

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**GENES INVOLUCRADOS EN LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA DE
LA MICROALGA *Chlorella protothecoides***

TESIS

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

EVA LUZ SÁNCHEZ ALVAREZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA; MÉXICO. JUNIO DE 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

GENES INVOLUCRADOS EN LA ACUMULACIÓN LIPÍDICA DE LA
MICROALGA *Chlorella protothecoides*

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

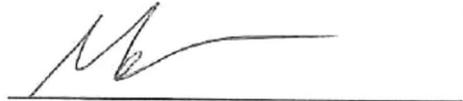
PRESENTA

EVA LUZ SÁNCHEZ ALVAREZ

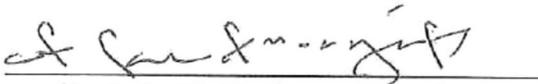
Aprobada por:



Dr. José Luis Stephano Hornedo
Co-Director de Tesis



Dr. Mark Hildebrand
Co-Director de Tesis



Dr. Luis M. Enríquez Paredes
Sinodal



Dr. Enrique Valenzuela Espinoza
Sinodal

RESUMEN

Genes involucrados en la acumulación lipídica de la microalga *Chlorella protothecoides*

Ciertas especies microalgales producen lípidos en abundancia y estos pueden ser aprovechados al convertirlos en biodiesel mediante un proceso simple denominado transesterificación. Debido a su alta tasa de crecimiento y de producción lipídica, dichas especies están siendo investigadas como una fuente renovable de combustible biológico. Para maximizar el aprovechamiento de estas microalgas en dicho ramo, es necesario entender los mecanismos moleculares que regulan la biosíntesis lipídica; lo cual se encuentra en una etapa incipiente del conocimiento. El presente trabajo tiene como objetivo el aislamiento y caracterización de genes inducidos bajo condiciones de acumulación de lípidos en la microalga *Chlorella protothecoides*, utilizando la técnica de clonación sustractiva. Se logró incrementar la acumulación lipídica bajo tres condiciones de crecimiento heterotrófico: 4 veces más abundancia de lípidos en condición con glicerol 20 mM, 23 veces más con glucosa 20 mM y 25 veces más con glucosa 5.5 mM, comparado con un crecimiento autotrófico. 99 genes fueron caracterizados mediante análisis de sus secuencias nucleotídicas y 14 de ellos, determinando los cambios en los niveles de RNA mensajero bajo diferentes condiciones de crecimiento. El gen de mayor interés fue el gen plastídico acil-ACP desaturasa que participa en la instauración de ácidos grasos y que presentó la mayor expresión en la condición heterotrófica que rinde menos lípidos y viceversa. Se esperaba que los resultados de este proyecto lograran el conocimiento del mecanismo que permite la acumulación de lípidos en microalgas, sin embargo la inducción de genes no fue la esperada, por lo cual se considera la posibilidad de una represión de genes o una preponderante regulación metabólica y de flujo de energía en *C. protothecoides* durante crecimiento heterótrofo y acumulación lipídica.

AGRADECIMIENTOS

A Eva Luz Alvarez, Guillermo Sánchez, Ariadna Sánchez y Citlalli Sánchez por su cariño y apoyo. Los quiero mucho. Siempre están en mi corazón.

A mis Directores de Tesis, los Doctores Mark Hildebrand y José Stephano por su gran vocación, incitativa y apoyo hacia mi persona. Son unos grandes científicos a los cuales admiro. Por un excelente trabajo!

A mis sinodales, Dr. Luis Enríquez y Dr. Enrique Valenzuela. Gracias por sus enseñanzas, por sus invaluable aportaciones al presente trabajo y por sus sabios consejos.

A todos mis compañeros del Laboratorio "Hildebrand". Me siento honrada de haber trabajado con tan excelente equipo.

A todos los integrantes del Laboratorio "Meredith Gould" por su compañerismo, integridad y afán de ayuda desinteresada. Aunque trabajamos a distancia, pero a la vez unidos por un mismo fin.

A todo el personal del Instituto Scripps de Oceanografía por sus finas atenciones, su compañerismo y excelente trato. Gracias por permitirme formar parte de su Institución y por el apoyo brindado para el desarrollo del presente trabajo.

A todo el personal de la Universidad Autónoma de Baja California por sus enseñanzas, apoyo y amistad. Profesores, alumnos, personal administrativo, auxiliares de laboratorio, personal del almacén, de la biblioteca, a Doña Tere. Muchas gracias a todos.

A mis amigos Alejandra Prieto, Hsiu-Chin Lin, Trina Norden-Krichmar, Irma Soria, Luis Villarreal, Dilayaxi Cárdenas, Ana Rivera, Angélica Arce, Manuel Morales por su invaluable ayuda, por darme ánimos y su apoyo en los momentos difíciles.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el amable otorgamiento de beca nacional Enero-Julio 2008.

Al Departamento de Cooperación Internacional e Intercambio Estudiantil y a la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California por el otorgamiento de beca de movilidad estudiantil 2007-2.

A la Universidad de California, San Diego y al Instituto Scripps de Oceanografía por su apoyo económico y por permitirme realizar la totalidad del trabajo experimental así como el escrito de tesis en sus instalaciones. El trato que les dan a los estudiantes es una de las mayores cualidades de tan prestigiada institución.

ÍNDICE DEL TRABAJO

	Página
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	6
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
METODOLOGÍA	
1. Descripción del material biológico y 2. Cultivos celulares.....	19
3. Monitoreo del contenido lipídico.....	21
4. Extracción de RNA	22
5. Aislamiento de mRNA y 6. Clonación sustractiva	24
7. Clonación y transformación de células competentes, 8. Genotecas cDNA y	
9. Extracción de DNA Plasmídico	28
10. Determinación de secuencias y análisis y 11. Caracterización de variaciones en los niveles de mRNA para genes seleccionados	29
RESULTADOS	
1. Condiciones de crecimiento.....	33
2. Análisis lipídico	35
3. Análisis molecular.....	39
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	74
LITERATURA CITADA	76
APÉNDICE	86

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Genes con función desconocida.....	41
Tabla II. Genes alga-homólogos.....	41
Tabla III. Genes de metabolismo de glucosa.....	41
Tabla IV. Genes lipídicos.....	42
Tabla V. Genes que codifican para proteínas cloroplásticas.....	42
Tabla VI. Genes que codifican para proteínas mitocondriales.....	42
Tabla VII. Gen de ciclo TCA.....	42
Tabla VIII. Genes de síntesis de aminoácidos.....	43
Tabla IX. Genes involucrados en procesamiento de mRNA o transposición.....	43
Tabla X. Genes de plegamiento de proteínas.....	43
Tabla XI. Gen de histona.....	43
Tabla XII. Gen involucrado en formación de vesícula.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Síntesis de ácidos grasos en cloroplasto.....	16
Figura 2. Biosíntesis de triglicéridos en algas.....	17
Figura 3. Diagrama esquemático de la técnica de clonación sustractiva.....	25
Figura 4. Gráfica comparativa del crecimiento de <i>C. protothecoides</i> bajo 4 condiciones de cultivo.....	33
Figura 5. Vista macroscópica de cultivos líquidos de <i>C. protothecoides</i> durante la fase logarítmica.....	34
Figura 6. Vista macroscópica del crecimiento de colonias de <i>Chlorella</i> <i>protothecoides</i> en placas de agar.....	35
Figura 7. Mediciones lipídicas utilizando el tinte fluorescente rojo nilo en 4 condiciones diferentes.....	37
Figura 8. Imágenes microscópicas con fluorescencia de <i>Chlorella</i> <i>protothecoides</i>	38
Figura 9. Imagen microscópica de <i>C. protothecoides</i> bajo condiciones de autotrofismo (A) y de heterotrofismo con 5.5 mM de glucosa (B).....	38
Figura 10. Comparación de dos métodos de extracción de RNA.....	39

Figura 11. Niveles de mRNA para la clonas B29,D29,D35 y para la clona B43.....	45
Figura 12. Niveles de mRNA para las clonas A25,A26, clona C15 y clona E31.....	46
Figura 13. Niveles de mRNA para clonas A2-B7-A18 y clona C8.....	47
Figura 14. Niveles de mRNA para la clona D3.....	48
Figura 15. Niveles de mRNA para la clona C26.....	48
Figura 16. Niveles de mRNA para las clonas C6-C39.....	49
Figura 17. Niveles de mRNA para la clona A32, clonas H47-I9 y clonas E38-E39.....	50
Figura 18. Niveles de mRNA para la clona A19.....	51
Figura 19. Vía glucolítica.....	56
Figura 20. Ciclo de Krebs	60
Figura 21. Sistema transportador de electrones.....	61
Figura 22. Succinato deshidrogenasa.....	62
Figura 23. Esquema general de transporte de azúcar, glicólisis y fosforilación oxidativa en <i>C. protothecoides</i>	64

INTRODUCCION

Existe un creciente interés en el desarrollo de energía alternativa a nivel mundial debido a que el uso continuo de las actuales reservas de combustible fósil está llegando a un nivel insostenible y a que los gases y partículas contaminantes emitidos debido a su desmedida utilización, causan problemas tales como el efecto invernadero y la lluvia ácida. Dichas fuentes se están agotando y en un mediano plazo serán insuficientes o nulas. Esto es latente tanto en países productores de petróleo como en los que no lo son. Guerras, desigualdad de oportunidades, restricciones políticas y económicas se llevan a cabo para lograr el acaparamiento de la mayor cantidad disponible de petróleo al costo que sea. Es tiempo de llevar a cabo un desarrollo sustentable. Tanto la crisis económica, como el acelerado deterioro ambiental y la inadecuada gobernabilidad son afecciones comunes entre los países, están sucediendo al mismo tiempo y a un grado alarmante. La comunidad científica se ve inmersa en este entorno y es su deber contribuir hasta donde le sea posible en la resolución de dicha problemática.

