásmidos pSI105 y pSI104PKLpNia1, construidos durante el desarrollo de este trabajo, basados en el promotor constitutivo de la subunidad pequeña de la rubisco y en el promotor inducible de la nitrato reductasa respectivamente, permiten la expresión de genes exógenos en *Chlamydomonas reinhardtii*.
4. La transformación de células de *C. reinhardtii* con plásmidos binarios que contienen un gen de interés y un gen marcador, incrementa notablemente el porcentaje de transformantes que integran ambos genes en su genoma, con respecto a la cotransformación con dos genes que se localizan en dos plásmidos independientes.
5. El silenciamiento génico pos-transcripcional del gen de la fitoeno desaturasa, *pds*, nos ha permitido obtener transformantes con reducidos niveles de expresión para dicho gen. El uso de construcciones antisentido, así como de repeticiones inversas resultó válido, aunque en ninguno de los casos observamos silenciamiento total. Los shRNA resultantes de las construcciones con repeticiones inversas fueron más eficientes.

6. La técnica qPCR a tiempo real nos permitió seleccionar 5 transformantes en los que el nivel de transcrito del gen *pds* era menor del 20% de su nivel en las células control no transformada. Sorprendentemente, ninguno de ellos presentaba una alteración en la concentración de carotenoides coloreados, ni acumulación de fitoeno, lo que apoya la existencia de una segunda isoforma para la enzima PDS. Esta posibilidad, que durante el desarrollo de este trabajo era solo una hipótesis, se ha confirmado con la reciente publicación de la cuarta versión del genoma de *Chlamydomonas*.

7. La transformación de células de *C. reinhardtii* con el cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*, que lleva el gen de resistencia a paromomicina, y el aislamiento de los transformantes en presencia del citado antibiótico y en oscuridad, nos ha permitido obtener una pequeña colección de mutantes etiquetados, entre los que hemos seleccionado algunos de ellos sensibles a la luz y otros deficientes en pigmentos.

8. La técnica REDSA-PCR nos permitió localizar la inserción del cassette *Hsp70A:rbcS2:AphVIII*, mediante el uso de cebadores degenerados. Y tras la secuenciación de las bandas amplificadas con esta técnica hemos podido identificar el gen interrumpido en cada mutante.

V. BIBLIOGRAFÍA

Abalde J., Cid A., Fidalgo P., Torres E., Herrero C. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de la Coruña (España). 119-41, 75-91.

Apt KE., Kroth-Pancic PG., Grossman AR. (1996). *Stable nuclear transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum*. Molec Gen Genet. 252: 572-57.

Aravin A. y Tuschl T. (2005). *Identification and characterization of small RNA involved in RNA silencing*. FEBS Lett. 579: 5830-5840.

Armstrong GA. (1997). *Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale*. Annu. Rev. Microbiol. 51: 629-659.

Arnon DI. (1949). *Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta vulgaris*. Plant Physiol. 24 (1): 1-15.

Asano Y., Otsuki Y., Ugaki M. (1991). *Electroporation-mediated and silicon carbide-fiber-mediated DNA delivery in Agrostis alba L. (Redtop)*. Plant Sci. 79: 247-252.

Auchincloss AH., Lorocho AI., Rochaix JD. (1999) *The argininosuccinate lyase gene of Chlamydomonas reinhardtii: cloning of the cDNA and its characterization as a selectable shuttle marker*. Mol. Gen. Genet. 261: 21-30.

Ayala F., Vargas T., y Cardenas A. (1987) *Chilean Experiences on Microalgae Culture*. Algal Biotechnology, Stadler T., et al. Eds., London: Elsevier. pp. 229-236.

Baroli I. y Niyogi KK. (2000). *Molecular genetics of xanthophyll-dependent photoprotection in green algae and plants*. Phi Trans Royal Soc of London Series B: Biological Sci. 355 (1402): 1385-1394.

Baroli I., Gutman B.J., Ledford H.K., Shin J.W., Chin B.L., Havaux M. y Niyogi KK. (2003a). *Photo-oxidative Stress in a Xanthophyll-deficient Mutant of Chlamydomonas*. J. Biol. Chem. 279 (8): 6337-6344.

Baroli I., Do AD., Yamane T., y Niyogi KK. (2003b). *Zeaxanthin Accumulation in the Absence of a Functional Xanthophyll Cycle Protects Chlamydomonas reinhardtii from Photooxidative Stress*. Plant Cell. 15: 992-1008.

Baulcombe D. (2004). *RNA silencing in plants*. Nature 431 (7006): 356-363.

Becker W. (2004). *Microalgae in human and animal nutrition*. In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Richmond A. (Ed). London: Blackwell Science: 312-351.

Ben-Amotz A. (1996). *Effect of low temperature on the stereoisomer composition of β -carotene in the halotolerant alga Dunaliella bardawil (Chlorophyta)*. J. Phycol. 32: 272-275.

Ben-Amotz A. (2002). *Biomass production of phytoene/phytofluene, colorless carotenoids by Dunaliella from the laboratory through micro-ponds, mass scale, nutritioanl and clinical evaluation*. I Congress of International Society for Applied Phycology. Almeria (España).

Ben-Amotz A. y Avron M. (1983). *On the factors which determine the massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 72: 593–597.

Ben-Amotz A. y Avron M (1990). *The biotechnology of cultivating the halotolerant alga Dunaliella*. Trens Biotechnol. 8:121-126.

Ben-Amotz A., Gressel J., Avron M. (1987). *Massive accumulation of phytoene induced by norflurazón in Dunaliella bardawil (Chlorophyceae) prevents recovery from photoinhibition*. J. Phycol. 23: 176-181.

Berstein E., Caudy AA., Hammond SM. y Hannon GJ. (2001). *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature 409 (6818): 363-366.

Berthold P., Schmitt R., Mages W. (2002). *An engineered Streptomyces hygrosopicus aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in Chlamydomonas reinhardtii*. Protist. 153(4): 401-12.

Bohne F. y Linden H. (2002). *Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in Chlamydomonas reinhardtii*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression 1579 (1): 26-34.

Borowitzka LJ. y Borowitzka MA. (1990) *Commercial production of β -carotene by D. salina in open ponds*. Bull Mar. Sci. 47: 244-252.

Borowitzka MA. (1994). *Large-scale algal culture systems: the next Generation*. Australas Biotechnol. 4(4):212-5.

Borowitzka AM. (1995). *Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds*. J. Appl. Phycol. 7: 3-15.