Encontrar y/o diseñar fuentes renovables de energía alternativa no contaminante es una de las tareas actuales que pueden ayudar en cierto grado a nuestro planeta y los seres que coexistimos en él. Una fuente prometedora para combustible diesel alternativo es la producción biológica de lípidos y su posterior conversión a biodiesel. Este debe ser económicamente competitivo con el petrodiesel. En base a la eficiencia de producción, las microalgas son

una fuente atractiva de lípidos como precursores en la producción de diesel biológico. Al utilizar estos organismos no estamos comprometiendo la producción de alimentos destinados a consumo humano o de forrajes, ni de otros productos derivados de cultivos de plantas superiores, las cuales actualmente están siendo explotadas para tales fines. Trabajos previos con microalgas en este ramo se han enfocado en la experimentación con diferentes condiciones de cultivo para inducir una alta producción de lípidos en varias especies microalgales, dejando en segundo lugar la investigación de los procesos celular y molecular que regulan dicha acumulación. En el presente trabajo se propone un análisis a nivel molecular, para entender las bases, esto es la expresión génica durante la acumulación de lípidos. Igualmente se mencionarán cambios metabólicos relevantes a un rendimiento lipídico aumentado en microalgas.

Las microalgas son los organismos más primitivos perteneciente al reino *Plantae*. Las algas microscópicas son los organismos fotosintéticos con mayor tasa de crecimiento, pueden completar un ciclo reproductivo en cuestión de días. Su eficiencia en la conversión de la energía solar ha sido demostrada en cultivos a gran escala, en los que se han reportado productividades de 50 gramos de microalga por metro cuadrado por día (Sheehan *et al.*, 1998). Su mecanismo fotosintético es similar al de las plantas superiores, aunque rebasan la tasa de rendimiento fotosintético de éstas últimas. Debido a que su ciclo de vida ocurre completamente en un medio líquido, tienen acceso directo

(a través de su membrana celular) a nutrientes, gases y otras sustancias disueltas, necesarias para un óptimo desarrollo. Algunas microalgas son capaces de producir desde 7 hasta 31 veces más lípidos que la plantas terrestres utilizadas comercialmente como fuentes de estas biomoléculas (aceites de maíz, soya, palma) (Sheehan *et al.*, 1998). La composición lipídica puede ser regulada a través de adición o sustracción de ciertos nutrientes en la dieta microalgal (Basova, 2005; Merzlyak *et al.*, 2007; Roessler, 1988). Por ejemplo, la privación de silicio o de nitrógeno puede incrementar la producción total de lípidos. De la misma manera, los factores ambientales tales como luz, temperatura, concentración de iones y pH puede afectar dicho rendimiento (Sheehan *et al.*, 1998).

Chlorella protothecoides es una clorófito dulceacuícola que tiene la capacidad de crecer autotrófica y heterotróficamente. El crecimiento heterótrofo suplementado con acetato, glucosa y otros compuestos orgánicos utilizados como fuentes de carbono, estimulan la sobreproducción de lípidos y aumentan la biomasa microalgal (Hörtensteiner *et al.*, 2000).

Para el desarrollo del presente trabajo se seleccionó a *C. protothecoides* por su alto contenido lipídico, por su biomasa, fácil manejo y porque está probado que bajo ciertas condiciones se puede inducir el aumento de biomasa y sobre todo la sobreproducción de lípidos.

Para facilitar la sobreproducción lipídica de *Chlorella protothecoides* es necesario entender los mecanismos de control regulatorio de dicha producción.

Descubrir que genes son los responsables de la acumulación de lípidos no solo cumple con el objetivo del presente trabajo sino que puede sentar las bases para lograr el aprovechamiento de microorganismos en escala comercial e industrial para producir biodiesel, que es una forma química modificada de aceite natural (mediante una reacción de transesterificación) que puede ser utilizado en los motores a base de diesel. Esta modificación consiste en el mezclado del aceite vegetal con un alcohol (generalmente metanol) y un álcali (sosa cáustica). Posterior a un periodo de reposo, el biodiesel se decanta y separa de su subproducto, el glicerol (Sheehan, 1998). El biodiesel supera al diesel convencional en cuanto a su menor impacto ambiental, sobre todo en emisión de contaminantes a la atmósfera al sufrir combustión. Esta condición es bastante deseable en la actualidad en nuestro planeta.

Para lograr aislar genes no caracterizados en un organismo, tales como aquellos involucrados en la acumulación lipídica de *Chlorella protothecoides*; la técnica de clonación sustractiva puede ser utilizada. Esta técnica se basa en el hecho de que un organismo que crece bajo dos condiciones diferentes, posee RNA mensajeros en niveles similares para la mayoría de sus genes, excepto para aquellos involucrados en la adaptación a estas nuevas condiciones. Los niveles de éstos últimos pueden aumentar o disminuir de acuerdo a su función. En el presente trabajo se esperaba que los genes involucrados en la biosíntesis lipídica fuesen específicamente inducidos bajo condiciones de abundancia de lípidos. Caso contrario cuando existiera escasez en la

producción de lípidos microalgales. En la técnica sustractiva, aquellos RNA mensajeros que no difieren significativamente bajo dos condiciones diferentes, son removidos (sustracción), logrando con ello evidenciar aquellos genes cuyos niveles han sido inducidos o reprimidos en forma específica (Sagerström,1997). El presente trabajo fué realizado en en el Instituto Scripps de Oceanografía de la Universidad de California, San Diego; localizado en la Jolla, California, U.S.A

ANTECEDENTES

Biodiesel

Las algas son consideradas una poderosa fuente potencial de combustible biológico debido a su capacidad de sintetizar lípidos neutros con un bajo grado de insaturación durante etapas avanzadas de crecimiento (Casadevall *et al.*, 1985; McGinnis *et al.*, 1997). Aquellas que poseen las mayores tasas de producción lipídica pueden ser explotadas para la elaboración de biodiesel, el cual es un aceite natural químicamente modificado que puede ser utilizado en motores que utilizan diesel tradicional. Se le atribuyen ventajas sobre éste último en cuanto a que es renovable, biodegradable, se puede almacenar sin riesgo bajo tierra, su combustión produce menor cantidad de óxido de azufre (casi 100% menos) y de partículas (47% menos) contaminantes a la atmósfera (United States Environmental Protection Agency, 2002). Varias especies de microalgas exhiben un rápido crecimiento y alta productividad. Muchas de ellas pueden ser inducidas a acumular cantidades sustanciales de lípidos: comúnmente su contenido lipídico se encuentra en el rango de 20-40% de su biomasa (bajo condiciones óptimas), y ocasionalmente pueden superar dicho rango (Sheehan *et al.*, 1998.). Actualmente las algas están siendo estudiadas para su explotación como una fuente alterna de combustible para aeronaves, capaz de proveer energía de alta densidad y soportar un amplio rango de temperaturas (The Defense Advanced Research Projects Agency's Advanced Technology Office, 2008).

De 1978 a 1996 el Programa de Especies Acuáticas del Instituto de Investigaciones de Energía Solar de los Estado Unidos (SERI), llevó a cabo una exhaustiva investigación en varias especies de microalgas, con el propósito final de obtener una cepa poseedora de tres características principales: tolerancia a fluctuaciones ambientales, altas tasas de crecimiento y elevada producción de lípidos. La misión de SERI fué la generación de fuentes de energía renovable en forma de combustible líquido a partir de la transformación de lípidos algales en gasolina y diesel (Sheehan *et al*, 1998).

Chlorella protothecoides

Chlorella protothecoides es una microalga verde que puede ser manipulada para incrementar su producción de lípidos con el propósito de convertirlos en combustible biológico. Dicho organismo tiene la capacidad de crecer bajo condiciones de autotrofismo y de heterotrofismo.