Borowitzka MA. (1997). *Algae for aquaculture: Opportunities and constraints*. J. Appl. Phycol. 9: 393-401.

Botella-Pavía P. y Rodríguez-Concepción M. (2006). *Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods*. Physiol. Plant. 126: 396-381.

Breitenbach J., Misawa N., Kajiwara S., Sandmann G. (1996). *Expression in Escherichia coli and properties of the carotene ketolase from Haematococcus pluvialis*. FEMS Microbiol Lett. 140(2-3): 241-6.

Breitenbach J., Zhu C. y Sandmann G. (2001). *Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors*. J. Agrc. Food Chem. 49(11): 5270-5270.

Brummelkamp TR., Bernards R., Agami R. (2002). *Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference*. *Cancer Cell*. 2(3): 243-247.

Burkhardt PK., Beyer P., Wünn J., Klöti A., Armstrong GA., Schledz M., von Lintig J., Potrykus I. (1997). *Transgenic rice (Oryza sativa) endosperm expressing daffodil (Narcissus pseudonarcissus) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis*. *Plant J*. 11(5): 1071-8.

Cerutti H., Ibrahim F., Casas-Mollano A., Kim EJ., Becker J., Ma X., y E. Balassa. (2008). *Small RNA-guided gene silencing pathways in Chlamydomonas*. Book of Abstracts of EMBO Workshop on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas* (Francia) pg 69.

Cerutti H., Johnson AM., Gillham NW., y Boynton JE. (1997). *A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on Chlamydomonas reinhardtii: integration into the nuclear genome and gene expression*. *Genetics* 145: 97-110.

Coesel SN., Baumgartner AC., Teles LM., Ramos AA., Henriques NM., Cancela L., Varela JC. (2008). *Nutrient Limitation is the Main Regulatory Factor for Carotenoid Accumulation and for Psy and Pds Steady State Transcript Levels in Dunaliella salina (Chlorophyta) Exposed to High Light and Salt Stress*. *Mar Biotechnol (NY)*.10(5): 602-11.

Colla LM., Bertolin TE. y Vieira-Costa JA. (2004). *Fatty Acids Profile of Spirulina platensis Grown Under Different Temperatures and Nitrogen Concentrations*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. 59: 55-59.

Chamovitz D., Sandmann G., y Hirschberg J. (1993). *Molecular and Biochemical Characterization of Herbicide-resistant Mutants of Cyanobacteria Reveals That Phytoene Desaturatiolsn a Rate-limiting Step in Carotenoid Biosynthesis* *J. Biol. Chem.* 268 (23): 17348-17353.

- Chang M., Li F., Odom OW., Lee J., y Herrin DL. (2003). *A cosmid vector containing a dominant selectable marker for cloning Chlamydomonas genes by complementation*. Plasmid 49: 75-78.
- Chen Y., Wang Y., Sun Y., Zhang L., Li W. (2001). *Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in Chlorella ellipsoidea cells*. Curr Genet. 39: 365-370.
- Chuang CF. y Meyerowitz EM. (2000). *Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 97: 4985-4990.
- Cordero BF., Martin L., Obraztsova I., Vargas MA. y Rodríguez H. (2006). *High lutein production by a strain of the chlorophycean microalga Chlorella sp.* En: Pigments in Food, a Challenge of Life Sciences (Dufossé L., ed.), pp. 197-199.
- Cunningham FX. y Gantt E. (1998). *Genes and Enzymes of carotenoid biosynthesis in plants*. Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 49: 557-83.
- Davies JP., Yildiz FH., Grossman A. (1996). *Sac1, a putative regulator that is critical for survival of Chlamydomonas reinhardtii during sulfur deprivation*. EMBO J. 15: 2150-2159.
- Debuchy R., Purton S., Rochaix JD. (1989). *The argininosuccinate lyase gene of Chlamydomonas reinhardtii: An important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus*. EMBO J. 8: 2803-2809.
- Del Campo JA., Moreno J., Rodríguez H., Vargas MA., Rivas J. y Guerrero MG. (2000). *Carotenoid content of chlorophycean microalgae. Factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp (Chlorophyta)*. J. Biotechnol. 76: 51-59.

Del Campo JA., Rodríguez H., Moreno J., Vargas MA., Rivas J. y Guerrero MG. (2001). *Lutein production by Muriellopsis sp. in an outdoor tubular photobioreactor*. J. Biotechnol. 85: 289-295.

Del Campo JA., Rodríguez H., Moreno J., Vargas MA., Rivas J. y Guerrero MG. (2004). *Accumulation of astaxanthin and lutein in Chlorella zofingiensis (Chlorophyta)*. Applied Microbiol. Biotechnol. 64: 848-854.

Demmig-Adams B. y Adams III W.W. (2002). *Antioxidants in photosynthesis and human nutrition*. Science 298: 2149-2153.

Demming-Adams B., Gilmore AM., Adams III WW. (1996). *In vivo functions of carotenoids in higher plants*. FASEB J. 10: 2149-2153.

Dent R., Haglund C., Chin BL., Kobayashi MC., Niyogi KK. (2005). *Functional genomics of eukaryotic photosynthesis using insertional mutagenesis of Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol 137: 545–556

Di Mascio P., Raiser S., Sies H. (1989). *Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher*. Archives of biochemistry and biophysics 274(2): 532-538.

Duerr EO., Eiriz O., Mólnar A., Sato V. (1989). *Cultured microalgae as aquaculture feeds*. J. Mar. Biotechnol. 7:65-70.

Dunahay TG. (1993). *Transformation of Chlamydomonas reinhardtii with silicon carbide whiskers*. Biotechniques 15(3): 452-5, 457-8.

Dunahay TG., Jarvis EE., y Roessler PG. (1995). *Genetic transformation of the diatoms Cyclotella cryptica and Navicula saprophila*. J Phycol 31: 1004-1012.

Dykxhoorn DM., Novina CD., Sharp PA. (2003). *Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 457-467.

Eberhard S., Jain M., Im Ch-S., Pollock S., Shrager. J., Lin Y., Peek AS y Grossman AR. (2006). *Generation of an oligonucleotide array for analysis of gene expression in Chlamydomonas reinhardtii*. Curr Genet. 49: 106-124.

Eisenreich W., Bacher A., Arigoni D., y Rohdich F. (2004). *Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) 61(12): 1401-1426.

Eom H., Lee CG., Jin E. (2006). *Gene expression profile analysis in astaxanthin-induced Haematococcus pluvialis using a cDNA microarray* Planta 223: 1231-1242.