Shihira-Ishikawa y Hase en 1964, demostraron que la adición de glucosa y eliminación de fuente de nitrógeno en el medio de cultivo de *C. protothecoides*, tiene un efecto directo en la degeneración de los cloroplastos (incluyendo el sistema lamelar). La clorofila se degrada y la célula pierde su color verde característico. Durante dicha decoloración ocurre a la par un considerable aumento en la tasa de crecimiento. Sus observaciones al microscopio electrónico mostraron la formación de vacuolas llenas de lípidos que ocupaban casi todo el citoplasma. En 1967, Katayama y Benson

estudiaron la actividad fotosintética de *Chlorella protothecoides* bajo condiciones de heterotrofismo y encontraron que cuando las células eran cultivadas en un medio rico en glucosa, se tornaban amarillas y perdían su capacidad de fotosintetizar (proceso de decoloración). Los ácidos grasos predominantes eran el oleato y el linoleato. Durante el proceso decolorativo, el oleato incrementaba significativamente y al utilizar porcentajes, el oleato y el linoleato cambiaban en forma simétrica. En 1969, Matsuka y colaboradores demostraron que la respiración de *Chlorella protothecoides* incrementaba al añadir glucosa al medio de cultivo. Utilizando ^{14}C como marcador, estudiaron el metabolismo de glucosa dentro de la célula y encontraron que la síntesis de ácidos grasos incrementaba mientras que la de sucrosa y polímero de glucosa, disminuían. Sugirieron que el ciclo de los ácidos tricarbóxicos era poco activo durante la decoloración por glucosa. Endo *et al* en 1977, encontró que el crecimiento heterotrófico de *Chlorella protothecoides* suplementado con acetato, glucosa u otro compuesto orgánico como fuente de carbono, resulta en un incremento de biomasa y un elevado contenido lipídico. En 2004, Miao y Wu realizaron cultivos heterotróficos (glucosa) de *C. protothecoides* y utilizando el método de pirólisis rápida pudieron obtener un rendimiento lipídico de 57.9 % que equivale a 3.4 veces más que el obtenido a partir de un cultivo autotrófico. En 2006, Xu y colaboradores desarrollaron una técnica de crecimiento heterótrofo en *C. protothecoides* destinada al control metabólico de síntesis de lípidos. Resultando en un contenido lipídico crudo de 55%. El cual fué extraído

de las células y convertido en biodiesel mediante una trans-esterificación ácida. Dicho proceso fué considerado de gran potencial para la explotación industrial de *C. protothecoides*.

Rojo Nilo

Existe un técnica intracelular *in vivo* que permite una rápida visualización así como una cuantificación relativa de lípidos neutros. Se denomina técnica de rojo nilo debido a que utiliza 9-dietilamino-5H-benzo[α]fenoxazina-5-uno o rojo nilo, el cual se utiliza para teñir gotas lipídicas intracelulares para su posterior detección mediante microscopía de fluorescencia. Dicha tinción posee propiedades semejantes a un lisocromo (sustancia capaz de disoverse en lípidos y colorearlos) ideal. Es altamente fluorescente en un medio hidrofóbico. El rojo nilo se disuelve en los lípidos que se desea detectar (por ejemplo triglicéridos) y puede aplicarse a microalgas vivas en un medio de cultivo líquido (Cooksey *et al*, 1987). Permite comparar cuantitativamente el contenido lipídico y no provee valores absolutos a menos que se lleve a cabo una estandarización y se utilice una técnica gravimétrica que permita evaluar el contenido lipídico en base al peso por célula. En 1998, Lee y colaboradores compararon la fluorescencia *in vivo* de células microalgales teñidas con rojo nilo con la determinación gravimétrica de lípidos al utilizar agitación con microesferas de vidrio combinada con el sistema metanol-cloroformo. Sus resultados arrojaron una relación lineal con un coeficiente correlacional de

0.998, lo cual sugiere que la eficacia de la tinción de rojo nilo es similar a la del método gravimétrico comúnmente utilizado para determinación de lípidos, llamado Bligh y Dyer. Se han reportado modificaciones al ensayo de rojo nilo de Lee (Elsley *et al* in 2007) con la finalidad de mejorar la selectividad de lípidos neutros, ya sea entre múltiples cepas creciendo bajo mismas condiciones o diferentes condiciones para una sola cepa. Elsley *op. cit.* sugiere dar un seguimiento a la intensidad de emisión durante un periodo entre 30 y 40 minutos posteriores a la adición de rojo nilo; siempre utilizar células vivas y calibrar el fluorómetro diariamente. Para cuantificaciones absolutas de lípidos por célula, sugiere desarrollar una curva de calibración que correlacione la fluorescencia con el contenido lipídico, ya sea determinado gravimétricamente o utilizando estándares lipídicos.

Clonación sustractiva

Las microalgas son capaces de acumular lípidos bajo ciertas condiciones, pero los mecanismos que permiten dicho proceso son aún desconocidos. Una forma de investigar los cambios metabólicos que ocurren a nivel celular es examinando el patrón de expresión de los genes. Para aquellos organismos con secuencia genómica no determinada, la técnica de clonación sustractiva es adecuada para identificar los genes inducidos. Dicha técnica se basa en el hecho de que al cultivar un organismo en dos condiciones diferentes, los mRNAs para la mayoría de los genes poseen niveles similares

excepto aquellos genes involucrados en la adaptación a las nuevas condiciones de cultivo, los cuales pueden tener una regulación alta o baja dependiendo de sus funciones. En el caso de inducción por lípidos, se esperaría que aquellos genes involucrados en la biosíntesis lipídica fuesen inducidos específicamente bajo condiciones de abundancia de lípidos en relación a su menor abundancia.

La técnica de clonación sustractiva ha sido de gran utilidad en la caracterización de diversos genes microalgales:

En 1999, Virginia Armbrust aplicó una técnica sustractiva con cDNA basada en PCR para identificar genes transcritos durante las primeras horas del ciclo sexual, el cual es un periodo que precede los mayores cambios morfológicos asociados a la formación de gametos en la diatomea, *Thalassiosira weissflogii*. Se identificaron 10 genes con regulación aumentada durante las etapas tempranas de la reproducción sexual.

La tolerancia al stress por salinidad ha sido estudiada a nivel molecular al caracterizar genes expresados por *Dunaliella salina* sometida a shock osmótico al aplicar la técnica de clonación sustractiva (Zhang, 2002). Se identificaron dos genes: D27 que codifica para la subunidad V del centro reactivo del fotosistema I de *Chlamydomonas reinhardtii* y D21 que codifica para fructosa-1,6-difosfato aldolasa. D27 puede estar relacionado con la estabilidad y actividad del fotosistema I durante el shock hiperosmótico. La proteína D21 puede proveer una fuente de carbono para el metabolismo de

glicerol. Al elevarse los niveles de glicerol en *Dunaliella*, ésta pudiese utilizarlo como un regulador de presión osmótica durante el estrés por sales.

Las clorofíceas responden a condiciones de estrés anaeróbico al cambiar la ruta de metabolismo oxidativo por la vía fermentativa. La fermentación de compuestos orgánicos está relacionada con la enzima hidrogenasa, la cual cataliza la reducción de protones a hidrógeno molecular. En *Chlamydomonas reinhardtii* se ha podido analizar la regulación de la Fe-hidrogenasa durante la adaptación a condiciones de anaerobiosis al aislar un fragmento de DNA similar a la Fe-hidrogenasa, utilizando la técnica de clonación sustractiva (Happe *et al.*, 2002).

El gen ScDSP expresado durante la fase de muerte celular en *Skeletonema costatum* y que codifica para una proteína regulada por calcio ha sido identificado al aplicar la técnica de clonación sustractiva (Chung *et al.*, 2005).

El método sustractivo de cDNA basado en PCR fué utilizado para identificar genes con respuesta a cobre en la diatomea marina *Thalassiosira pseudonana*. Un total de 16 genes inducidos por cobre fueron identificados (Davis *et al.*, 2006).

De especial relevancia para este trabajo es la caracterización exitosa de genes mediante la técnica de clonación sustractiva en *Chlorella protothecoides*: aquellos que se expresan durante el catabolismo de la clorofila y la pérdida de la coloración verdosa (Hortensteiner *et al.*, 2000).

qRT-PCR

La clonación sustractiva provee el medio para aislar genes inducidos, pero no cuantifica la extensión de dicha inducción. Existe una técnica que realiza dicha cuantificación, es la llamada PCR cuantitativo en tiempo real PCR (qRT-PCR). Se basa en una reacción de PCR, la cual se lleva a cabo en presencia de un tinte marcador, por ejemplo: SYBR Green, que fluoresce al intercalarse en la doble hélice de DNA. Al aumentar la cantidad de producto de PCR, la fluorescencia incrementa. Esto se cuantifica cada vez que se completa cada ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa.