Eonseon J., Polle JEW., Lee HK., Hyun SM. y Chang M. (2003). *Xanthophylls in Microalgae: From Biosynthesis to Biotechnological Mass Production and Application*. Microbiol. Biotechnol. 13(2): 165-174.

Fan L., Vonshak A., Gabbay R., Hirshberg J., Cohen Z. y Boussiba S. (1995). *The Biosynthetic Pathway of Astaxanthin in a Green Alga Haematococcus pluvialis as Indicated by Inhibition with Diphenylamine*. Plant and Cell Physiology 36 (8): 1519-1524.

Falciatore A., Casotti R., Leblanc C., Abrescia Ch., Bowler C. (1999). *Transformation of nonselectable reporter genes in Marine Diatoms*. Mar Biotechnol. 1: 239-251.

Fernández E., Galván A., Quesada A. (1998). *Nitrogen assimilation and its regulation*. In Molecular Biology of *Chlamydomonas*: chloroplast and Mitochondria. pp 637-659. (JD Rochaix et al eds) Kluwer Acad Pub, Netherlands.

Fernández E., Schnell R., Ranum LP., Hussey SC., Silflow CD., Lefebvre PA. (1989). *Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci U.S.A 86(17): 6449-6453.

Ferris PJ., Armbrust EV., Goodenough UW. (2002). *Genetics structure of the mating-type locus of Chlamydomonas reinhardtii*. Genetics 160 (1): 181-200.

Field CB., Behrenfeld MJ., Randerson JT., Falkowski P. (1998). *Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components*. Science 281: 237-240.

Fire A., Albertson D., Harrison SW., Moerman DG. (1991). *Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in C. elegans muscle*. Development 113: 503-514.

Fire A., Xu S., Montgomery MK., Kostas SA., Driver SE., y Mello CC. (1998). *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature 391: 806-811.

Fischer H., Robl I., Sumper M, Kröger N. (1999). *Targeting and covalent modification of cell wall and membrane proteins heterologously expressed in the diatom Cylinthrotheca fusiformis*. J Phycol 35: 113-120

Fraser PD., Romer S., Shipton CA., Mills PB., Kiano JW., Misawa N., Drake RG., Schuch W. y Bramley PM. (2002). *Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit- specific manner*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 1092-1097.

Fray RG., Wallace A., Fraser PD., Valero D., Hedden P., Bramley PM. y Grierson D. (1995). *Constitutive expression of a fruit phytoene synthase gene in transgenic tomatoes causes dwarfism by redirecting metabolites from the gibberellin pathway*. Plant J., 8: 693-701.

Fuhrmann M. (2001). *Expanding the molecular toolkit for Chlamydomonas reinhardtii from history to new frontiers*. Protist.153(4):357-64.

Galván A., González-Ballester D., Fernández E. (2007). *Insertional mutagenesis as a tool to study genes/functions in Chlamydomonas*. Adv Exp Med Biol. 616: 77-89.

García-González M., Manzano JC., Moreno J. y Guerrero MG. (2000). *Biotechnología del cultivo de Dunaliella salina en el litoral andaluz*. Colección Pesca y Acuicultura 160. Junta de Andalucía, Conserjería de Agricultura y Pesca.

Geng D., Wang Y., Wang P., Li W., Sun Y. (2003). *Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in Dunaliella salina*. J. Appl Phycol. 15: 451-456.

Gerjets T. y Sandmann G. (2006). *Ketocarotenoid formation in transgenic potato*. Journal of Experimental Botany 57(14): 3639-3645.

Ghirardi ML., Zhang L., Lee JW., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E y Melis A. (2000). *Microalgae: a green source of renewable H₂*. Trends Biotechnol. 18(12): 506-511.

Ghirardi ML. (2006). *Hydrogen production by photosynthetic green algae*. Indian J Biochem Biophys. 43(4): 201-10.

Giuliano G., Aquilani R., Dharmapuri S. (2000). *Metabolic engineering of plant carotenoids*. Trends in Plant Sci 5: 405-407.

González-Ballester D., de Montaigu A., Galván A., Fernández E. (2005a). *Restriction enzyme site directed amplification (RESDA)-PCR: a tool to identify regions flanking a marker DNA*. Anal Biochem. 340: 330-335.

González-Ballester D., de Montaigu A., Higuera JJ., Galván A. (2005b). *Functional genomics of the regulation of the nitrate assimilation pathway in Chlamydomonas*. Plant Physiol. 137: 522-533.

Gordon HT. y Bouernfeind JC. (1982). *Carotenoids as food colorants*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 18-59.

Grossman AR. (2007). *In the grip of algal genomics*. Adv Exp Med Biol. 616: 54-76.

Grossman AR., Harris EE., Hauser C., Lefebvre PA., Martinez D., Rokhsar D., Shrager J., Silflow CD., Stern D., Vallon O., y Zhang Z.. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii at the crossroads of genomics*. Eukaryotic cell. 2(6): 1137-1150.

Grossman AR., Lohr M. y Im CS. (2004). *C. reinhardtii in the landscape of pigments*. Annu Rev Genet. 38: 119-73.

Grünwald K., Eckert M., Hirschberg J., Hagen C. (2000). *Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in Haematococcus pluvialis (Volvocales, chlorophyceae)*. Plant Physiol. 122(4): 1261-8.

Guerin M., Huntley ME. y Olaizola M. (2003). *Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition* Trends in Biotech. 21(5): 210-216.

Guo S. y Kempthues KJ. (1995). *par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed*. Cell 81(4): 611-620.

Hammond SM., Boettcher S., Caudy AA., Kobayashi R., Hannon GJ.(2001a). *Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi*. Science 293: 1146-1150.

Hammond SM., Caudy AA., Hannon GJ. (2001b). *Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA*. Nat Rev Genet. 2: 110-119.

Hannon GJ. (2002). *RNA interference*. Nature 418: 244-251.

Hannon GJ., Conklin DS. (2004). *RNA interference by short hairpin RNAs expressed in vertebrate cells*. Methods Mol Biol. 257: 255-66.

Harris EH. (1989) *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, San Diego, CA.

Harris EH. (2001). *Chlamydomonas as a model organism*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 52: 363-406.

Hawkins R., Nakamura M. (1999). *Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga Chlorella*. Curr Microbiol. 38: 335-341.

Hawthorne S. (1990). *Analytical-scale supercritical fluid extraction*. Analytical Chemistry 62(11): 633-642.

Hemschemeier A., Fouchard S., Cournac L., Peltier G., Happe T. (2007). *Hydrogen production by Chlamydomonas reinhardtii: an elaborate interplay of electron sources and sinks*. Planta 227(2): 397-407.