Debido a que el número de copias de un transcrito de mRNA de un gen está determinado por su rango de expresión; antes de realizar qRT-PCR, el DNA complementario (cDNA) se prepara a partir de RNA. Una alícuota de cDNA es utilizada para amplificar el gen blanco. El ciclo durante el cual la fluorescencia excede el umbral de detección (Ct), correlaciona el número de moléculas de cDNA blanco presentes en el cDNA agregado. Por lo tanto, al compararlas con una curva de calibración, es posible cuantificar en valores absolutos el número de moléculas blanco existente en las muestras de cDNA añadido. El DNA amplificado se cuantifica de acuerdo a como se va acumulando en la reacción en tiempo real, después de cada ciclo de amplificación. Con una curva standard qPCR bien construída, se puede obtener una medición absoluta, tal como el número de copias de mRNA por

cantidad de muestra. Mide la abundancia de mRNA en tiempo real y por lo tanto los niveles de expresión.

Ejemplos de aplicaciones exitosas de qRT-PCR incluyen la caracterización de genes inducidos por cobre en *Thalassiosira pseudonana* (Davis *et al*, 2006), y elongasa de *Pavlova lutheri* (Tonon *et al*, 2005).

Biosíntesis de lípidos en algas

De acuerdo a la extensa revisión de Hu *et al* en 2008, el conocimiento actual sobre algas oleaginosas y su biosíntesis de ácidos grasos y triglicéridos, se presenta resumido a continuación, enfatizando en clorofíceas.

En el citoplasma, el complejo enzimático de la piruvato deshidrogenasa cataliza la conversión de piruvato (proveniente de glucólisis) en acetil CoA. Esta coenzima entra al cloroplasto y acetil-CoA-carboxilasa cataliza su conversión a malonil-CoA (Fig. 1. Reacción 1). El grupo malonilo de CoA es transferido a un cofactor protéico en la proteína portadora de acilo o ACP (Fig. 1. Reacción 2); este paso es catalizado por malonil CoA:ACP transferasa. El grupo malonilo de malonil ACP participa en una serie de reacciones de condensación con aceptores de acil ACP (o de acetil CoA): la primer reacción es catalizada por 3-cetoacil-ACP-sintasa III (KAS·III) (Jaworski *et al.*, 1989) formando 3-cetobutiril-ACP (Fig. 1. Reacción 3). Este compuesto es reducido por $\text{NADPH} + \text{H}^+$ formando 3-hidroxi-butiril-ACP y la reacción es catalizada por 3-cetoacil-ACP-reductasa (Fig. 1. Reacción 4). Posterior a esta reducción, 3-

hidroxibutiril-ACP es deshidratado y forma trans- Δ^2 -Butenoyl-ACP, catalizado por 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa (Fig. 1. Reacción 5). Otra reducción se lleva a cabo, siendo catalizada por enoil-ACP-reductasa, formando butiril-ACP (Fig. 1. Reacción 6). Este compuesto es convertido a 3-cetoacil-ACP por 3-cetoacil-ACP sintasa, utilizando malonil-ACP como donador de carbonos (Fig. 1. Reacción 3 después de 6). La vía de síntesis de ácidos grasos produce 16:0- y 18:0-ACP saturados. Para desaturar un ácido graso, esteroil-ACP-desaturasa introduce un doble enlace.

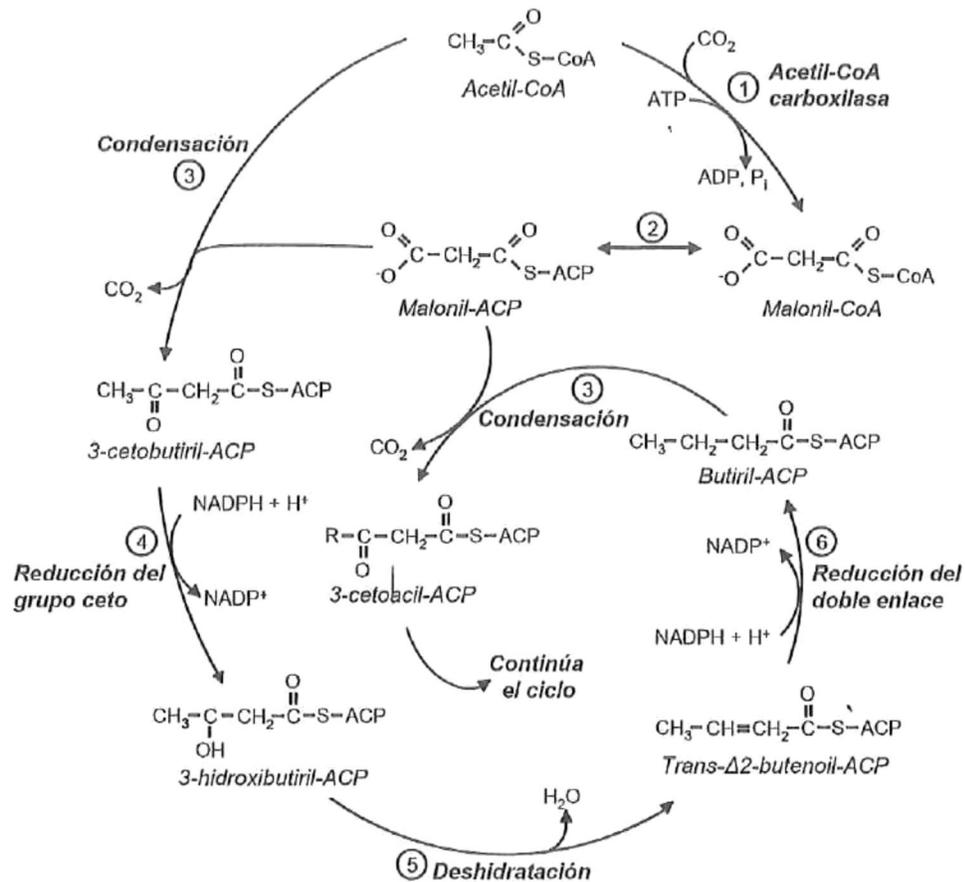


Figura 1. Síntesis de ácidos grasos en cloroplasto.

Acetil CoA entra como sustrato para acetil CoA carboxilasa (Reacción 1) y como sustrato para la primer reacción de condensación (Reacción 3). La reacción 2 que es catalizada por malonil CoA:ACP transferasa, transfiere malonil de CoA para formar malonil ACP. Malonil ACP dona carbonos necesarios para reacciones de elongación subsecuentes. Posterior a las condensaciones, el producto de 3-cetoacil ACP es reducido por 3-cetoacil-ACP-reductasa (Reacción 4), deshidratado por 3-hidroxiacil ACP deshidratasa (Reacción 5) y reducido nuevamente por enoil-ACP reductasa (Reacción 6). (Adaptado de Ohlrogge y Browse, 1995).

Los ácidos grasos producidos en el cloroplasto son transferidos de manera secuencial de CoA a la posición 1 del glicerol-3-fosfato (derivado del glicerol), reacción catalizada por glicerol-3-fosfato-acil-transferasa (Fig. 2. Reacción 1). Y a la posición 2, catalizada por ácido lisofosfatídico acil

transferasa (Fig. 2. Reacción 2); resultando en la formación de ácido fosfatídico (PA) (Ohlrogge and Browse, 1995). La defosforilación de PA catalizada por ácido fosfatídico fosfatasa libera diacilglicerol (DAG) (Fig. 2. Reacción 3). Durante el paso final de la síntesis de triglicérido (TAG) se transfiere un tercer ácido graso a la posición 3 de DAG y la diacilglicerol acil-transferasa cataliza dicha reacción (Fig. 2. Reacción 4). Las acil-transferasas involucradas en la síntesis de triglicéridos pueden llegar a preferir moléculas específicas de acil CoA y por lo tanto determinar la composición final de acilos en los triglicéridos. Por ejemplo, Roessler *et al.* (1994) reportó que en células de *Nannochloropsis*, liso-PA acil-transferasa que acila la segunda posición (sn-2) de la estructura del glicerol, es sustrato-específica. Mientras que glicerol-3-fosfato acil-transferasa y DAG acil-transferasa no poseen tal especificidad. También se ha determinado que liso-PC acil-transferasa prefiere 18:1-CoA en lugar de 16:0-CoA.