Hirschberg J. (2001). *Carotenoid biosynthesis in flowering plants*. Curr Opin Plant Biol 4: 210-218.

Huang JC., Chen F., Sandmann G. (2006). *Stress-related differential expression of multiple β -carotene ketolase genes in the unicellular green alga *H. pluvialis**. J. Biotechnol. 122: 176-185.

Hutner SH., Provosoli L., Schatz A., Haskins CP. (1950). *Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms*. Proc. Amer. Phil. Soc. 94: 152-170.

Hutvänger G., McLanchlan J., Bálint E., Tuschl T., Zamore PD. (2001). *A celular function for the RNA interference enzyme Dicer in small temporal RNA maturation*. Science 93: 834-838.

Isaacson T., Ronen G., Zamir D. y Hirschberg J. (2002). *Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants*. The Plant Cell. 14: 333-342.

Jaime-Ceballos B., Villerreal-Colmenares H., García-Galano T., Civera-Cerecero R., y Gaxiola-Cortes G. (2004). *Empleo del polvo de Spirulina Platenses en la alimentación de Zoeas y Mysis de Litopenaeus Schmitti*. (Pérez Farfante y Kensley, 1997). En: Cruz Suarez, L.E., Ricque Marie, D., Nieto López, M.G., Villarreal, D., Scholz, U. y González M. Avances en Nutrición Acuícola VII. Memorias del VII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Noviembre 2004. Hermosillo, Sonora, México.

Jarvis EE. y Brown LM. (1991). *Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga Chlorella ellipsoidea*. Curr Genet. 19: 317-321.

Johnson MK., Johnson EJ., McElroy RD., Speer HL., Bruff BS. (1968). *Effects of salt on the halophilic alga Dunaliella viridis*. J. Bacteriol. 95: 1461-1468.

Jones L., Ratcliff F., Baulcombe DC. (2001). *RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance*. Curr. Biol. 11(10): 747-57.

Kaepler HF., Gu W., Somers DA., Rines HW., Cockburn AF. (1990). *Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells*. Plant Cell Rep. 9: 415-418.

Kaeppeler HF., Somers DA., Rines HW., Cockburn AF. (1992). *Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells*. Theor and Appl Genet. 84: 560-566.

Kang CD. y Sim SJ. (2008). *Direct extraction of astaxanthin from Haematococcus culture using vegetables oils*. Biotechnol. Lett. (30): 441-444.

Kindle KL. (1990). *High-frequency nuclear transformation of Chlamydomonas reinhardtii*. Proc Natl Acad Sci USA. 87: 1228-1232.

Kindle KL., Schnell RA., Fernández E., Lefebvre PA. (1989). *Stable nuclear transformation of Chlamydomonas using the Chlamydomonas gene for nitrate reductase*. J Cell Biol. 109(6): 2589-601.

Kindle KL. (1998). *Nuclear transformation: technology and applications*. In The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas* (Rochaix, J.D. et al., eds), pp. 41-61, Kluwer Academic Publishers.

Koblenz B. y Lechtreck KF. (2005). *The Nit1 promoter allows inducible and reversible silencing of centrin in Chlamydomonas reinhardtii*. Eukariotic Cell. 4 (11): 1959-1962.

Kovar JL., Zhang J., Funke RP., Weeks DP. (2002). *Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of Chlamydomonas reinhardtii and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation*. Plant J. 29: 109-117.

Kumar SV., Misqitta RW., Reddy VS., Rao BJ., Rajam MV. (2004). *Genetic transformation of the green alga Chlamydomonas reinhardtii by Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci 166: 731-738.

Langridge P., Brown JWS., Pintor-Toro JA., Feix G., Neuhaus G., Neuhaus-Url G., y Schweiger HG. (1985). *Expresión of zein genes in Acetabulara mediterranea*. Eur. J. Cell Biol. 39: 257-64.

- Lau NC. y Bartel DP. (2003). *Sensors of the genome*. *Sci Am* 8: 34-41.
- Lee Y., Jean K., Lee J., Kim S., Kim VN. (2002). *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. *EMBO J.* 21: 4663-4670.
- Lee YK. y Zhang DH. (1999). *Production of astaxanthin by Haematococcus*. In: Cohen, Z. (ed.). *Chemicals from Microalgae*. Taylor & Francis Ltd., London (UK). pp: 173-195.
- Lee YS., Nakahara K., Pham JW., Kim K., He Z., Sontheimer EJ., Carthew RW. (2004). *Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathway*. *Cell* 117(1): 69-81.
- León R., Couso I., Fernández E. (2007a). *Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol.* 130(2):143-52.
- León R. y Fernández E. (2007b). *Nuclear transformation of eukaryotic microalgae: historical overview, achievements and problems*. *Adv Exp Med Biol.* 616: 1-11.
- León R., Garbayo I., Hernández R., Vígara J., Vílchez C. (2001). *Organic solvent toxicity in photoautotrophic unicellular microorganisms*. *Enzyme Microbiol Technol* 29: 173-180.
- León R., Martín M., Vígara J., Vílchez C., Vega JM. (2003). *Microalgae mediated photoproduction of β -carotene in aqueous-organic two phase systems*. *Biomol Eng* 20:177-182.
- León R., Vila M., Hernánz D., Vílchez C. (2005). *Production of phytoene by herbicide-treated microalgae Dunaliella bardawil in two-phase systems*. *Biotechnol. Bioeng.* 92(6): 695-701.

León R., González D., Galván A. y Fernández E. (2004). *Transgenic microalgae as green cell factories*. Trends Biotechnol. 22(1): 45-52.

Li Y., Horsman M., Wu N., Lan CQ. y Dubois-Calero N. (2008). *Biofuels from Microalgae*. Biotechnol. Prog. (Epub ahead of print).

Lichtenthaler HK. (1999). *The 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants*. Ann Rev of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 50: 47-65.

Linden H. (1999). *Carotenoid hydroxylase from Haematococcus pluvialis: cDNA sequence, regulation and functional complementation*. Biochim Biophys Acta. 1446(3): 203-12.

Lindgren LO., Stalberg KG., Höglund AS. (2003). *Seed-specific overexpression of an endogenous Arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid*. Plant Physiol 132(2): 779-85.

Lichtenthaler HK. (1987). *Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes*. Methods Enzymol. 148: 350-382.

Liu BH. y Lee YK. (2000). *Secondary carotenoids formation by the green alga Chlorococcum sp.* J. Appl. Phycol. 12: 301-307.

Liu YG., y Whittier RF. (1995). *Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking*. Genomics 25: 647-681.

Llamas A., Igeño MI., Galván A. y Fernández E. (2002). *Nitrate signalling on the nitrate reductase gene promoter depends directly on the activity of nitrate transport system in Chlamydomonas*. Plant J.30 (3): 261-271.

Loeblich LA. (1982). *Photosynthesis and pigments influence by light-intensity and salinity in the halophile Dunaliella salina (Chlorophyta)*. J Mar Bio Assoc UK 62: 493-508.

Lohr M., Im Ch-S., Grossman A. (2005). *Genome-Based Examination of Chlorophyll and Carotenoid Biosynthesis in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physio. 138: 490-515.

Lohuis MR. y Miller DJ. (1998). *Genetic transformation of dinoflagellates (Amphidinium and Symbiodinium): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs*. Plant J. 13: 427-435.

Loppes R., Radoux M., Ohresser MC. y Matagne RF. (1999). *Transcriptional regulation of the Nia1 gene encoding nitrate reductase in Chlamydomonas reinhardtii: effects of various environmental factors on the expression of a reporter gene under the control of the Nia1 promoter*. Plant Mol. Biol. 41: 701-711.

Lorenz RT. y Cysewski GR. (2000). *Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin*. Trends Biotechnol. 18: 433-435.

Lotan T. y Hirschberg J. (1995). *Cloning and expression in Escherichia coli of the gene encoding fl-C-4-oxygenase, that converts beta-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in Haematococcus pluvialis*. FEBS Letters 364: 125-128.

Love TM., Moffett HF., Novina CD. (2008). *Not miR-ly small RNAs: Big potential for microRNAs in therapy*. Journal of Allergy and Clinical Immunology. 121(2): 309-319.

Lü YM., Jiang GZ., Niu XL., Hou GQ., Zhang GX., Xue LX. (2005). *Cloning and functional analyses of two carbonic anhydrase genes from Dunaliella salina*. Acta Genet Sin 31: 1157-1166.

Lubián LM., Montero O., Moreno-Garrido I., Huertas IE., Sobrino C., González del Valle M. y Parés G. (2000). *Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments*. J. Appl. Phycol. 12: 249-255.

Lumbreras V., Stevens DR., Purton S. (1998). *Efficient foreign gene expression in Chlamydomonas reinhardtii mediated by an endogenous intron*. Plant J. 14: 441-447.

Macías-Sánchez MD., Mantell Serrano C., Rodríguez Rodríguez M., Martínez de la Ossa E., Lubián LM., Montero O. (2008). *Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent*. J Sep Sci. (8): 1352-62.

Mann V., Harker M., Pecker I. y Hirschberg J. (2000). *Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers*. Nat. Biotechnol. 18: 888-892.

Margalith PZ. (1999). *Production of ketocarotenoids by microalgae*. Appl Microbiol Biotechnol. 51(4):431-8.

Martínez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T. (2002). *Single-stranded antisense siRNA guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell 110: 563-574.

Maruyama M., Horakova I., Honda H. (1994). *Introduction of foreign DNA into Chlorella saccharophila by electroporation*. Biotechnol. Techn. 8: 821-826.

Matsuo T., Okamoto K., Onai K., Niwa Y., Shimogawara K., Ishiura M. (2008) *A systematic forward genetic analysis identified components of the Chlamydomonas circadian system* Genes Dev. 22(7): 825-31.

Matzke MA. y Birchler JA. (2005). *RNAi-mediated pathways in the nucleus*. Nat. Rev. Genet. 6 (1): 24-35.

McCarthy SS., Kobayashi MC. y Niyogi KK. (2004). *White Mutants of Chlamydomonas reinhardtii Are Defective in Phytoene Synthase*. Genetics 168 (3):1249-1257.

McDonnell MW., Simon MN. y Studier FW. (1977). *Analysis of Restriction Fragments of T7 DNA and Determination of Molecular Weights by Electrophoresis in Neutral and Alkaline Gels*. J. Mol. Biol. 110: 119-146.

McLaren DS., y Frigg M. (2001). *Sight and life manual on vitamin A deficiency disorders (VADD)*. Task Force SIGHT AND LIFE. Basel, Switzerland. [Grupo de Trabajo "Ver y Vivir". Basilea, Suiza.] <http://www.sightandlife.org> Page 6.

Meister G. y Tuschl T. (2004). *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. Nature 431 (7006): 343-349.

Mellis A., Seibert M y Ghirardi ML. (2007). *Hydrogen fuel production by transgenic microalgae*. Adv Exp Med Biol. 616: 110-121.

Merchant SS., Prochnik SE., Vallon O., Harris EH., Karpowicz SJ., Witman GB., Terry A., Salamov A., Fritz-Laylin LK., Maréchal-Drouard L., Marshall WF., Qu LH., Nelson DR., Sanderfoot AA., Spalding MH., Kapitonov VV., Ren Q., Ferris P., Lindquist E., Shapiro H., Lucas SM., Grimwood J., Schmutz J., Cardol P., Cerutti H., Chanfreau G., Chen CL., Cognat V., Croft MT., Dent R., Dutcher S., Fernández E., Fukuzawa H., González-Ballester D., González-Halphen D., Hallmann A., Hanikenne M., Hippler M., Inwood W., Jabbari K., Kalanon M., Kuras R., Lefebvre PA., Lemaire SD., Lobanov AV., Lohr M., Manuell A., Meier I., Mets L., Mittag M., Mittelmeier T., Moroney JV., Moseley J., Napoli C., Nedelcu AM., Niyogi K., Novoselov SV., Paulsen IT., Pazour G., Purton S., Ral JP., Riaño-Pachón DM., Riekhof W., Rymarquis L., Schroda M., Stern D., Umen J., Willows R., Wilson N., Zimmer SL., Allmer J., Balk J., Bisova K., Chen CJ., Elias M., Gendler K., Hauser C., Lamb MR., Ledford H., Long JC., Minagawa J., Page MD., Pan J., Pootakham W., Roje S., Rose A., Stahlberg E., Terauchi AM., Yang P., Ball S., Bowler C., Dieckmann CL., Gladyshev VN., Green P., Jorgensen R., Mayfield S., Mueller-

Roeber B., Rajamani S., Sayre RT., Brokstein P., Dubchak I., Goodstein D., Hornick L., Huang YW., Jhaveri J., Luo Y., Martínez D., Ngau WC., Otilar B., Poliakov A., Porter A., Szajkowski L., Werner G., Zhou K., Grigoriev IV., Rokhsar DS., Grossman AR.(2007). *The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions*. Science 318(5848): 245-50.