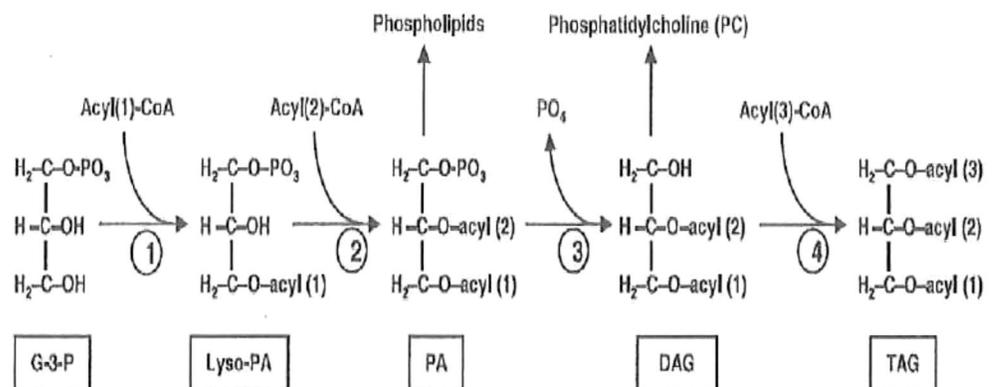


Figura 2. Biosíntesis de triglicéridos en algas. (1) glicerol-3-fosfato acil-transferasa citosólica, (2) ácido lisofosfatídico acil-transferasa, (3) ácido fosfatídico fosfatasa, (4) diacilglicerol acil-transferasa. Adaptado de Roessler *et al.*, 1994

HIPÓTESIS

La mayoría de los genes expresados de forma diferencial durante la inducción de la acumulación lipídica en *Chlorella protothecoides* están directamente relacionados con las rutas metabólicas lipídicas

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los genes inducidos durante la acumulación de lípidos en *Chlorella protothecoides*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Inducir la acumulación de lípidos en *Chlorella protothecoides* mediante el cultivo heterótrofo de dicha especie
- Corroborar el alto contenido lipídico en cultivos heterótrofos mediante la tinción rojo nilo para lípidos neutros
- Identificar y caracterizar los genes expresados diferencialmente durante la acumulación de lípidos en *Chlorella protothecoides*
- Cuantificar los cambios en los niveles de mRNA de los genes identificados en respuesta a las diferentes condiciones de crecimiento asociadas a la acumulación de lípidos
- Evaluar el posible papel que desempeñan los genes diferencialmente expresados en las rutas metabólicas inducidas durante la acumulación de lípidos en *Chlorella protothecoides*

METODOLOGÍA

1. Descripción del material biológico

Chlorella protothecoides es una microalga verde dulceacuícola. Contiene clorofila a y b. Forma almidón en sus cloroplastos (Lee, 2008). *Chlorella protothecoides* UTEX 25 fué la cepa utilizada en este trabajo, la cual fué adquirida de la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Texas (University of Texas Culture Collection of Algae). Fué aislada por primera vez en 1982 por Krüger a partir de savia de *Populus alba* lesionado.

2. Cultivos celulares

Se realizaron cultivos en lote (batch) de *Chlorella protothecoides* UTEX 25 bajo condiciones de autotrofismo y de heterotrofismo.

Cultivo autótrofo: La cepa UTEX se cultivó en medio Proteosa (Apéndice 1) con 1 mL/L de solución de vitaminas (Apéndice 2) y 6 mL/L de solución de metales traza (Apéndice 3). Dicho medio se designó como Medio Proteosa Basal. Las células se incubaron a una temperatura de 24 ± 1 °C con iluminación continua e intensidad de 4500 Lux. El cultivo se mantuvo en agitación magnética constante y recibió aereación continua en condiciones estériles, mediante burbujeo.

Cultivo heterótrofo: Se utilizaron tres tipos de medios enriquecidos para inducir sobreproducción lipídica en la cepa UTEX. Las condiciones físicas fueron las mismas que para el cultivo autótrofo: A) Medio Proteosa Basal enriquecido con 5.5 mM de glucosa, B) Medio Proteosa Basal enriquecido con 20 mM de glucosa, C) Medio Proteosa Basal enriquecido con 20 mM de glicerol

El cultivo autotrófo y el heterótrofo A, se prepararon para ser utilizados en la técnica de clonación sustractiva. B y C se prepararon posteriormente para realizar estudios comparativos en los niveles de expresión de genes, esto es, para qRT-PCR

Desarrollo de cultivos

Se mantuvieron cultivos primarios (stock) de 50 mL en matraces Erlenmeyer de 125 mL con tapón de algodón estéril. Una vez que alcanzaron una densidad aproximada de 15×10^6 céls/mL en luz continua, se cambiaron a un ciclo de luz/oscuridad (14:10 luz:oscuridad). Dichos cultivos fueron escalados a 1L y se utilizaron para inocular cultivos frescos de 1 L y 1.5 L con un número inicial de células de 2×10^6 . Una vez que los cultivos llegaron a la fase logarítmica tardía (día 4), las células se cosecharon mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 15 minutos, utilizando un rotor KOMP spin KA-14.250. Se formaron pellets y se descartó el sobrenadante. Los pellets se resuspendieron en 10 mL de agua ultrapurificada y se transfirieron a tubos Falcon de 14 mL, para ser centrifugados a 10,000 rpm durante 5 minutos en un rotor Sorvall HB-6. Los pellets sin sobrenadante se almacenaron a -80° C. Los

cultivos destinados al aislamiento de RNA fueron tratados con cicloheximida (20 µg/mL) inmediatamente antes de ser cosechados.

Análisis de crecimiento:

El crecimiento celular se cuantificó diariamente a través de conteo de células en el microscopio utilizando un hemocitómetro Fisher Scientific Ultra Plano de 0.1 mm de profundidad. Cada condición se contó por duplicado

3. Monitoreo del contenido lipídico

Para confirmar el incremento en el contenido de lípidos neutros en los cultivos heterótrofos, comparado con el del cultivo autótrofo de *Chlorella protothecoides*; se utilizó la tinción con Rojo Nilo (Lee, 1998) descrita a continuación: se formaron pellets de 1×10^6 células para cada cultivo y se almacenaron a 20° C. Los pellets fueron resuspendidos en 1 mL de buffer de fosfatos y se agregaron 6.25 µl de solución de Rojo Nilo (250 mg/L en acetona) como tinción. Se agitó vigorosamente la mezcla por medio de vortex. Una alícuota de 200 µl, fué depositada en cada pozo (por triplicado) de un microplato de fondo oscuro con capacidad para 96 pozos. Se realizaron 50 mediciones fluorométricas posteriores a los 10 y 30 minutos de la tinción, en un lector fluorométrico para plato de 96 pozos SPECTRA max M₂ (Molecular Devices) utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 576 nm.

Microscopía de fluorescencia

La tinción con Rojo Nilo se realizó de igual manera que la descrita en el párrafo anterior. Se tomó una alícuota de 5 μL de células teñidas de cada cultivo y se mezcló con el agente antidesvanecimiento ProLong[®] Gold antifade reagent (Invitrogen. Molecular Probes[™]). Las muestras se colocaron sobre un portaobjetos para poder ser visualizadas al microscopio invertido de transmisión de luz y epifluorescencia (Zeiss Axio Observer Inverted Microscope for transmitted light and epifluorescence), utilizando una longitud de onda de excitación de 550 ± 25 nm y emisión de 605 ± 70 nm con un set de filtros 43 HE.

4. Extracción de RNA

Una vez establecidas las condiciones de crecimiento bajo las cuales la producción lipídica aumentaba, se realizaron nuevos cultivos para su cosecha y posterior aislamiento de RNA. Los cultivos utilizados para dicho procedimiento fueron: 1.5 L de cultivo autótrofo con una densidad celular de $3 \times 10^6/\text{mL}$ y 1.5 L de cultivo heterótrofo (glucosa 5.5 mM) con una densidad celular de $10 \times 10^6/\text{mL}$. Inmediatamente antes de la cosecha, se agregó cicloheximida (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a cada cultivo con la finalidad de bloquear la traducción del mRNA. Las células fueron cosechadas en frío (4^o C) y centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 minutos en un rotor KOMP spin KA-14.250. Se formaron pellets y se descartó el sobrenadante. Los pellets fueron resuspendidos en 5 mL de agua

tratada con DEPC, transferidos a tubos Falcon de 14 mL y centrifugados a 10,000 rpm a una temperatura de 4° C durante 5 minutos usando un rotor Sorvall HB-6. Se descartó el sobrenadante y los pellets se almacenaron a una temperatura de -80° C. Cada pellet congelado fue sometido a pulverización con ayuda de un mortero enfriado en hielo seco. Se realizaron dos técnicas de extracción de RNA con el objeto de comparar su eficiencia en *C. protothecoides*.

a) Técnica Tri Reagent de Sigma modificada (Hildebrand y Dahlin, 2000): Se resuspendieron 1.5 g de pellet pulverizado en 5 mL de solución Tri Reagent (fenol y tiocianato de guanidina) para desnaturalizar proteínas rápidamente e inactivar RNAasas intracelulares. Se agregaron 1.25 mL de cloroformo y con el propósito de separar el RNA (fase superior) del DNA (interfase) y proteínas (fase inferior), se centrifugó la suspensión. El RNA proveniente de la fase superior acuosa, se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol, se disolvió en agua estéril tratada con DEPC y se almacenó a -20°C.

b) Método de fenol caliente (de Vries, 1982): Se preparó una solución caliente (60 °C) de 0.2 M de acetato de sodio, pH 5.0, 1% SDS y 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se agregaron 4 mL de dicha solución caliente a 1.5 g de material pulverizado, se añadieron 4 mL de fenol destilado para desnaturalizar proteínas, inactivar RNAasas y remover lípidos. La suspensión se mezcló vigorosamente durante 5 minutos a 25°C, se agregaron 4 ml de cloroformo para una mayor remoción de lípidos y para separar el RNA

en la fase acuosa. La suspensión se agitó nuevamente durante 10 minutos. Después de centrifugar a 9000 rpm durante 30 minutos, se removió la fase acuosa para su re-extracción con cloroformo, se mezcló en 2 M de LiCl y se llevó a cabo una precipitación durante toda la noche (overnight) del RNA a 4°C. El RNA se colectó mediante centrifugación, se lavó una vez con 2 M LiCl, dos veces con etanol al 80%, se disolvió en agua estéril tratada con DEPC y se almacenó a -20 °C. La calidad del RNA fue evaluada mediante corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.2 %

5. Aislamiento de mRNA

Se purificó el mRNA utilizando el MicroPoly(A) Purist™ small scale mRNA purification kit (Ambion), siguiendo el procedimiento y recomendaciones del fabricante. El mRNA se cuantificó en un espectrofotómetro de escaneo con luz visible y ultravioleta / UV/Visible Scanning Spectrophotometer DU® Series 730 (Beckman Coulter) utilizando una longitud de onda de 260 nm.

6. Clonación sustractiva

Se utilizó el PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) para llevar a cabo una clonación sustractiva cDNA delantera siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pasos involucrados en dicha técnica se muestran en la Figura 3 y se detallan a continuación.

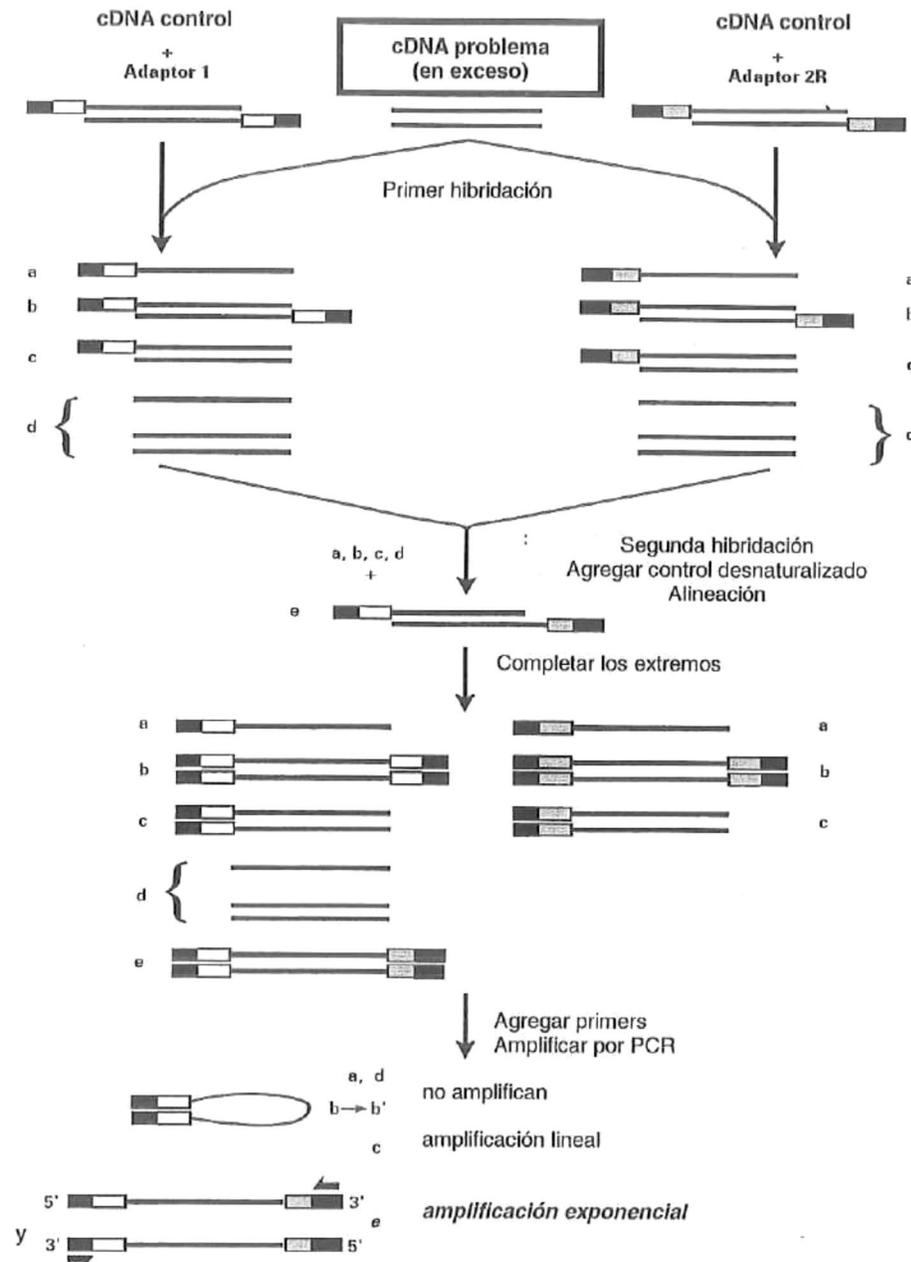


Figura 3. Diagrama esquemático de la técnica de clonación sustractiva. Las moléculas tipo e se forman solo si la secuencia del cDNA problema posee regulación alta. Las líneas sólidas representan al cDNA problema o al cDNA control digeridos por Rsa I. Las cajas sólidas representan la parte externa de las cadenas largas del Adaptador 1 y 2R y de la secuencia del cebador 1 correspondiente. Las cajas vacías representan la parte interna del adaptador 1 y de su correspondiente secuencia de cebador 1 anidado. Las cajas sombreadas representan la parte interna del adaptador 2R y de su secuencia correspondiente de cebador 2R anidado.

a) Síntesis de cDNA:

Se realizó una transcripción reversa con 1.6 µg de mRNA utilizando la enzima AMV transcriptasa reversa (Clontech) con la finalidad de sintetizar la primera cadena de cDNA para cada uno de los dos cultivos comparados: el problema <cultivo heterotrófico (glucosa 5.5 mM) > y el control <cultivo autotrófico>. La síntesis de la segunda cadena de cDNA se realizó con T4 DNA Polimerasa (Clontech). Se utilizó Rsa I para digerir los cDNAs control y problema. Esta enzima posee un sitio de restricción de cuatro bases y produce fragmentos de cDNA de doble cadena con extremos romos. Los cuales son necesarios para la sustracción y requeridos para la unión de adaptadores.

b) Ligación de adaptadores

El cDNA problema se dividió en dos porciones y se ligó (T4 DNA Ligasa) un adaptador diferente a cada porción. Los extremos de los adaptadores estaban desfosforilados, de manera que solo una cadena de cada adaptador logró unirse al extremo 5' del cDNA. Los dos adaptadores tenían segmentos con secuencia idéntica, lo cual les permitió la unión del primer PCR una vez que los extremos fueron rellenados. No se ligaron adaptadores al cDNA control.

c) Hibridaciones

Se realizaron dos hibridaciones. En la primera se agregó cDNA control (digerido por Rsa I) en exceso, a cada muestra problema. Las muestras se desnaturalizaron mediante calor, para permitir una posterior alineación y

generación de segmentos tipo **a**, **b**, **c** y **d** para cada muestra (Fig. 3). Las moléculas tipo **a** fueron enriquecidas para expresión diferencial. Los cDNAs no expresados diferencialmente formaron moléculas tipo **c** con el cDNA control. Durante la segunda hibridación, se mezclaron entre sí las dos muestras de la primer hibridación y se agregó cDNA control desnaturalizado para enriquecer aún mas las secuencias expresadas diferencialmente. Se formaron así moléculas híbridas tipo **e**, las cuales representaron cDNA expresado diferencialmente con adaptadores diferentes en cada extremo. Después de rellenar los extremos utilizando DNA polimerasa, la nuevas moléculas híbridas formaron sitios de unión diferentes para cebadores anidados en sus extremos 5' y 3'.

d) Amplificación por PCR

Se realizó PCR con la población total de moléculas para lograr amplificar las secuencias deseadas que fueron expresadas de forma diferencial. Solamente aquellos cDNAs únicos en la población problema tenían adaptadores diferentes en cada extremo. Lo cual les permitió su amplificación por PCR (moléculas tipo **e**). Los cDNAs con un solo adaptador, amplificaron de forma lineal (moléculas tipo **c**), aquellos cDNAs con el mismo adaptador en cada extremo, formaron estructuras secundarias y no lograron ser amplificados (moléculas tipo **b**), los cDNAs con sitios de alineación faltantes (moléculas tipo **a** y **d**) tampoco fueron amplificados. Los productos de la sustracción fueron

analizados mediante su corrimiento en gel de agarosa/EtBr al 2% con buffer TAE 1X.