Mil'ko ES. (1963). *Effect of various environmental factors on pigment production in the alga Dunaliella salina*. Mikrobiologiya 32: 299-307.

Misawa N., Satomi Y., Kondo K., Yokoyama A., Kajiwara S., Saito T., Ohtani T., y Miki W. (1995). *Structure and functional analysis of a marine bacterial carotenoid biosynthesis gene cluster and astaxanthin biosynthetic pathway proposed at the gene level*. J. Bacteriol. 177: 6575-6584.

Mojaat M., Foucault A., Pruvost J., Legrand J. (2008). *Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of beta-carotene from Dunaliella salina*. J Biotechnol.133(4): 433-41.

Molnár A., Schwach F., Studholme D., Thuenemann E.C., y Baulcombe D. (2007). *miRNA control gene expression in the single-cell alga Chlamydomonas reinhardtii*. Nature 447: 1126-1130.

Muller N., Alteheld B., Stehle P. (2003). *Tomato products and lycopene supplements: mandatory components in nutritional treatment of cancer patients?* Curr Opin Clin Nutr Metab Care.6: 657-60.

Napoli CA., Lemieux C., Jogersen R. (1990). *Introduction of a chimeric chalcone synthetase gene in Petunia results in reversible cosuppression of homologous gene in trans*. Plnat Cell 2: 291-299.

Nishino H., Murakosh M., Li T., Manabu T., Masashi K., Motohiro K., Mou WY., Saeri W., Mitsuharu M., Yasuhito O, Shingo Y., Yoshiko S., Kenji J. (2002). *Carotenoids in cancer chemoprevention*. Cancer Metastasis Rev. 21: 257-264.

Niyogi KK. (1999). *Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 333-359.

Niyogi KK., Björkman O., Grossman AR. (1997). *The roles of specific xanthophylls in photoprotection*. Proc Natl Acad Sci USA 94:14162–14167.

Norris SR., Barrette TR. y DellaPenna D. (1995). *Genetic dissection of carotenoid synthesis in Arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation*. The plant cell. 7: 2139-2149.

Norris SR., Shen X., DellaPenna D. (1998). *Complementation of the Arabidopsis pds1 mutation with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase*. Plant Physiology 117: 1317-1323.

Novina CD., Sharp PA. (2004). *The RNAi revolution*. Nature 430: 161-164.

Ohresser M., Matagne RF. y Loppes R. (1997). *Expression of the arylsulfatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in Chlamydomonas reinhardtii*. Curr. Genet. 31: 264-271.

Ojima K., Breitenbach J., Visser H., Setoguchi Y., Tabata K., Hoshino T., van den Berg J. y Sandmann G. (2006). *Cloning of the astaxanthin synthase gene from Xanthophyllomyces dendrorhous (Phaffia rhodozyma) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase*. Mol Genet Genomics 275(2): 148-58.

Olaizola M. (2003) *Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace*. Biomol Eng. (4-6): 459-66.

Olmedilla B., Granado F., Blanco I., Vaquero M. (2003). *Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study*. Nutrition.19: 21-24.

Oren A. (2005). *A hundred years of Dunaliella research: 1905-2005*. Saline Systems 1(2): 1-14.

Orosa M., Torres E., Fidalgo P., Abalde J. (2000). *Production and analysis of secondary carotenoids in green algae*. J Appl Phycol. 12: 553-556.

Orset SC. y Young AJ. (2000). *Low temperature induced synthesis of β -carotene in the microalgae Dunaliella salina (Chlorophyta)*. J. Phycol. 35: 520-527.

Otsuki T. (2001). *A estudy for the biological CO₂ fixation and utilization system*. Sci. Total Environ. 277(1-3): 21-5.

Paine JA., Shipton CA., Chaggar S., Howell RM., Kennedy MJ., Vernon G., Susan Y Wright SY., Hinchliffe E., Adams JL, Aron L., Silverstone AL. y Drake R. (2005) *Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content*. Nature Biotechnology 23: 482-487.

Parker JS., Roe SM. y Barford D. (2004). *Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity*. EMBO J.23 (24): 4727-4737.

Pazour GJ., Sineshchekov OA., Witman GB. (1995). *Mutational analysis of the phototransduction pathway of Chlamydomonas reinhardtii*. J Cell Biol 131: 427-440.

Phadwal K., Singh PK. (2003). *Effect of nutrient depletion on beta-carotene and glycerol accumulation in two strains of Dunaliella sp*. Biores Technol. 90: 55-58.

Pickford AS. y Cogoni C. (2003). *RNA-mediated gene silencing*. Cell Mol Life Sci. 60(5):871-82.

Pollock SV., Pootakham W., Shibagaki N., Moseley JL., Grossman AR. (2005). *Insights into the acclimation of Chlamydomonas reinhardtii to sulfur deprivation*. Photosynth Res 86: 475-489.

Posewitz MC., Smolinski SL., Kanakagiri S., Melis A., Seibert M., Ghirardi ML. (2004) *Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell 16: 2151-2163.

Pozuelo M., Merchán F., Macías MI., CF Beck., Galván A., Fernández E. (2000). *The negative effect of nitrate on gametogenesis is independent of nitrate assimilation in Chlamydomonas reinhardtii*. Planta 211: 287-292.

Prieto R., Dubus A., Galván A., Fernández E. (1996). *Isolation and characterization of two regulatory mutants for nitrate assimilation in Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Genet Genom. 251: 461-471.

Pulz O. y Gross W. (2004). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65: 635-648.

Qin XF., An DS., Chen IS., Batimore D. (2003). *Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against-CCR5*. Proc Natl Acad Sci USA 100: 183-188.

Rabbani S., Beyer P., Lintig JV., Hugueney P. y Kleinig H. (1998). *Induced beta-carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga Dunaliella bardawil*. Plant Physiol. 116 (4):1239-1248.

Raja R., Hemaiswarya S., Kumar NA., Sridhar S., Rengasamy R. (2008). *A perspective on the biotechnological potential of microalgae*. Crit Rev Microbiol. 34(2): 77-88.

Rajamani S., Siripornadulsil S., Falcao V., Torres M., Colepicolo P. y Sayre R. (2007). *Phycoremediation of Heavy Metals Using Transgenic Microalgae*. Adv Exp Med Biol. 99-106.

Ralley L., Enfissi EMA., Misawa N., Schuch W., Bramley PM. y Fraser PD. (2004). *Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants*. The Plant Journal (39): 477-486.