7. Clonación y transformación de células competentes

Los cDNAs amplificados fueron clonados (TOPO TA Cloning[®] kit para secuenciación, Invitrogen) en el vector plasmídico pCR[®]4-TOPO[®]. Posteriormente células TOP 10 *E. coli* cells fueron transformadas siguiendo el Protocolo de Transformación Química One Shot[®], Invitrogen.

8. Genotecas cDNA

Las colonias de *E. coli* transformadas (bibliotecas sustractivas delanteras), fueron transferidas a placas numeradas de 50 recuadros (LB-agar + Ampicilina 100 µg/mL), crecieron durante la noche a 37° C y se almacenaron a 4° C. Un inóculo de cada colonia fue transferido a medio líquido (LB-agar + Ampicilina 100 µg/mL) e incubado a 37° C durante la noche con agitación constante. Se tomaron alícuotas de 0.5 mL de cada una y fueron centrifugadas a 7,000 rpm para formar pellets y resuspenderlas en medio LB con glicerol (15 % v/v) para criopreservación a -80°C.

9. Extracción de DNA Plasmídico

Se extrajo DNA Plasmídico de cada colonia crecida en medio selectivo líquido, utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) siguiendo las

recomendaciones del fabricante. El plásmido fué digerido con *Eco RI* para liberar el inserto. El tamaño del producto fué evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y el DNA se cuantificó en un espectrofotómetro de escaneo UV/Visible DU[®] Serie 730 (Beckman Coulter) utilizando una longitud de onda de 260 nm.

10. Determinación de secuencias y análisis

Los cDNAs clonados producto de la sustracción, fueron enviados a la compañía SeqXcel, Inc. (<http://www.seqxcel.com/>) para ser secuenciados mediante la técnica BigDye Terminator Cycle Sequencing chemistry 3.1 utilizando el Analizador Genético ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Cada secuencia resultante fué editada en el programa Sequencher 4.5 y analizada por comparación con secuencias preexistentes utilizando la base de datos de traducción nucleotídica tBLASTx (Altschul, 1997).

11. Caracterización de variaciones en los niveles de mRNA para genes seleccionados

Los niveles de mRNA correspondientes a los genes identificados en las genotecas cDNA de sustracción delantera, fueron cuantificados después de crecer las células autotrófica y heterotróficamente bajo las tres condiciones de cultivo previamente mencionadas en la sección 2. Solo aquellas secuencias claramente relacionadas con el metabolismo de lípidos, de glucosa, ciclo TCA,

mitocondria, cloroplasto y regulación génica fueron seleccionadas y su expresión fué evaluada mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) utilizando el Sistema LightCycler® Carousel-Based PCR y el kit LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR GREEN I (Roche).

Como primer paso, el DNA se eliminó del RNA mediante digestión en columna con el Set RNAase-Free DNase (Qiagen) seguido de una purificación de RNA en columnas spin de membrana de sílica utilizando el RNeasy Plus Mini Kit (50) de Qiagen. La síntesis de la primer cadena de cDNA se llevó a cabo en RNA tratado con DNasa, utilizando 3.3 µg de RNA total siguiendo el protocolo del fabricante (SuperScriptTM III Reverse Transcriptase, Invitrogen). El cDNA diluído 30-240 veces (para asegurar la amplificación en el rango lineal) fué combinado con distintos pares de cebadores diseñados utilizando el Programa Scitools Primer Quest de la compañía Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>). El diseño de los cebadores se condicionó a tamaños entre 20 y 26 nucleótidos, temperatura de fusión (T_M) con un rango de 60 a 65 °C, contenido GC entre 50% a 60% y longitud de producto de 90 a 250 pares de bases. Los productos cortos, se diseñaron para evitar repeticiones largas de adeninas y timinas presentes en algunas secuencias de DNA utilizadas como templetas. Los cebadores y la mezcla de cDNA se combinaron con SYBR Green PCR master mix (Roche), se incubaron en el LightCycler® Carousel-Based PCR System (Roche) de acuerdo al protocolo touchdown: 1 ciclo de 95 °C por 600 segundos; 1 ciclo of 95 °C por

10 segundos, 68 °C por 10 segundos, 72 °C por 10 segundos, seguido de una reducción de 2 °C para el alineamiento en cada ciclo consecutivo hasta que la temperatura de alineación llegase a 40 °C después de 15 ciclos y fuese mantenida a 40 °C hasta hacer un total de 50 ciclos. Se generó una curva standard para cada set de primers gen-específicos a partir de diluciones de DNA genómico. El software del Sistema LightCycler calculó la cantidad en nanogramos de moléculas blanco, al graficar el logaritmo de fluorescencia contra el número de ciclos, estableciendo una línea basal en el eje x. La línea basal identificaba el ciclo durante el cual la señal logarítmica lineal de cada muestra podía distinguirse del fondo. Se midió el punto de cruzamiento del eje x para cada cada standard y se graficó contra el logaritmo de la concentración, produciendo una curva standard. Las concentraciones de las secuencias blanco en las muestras problema fueron extrapoladas de la curva standard. El punto de cruzamiento para cada set de primers gen-específicos se convirtió a nanogramos equivalentes, utilizando la curva standard. Un nivel elevado de mRNA en una muestra, tenía un punto de cruzamiento bajo debido a que la muestra alcanza la línea basal con menos ciclos.

Los niveles de mRNA de todas las muestras entre las diferentes corridas y diluciones, fueron normalizados para reducir la variación y obtener una mejor interpretación de los niveles de expresión. Las muestras fueron normalizadas entre dos diluciones diferentes: se calculó el promedio de las 4 condiciones de cultivo por corrida al determinar la media de los promedios para las dos

diluciones. Los valores de cada condición fueron ajustados por la proporción o ratio del promedio de las cuatro muestras comparado con la media de las dos diluciones. Se calcularon el promedio y las desviaciones standard normalizadas. Los niveles de expresión génica fueron graficados y analizados.

RESULTADOS

1. Condiciones de crecimiento

Chlorella protothecoides UTEX 25 fue cultivada bajo condiciones autotróficas y heterotróficas. Para cada condición se realizaron conteos celulares diarios. La Fig. 4 muestra que el crecimiento más acelerado ocurrió en heterotrofismo (Hu *et al*, 2006) al agregar glicerol 20 mM al medio basal Proteosa, seguido del crecimiento heterótrofo con glucosa 5.5 mM y de glucosa 20 mM. El crecimiento más lento ocurrió bajo condiciones autotróficas.