Richmond A. (1990). *Large scale microalgal culture and applications*. En: Round M and Chapman S, ed. "Progress in Phycological Research 7. Biopress Ltd. 269-330.

Richmond A. (2000). *Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: A personal view*. J. Appl. Phycol.12: 441-451.

Richmond A. (2004). *Handbook of Microalgae culture*. Blackwell Science Ltd y Blackwell Publishing company. Oxford.

Rivas FV., Tolia NH., Song JJ., Aragon JP., Liu J., Hannon GJ y Joshua-Tor L. (2005). *Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC*. Nat. Struct. Mol. Bio. 12(4): 340-349.

Rohr J., Sarkar N., Balenger S., Jeong BR., Cerutti H. (2004). *Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in Chlamydomonas*. Plant J. 40(4): 611-21.

Rossel JB., Cuttriss A., Pogson BJ. (2004). *Identifying photoprotection mutants in Arabidopsis thaliana*. Methods Mol Biol 274: 287-299.

Rossinow JK., Balajee AS., Gewanter RM., Ennis RD., Schiff PB., Katz AE., Geard CR. (2003). *Effects of lycopene and vitamin E on gamma-irradiated prostate cancer cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(2 Suppl): 348-9.

Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K. y Erlich, H. (1988). *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science 239: 487-91.

Salguero A., de la Morena B., Vigara J., Vega JM., Vílchez C., León R. (2003). *Carotenoids as protective response against oxidative damage in Dunaliella bardawil*. *Biomol. Eng.* 20: 249-253.

Sambrook J. y Russell DW. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Sandmann G. (1994). *Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants*. *Eur.J. Biochem* 223: 7-24.

Sandmann G., Albrecht M., Schnurr G., Knörzer O. y Böger P. (2001). *The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 17: 233-237.

Sandmann G., Römer S. y Fraser. PD. (2006). *Understanding carotenoid metabolism as a necessity for genetic engineering of crop plants*. *Metab. Eng.*8: 291-302.

Schloss JA., Silflow CD., Rosenbaum JL. (1984). *mRNA abundance changes during flagellar regeneration in Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Biol.*4(3): 424-34.

Schmidt-Dannert C., Umeno D. y Arnol FH. (2000). *Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways*. *Nature Biotechnology* 18: 750-753.

Schroda M., Vallon O., Wollman FA., Beck CF. (1999). *A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition*. *Plant Cell.* 11(6):1165-78.

Schroda M. (2004). *The Chlamydomonas genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast*. *Photosynth Res.* 82(3): 221-40.

Schroda M. (2006). *RNA silencing in Chlamydomonas: mechanisms and tools*. Curr Genet 49: 69-84.

Schroda M., Beck CF., Vallon O. (2002). *Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in Chlamydomonas*. Plant J 31(4): 445-455.

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

Schroeder WA. y Johnson EA. (1995). *Carotenoids protect Phaffia rhodozyma against singlet oxygen damage*. J. Ind. Microbiol. 14: 502-507.

Schwarz DS., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N. y Zmore PD. (2003). *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell. 115 (2): 199-208.

Semba RD. y Dagnelie G. (2003). *Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health?* Medical Hypotheses 61(4): 465-472.

Shewmaker CK., Sheehy JA., Daley M., Colburn S. y Yang Ke D. (1999). *Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects*. Plant. J. 20(4): 401-412.

Shimogawara K., Fujiwara S., Grossman A., Usuda H. (1998). *High-efficiency transformation of Chlamydomonas reinhardtii by electroporation*. Genetics 148: 1821-1828.

Simkin AJ., Breitenbach J., Kuntz M., Sandmann G. (2000). *In vitro and in situ inhibition of carotenoid biosynthesis in Capsicum annuum by bleaching herbicides*. J Agric Food Chem. 48: 4676-4680.

Siripornadulsil S., Dabrowski K. y Sayre R. (2007). *Microalgal vaccines* en Adv Exp Med Biol: 122-124.

Sizova I., Fuhrmann M. y Hegemann P. (2001). A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 277: 221-229.

Smith NA., Singh SP., Wang MB., Stoutjesdijk PA., Green AG., Waterhouse PM. (2000). *Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs*. *Nature* 407: 319-320.

Snodderly DM. (1995). *Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins*. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (Suppl): 1448S-1461S.

Somerville C. y Dangl J. (2000). *Genomics: plant biology 2010*. *Science* 290 (5499): 2077-2078.

South Gr. y Whittick A. (1987). *Introduction to Phycology*. Blakwell Scientific Publication, UK.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. y Isambert A. (2006) .*Commercial applications of microalgae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2): 87-96.

Stahl W. y Sies H. (2005). *Bioactivity and protective effects of natural carotenoides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease Carotenoids and Dietary Lipids*. 1740 (2): 101-107.

Stalberg K., Lindgren O., Ek B. y Hoglund AS. (2003). *Synthesis of ketocarotenoids in the seed of Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*36 (6): 771-779.

Steinbrenner J. y Sandmann G. (2006). *Transformation of the Green Alga Haematococcus pluvialis with a Phytoene Desaturase for Accelerated Astaxanthin Biosynthesis Applied and Environmental Microbiology* 72 (12): 7477-7484.

Stevens DR., Rochaix JD., Purton S. (1996) *The bacterial phleomycin resistance gene ble as a dominant selectable marker in Chlamydomonas*. Mol. Gen. Genet. 251: 23-30.

Sun F., Huo X., Zhai Y., Wang A., Xu J., Su D., Bartlam M., Rao Z. (2005). *Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II*. Cell. 121(7): 1043-57.

Sun G., Zhang X., Sui Z., Mao Y. (2008). *Inhibition of pds gene expression via the RNA interference approach in Dunaliella salina (chlorophyta)*. Mar Biotechnol. 10(3):219-26.

Sun Y., Yang Z., Gao X., Li Q., Zhang Q. y Xu Q. (2005). *Expression of foreign genes in Dunaliella by electroporation*. Mol Biotechnol. 30(3): 185-192.

Tam LW., Lefebvre PA.(1993). *Cloning of flagellar in Chlamydomonas reinhardtii by DNA insertional mutagenesis*. Genetics 135: 375-384.

Tan C., Quin S., Zhang Q., Jiang P., Zhao F. (2005). *Establishment of a micro-particle bombardment transformation system for Dunaliella salina*. J Microbiol 43(4): 361-365.

Tatsuzawa H., Maruyama T., Misawa N., Fujimori K. y Nakano M. (2000). *Quenching of singlet oxygen by carotenoids produced in Escherichia coli: Attenuation of singlet oxygen-mediated bacterial killing by carotenoids*. FEBS Lett. 484: 280-284.

ten Lohuis MR. y Miller DJ. (1998). *Genetic transformation of dinoflagellates (Amphidinium and Symbiodinium): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs*. Plant J. 13: 427-435.

Teng PI., Dichiara MR., Kömüves LG., Abe K., Quertermous T., Topper JN. (2002). *Inducible and selective transgene expression in murine vascular endothelium*. *Physiol Genomics*. 11(2): 99-107.

Tijsterman M., Ketting RF., Plasterk RH. (2002). *The genetics of RNA silencing*. *Annu Rev Genet* 36: 489-512.

Ullu E., Tschudi C., Chakraborty T. (2004). *RNA interference in protozoan parasites*. *Cell Microbiol*. 6: 509-519.

Van der Krol AR., Mur LA., Beld M., Mol JNM. y Stuitje A. (1990). *Flavonoid genes in Petunia: addition of a limited number of genes copies may lead to a supresión of gene expresión*. *Plant Cell* (2): 291-299.

Vance V. y Vaucheret H. (2001). *RNA Silencing in Plants-Defense and Counterdefense*. *Science* 292 (5525): 2277-2280.

Vila M., Couso I. y León R. (2008). *Carotenoid content in mutants of the chlorophyte Chlamydomonas reinhardtii with low expression levels of phytoene desaturase*. *Process Biochemistry* 43: 1147-1152.

Vílchez C., Garbayo I., Lobato MV. y Vega JM. (1997). *Microalgae-mediated chemicals production and wastes removal*. *Enzyme Microb. Technol.* (20): 562-572.

Volpe TA., Kidner C., Hall IM., Teng G., Grewal SS., Martienssen RA. (2002). *Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi* *Science* 297 (5588): 183-1837.

Wang MB. y Waterhouse PM. (2000) *High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but independent of DNA methylation*. *Plant Mol. Biol.* 43: 67-82.

Wasi S. (2003). *RNA interference: the next genetics revolution?* En Understanding the RNAissance: <http://www.nature.com/horizon/rna/background.html>.

Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger HL. (1994). *RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants*. Cell. 76(3): 567-76.

Wassenegger M. (2002). *Gene silencing*. Int Rev Cytol. 219: 61-113.

Wassenegger M. (2005). *The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation*. Cell 122(1): 13-6.

Waterhouse PM., Graham MW., Wang MB. (1998). *Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA (95): 13959-13964.

Waterhouse PM., Helliwell CA. (2003). *Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing*. Nat Rev Genet 4: 29-38.

Waterhouse PM., Wang MB., Lough T. (2001). *Gene silencing as an adaptive defence against viruses*. Nature 411(6839):834-42.

Weiss A., Johannsbauer W., Gutsche B., Martín L., Cordero B.F., Rodríguez H., Vargas M.A., Obratzsova I. (2006a) "*Zeaxanthin producing microalgal strain*." N de solicitud EP/06000158.3, fecha 5 de Enero de 2006. Entidades titulares: Universidad de Sevilla y Cognis Deutschland GmbH and Co. KG.

Weiss A., Johannsbauer W., Gutsche B., Martín L., Cordero B.F., Rodríguez H., Vargas M.A., Obratzsova I. (2006b) "*Process for obtaining lutein from algae*". N de solicitud EP/06000599.8, fecha 12 de Enero de 2006. Entidades titulares: Universidad de Sevilla y Cognis Deutschland GmbH and Co. KG.

Wesley SV., Helliwell CA., Smith NA., Wang MB., Rouse DT., Liu Q., Gooding PS., Singh SP., Abbott D., Stoutjesdijk PA., Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM. (2001). *Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants*. Plant J 27: 581-590.

Wilda M., Fuchs U., Wössmann W., Borkhardt A.(2002). *Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi)*. Oncogene. 22; 21(37): 5716-24.

Wingard SA. (1928). *Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants*. J. Agric. Res. 37: 121-153.

Wu-Scharf D., Jeong BR., Chaomei Z., Cerutti H. (2000). *Transgene and transposon silencing in Chlamydomonas by a DEAH-Box RNA helicase*. Science 290:1159-1162.

Xie Z., Johansen LK., Gustafson AM., Kasschau KD., Lellis AD., Zilberman D., Jacobsen SE. y Carrington JC. (2004). *Genetic and functional diversification of small RNA pathway in plants*. PloS. Bio.2(5): 104.

Yamamoto. H. Y. (1979) *Biochemistry of the violaxanthin cycle*. Pure Appl.Chem. 51: 639-648.

Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P. y Potrykus I. (2000). *Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm*. Science 287: 303-305.

Yoshioka S., Taniguchi F., Miura K., Inoue T., Yamano T., Fukuzawa H. (2004). *The novel Myb transcription factor LCR1 regulates the CO₂-responsive gene Cah1, encoding a periplasmic carbonic anhydrase in Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell 2004; 16: 1466-1477.

Young A., Orset S., Tsavalos A. (1997). *Methods for carotenoid analysis*. In: Pessaraki M Editor. *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York: 597-622.

Zabawinski C., Van Den Koornhuysen N., D'Hulst C., Schlichting R., Giersch C., Delrue B., Lacroix JM., Preiss J., Ball S. (2001). *Starchless mutants of Chlamydomonas reinhardtii lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase*. J. Bacteriol. 183: 1069-1077.

Zaslavskaja LA., Lippmeier JC., Kroth PG., Grossman AR., Apt KE. (2000). *Transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum (Bacillariophyceae) with a variety of selectable markers and reporter genes*. J Phycol. 36: 379-386.

Zaslavskaja LA., Lippmeier JC., Shih C., Ehrhardt D., Grossman AR., Apt KE. (2001). *Trophic Conversion of an Obligate Photoautotrophic Organism Through Metabolic Engineering*. Science; 292: 2073-2075.

Zhang DH., Lee YK., Ng ML. y Phang SM. (1997). *Composition and accumulation of secondary carotenoids in Chlorococcum*. Journal of Applied Phycology. 9(2): 147-155(9).

Zhao T., Li G., Mi S., Li S., Hannon GJ., Wang XJ. Y Qi Y. (2007). *A complex system of small RNAs in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Genes & Dev. (21): 1190-1203.

Zmora O. y Richmond A. (2004). *Microalgae for aquaculture*. En: Richmond (ed). Handbook of Microalgae culture. Blackwell Science Ed. USA.