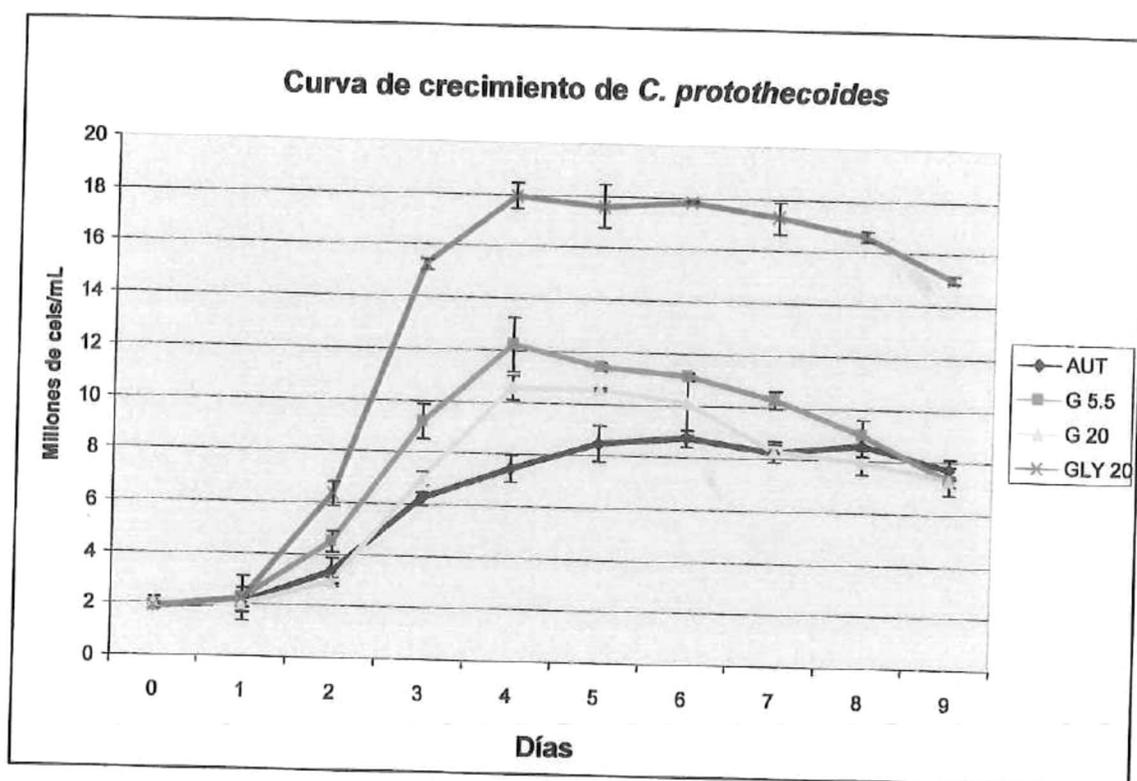


Figura 4. Gráfica comparativa del crecimiento de *C. protothecoides* bajo 4 condiciones de cultivo. AUT representa el crecimiento autotrófico, G 5.5 representa el crecimiento heterotrófico con glucosa 5.5 mM, G 20 representa el crecimiento heterotrófico con glucosa 20 mM y GLY 20 representa el crecimiento heterotrófico con glicerol 20 mM.

Cambios evidentes en el color fueron visualizados en los cultivos heterotróficos: durante la fase logarítmica de crecimiento, el color verde que caracteriza a los cultivos autotróficos de *Chlorella*, se perdió durante las tres condiciones heterotróficas. Un tono amarillento apareció sobre todo en los cultivos con glucosa, mientras que el cultivo autótrofo no cambió de color, manteniendo su tono verde brillante (Fig. 5).

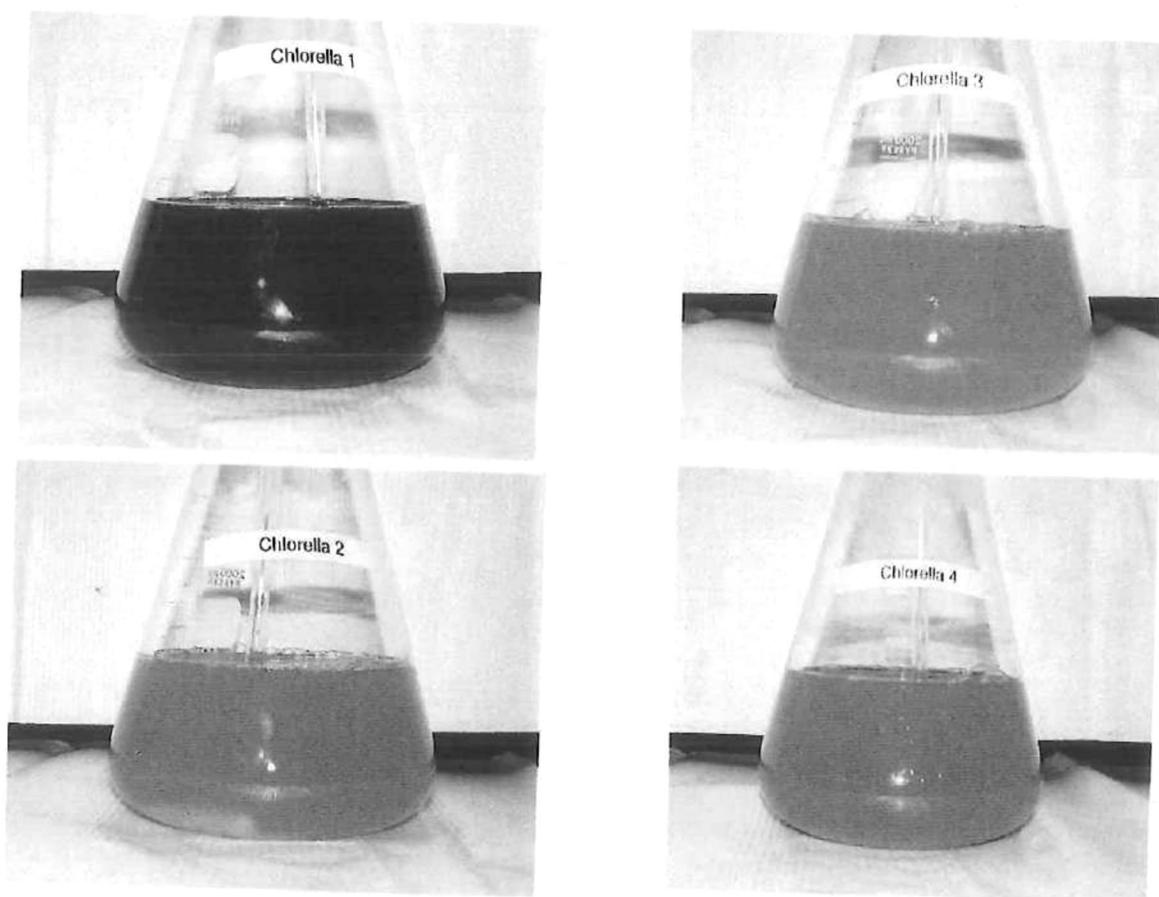


Figura 5. Vista macroscópica de cultivos líquidos de *Chlorella protothecoides* durante la fase logarítmica. Chlorella 1 muestra el cultivo autotrófico. Chlorella 2 muestra el cultivo heterotrófico con glucosa 5.5 mM, Chlorella 3 muestra el cultivo heterotrófico con glucosa 20 mM, Chlorella 4 muestra el cultivo heterotrófico con glicerol 20 mM

El crecimiento en placas de agar bajo condiciones de autotrofismo y heterotrofismo durante siete días también fue diferente: se formaron colonias autotróficas pequeñas con una pigmentación verde brillante, mientras que las colonias heterotróficas (glucosa 5.5 mM) desarrollaron una pigmentación amarilla y eran de mayor tamaño que las autotróficas; tal como se muestra en la Fig. 6.

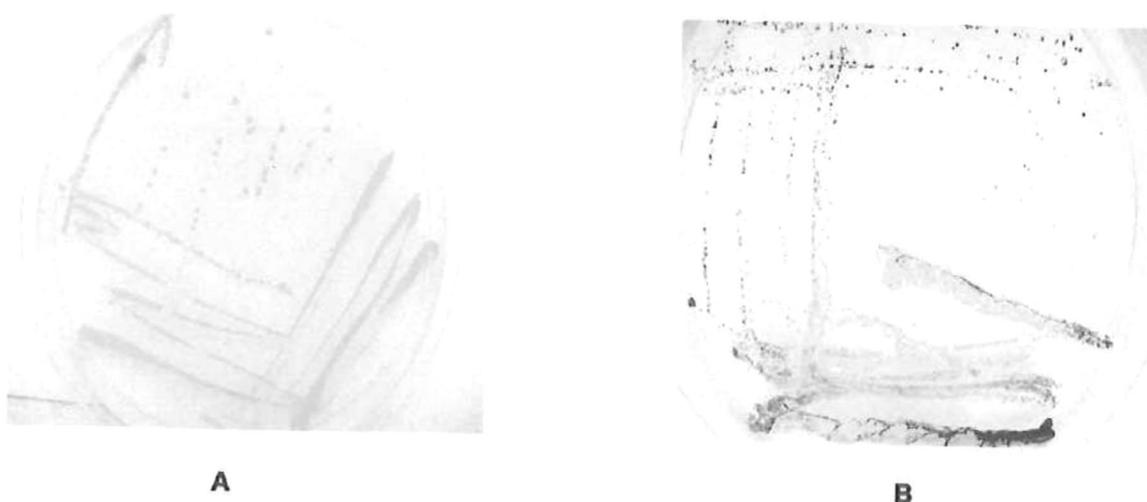


Figura 6. Vista macroscópica del crecimiento de colonias de *Chlorella protothecoides* en placas de agar. A muestra el crecimiento bajo condiciones heterotróficas (glucosa 5.5 mM). B muestra el crecimiento bajo condiciones autotróficas

2. Análisis lipídico

La acumulación lipídica en *Chlorella protothecoides* se determinó utilizando el método con rojo nilo, reportado por Lee *et al* (1998), que es un tinte fluorescente para lípidos neutros. Las unidades utilizadas para dicha medición

fueron RFU (unidades relativas de fluorescencia), las cuales son unidades arbitrarias relacionadas a la intensidad de la fluorescencia.

La Fig. 7 muestra la fluorescencia más alta y por lo tanto el contenido lipídico más abundante en los dos cultivos heterotróficos suplementados con glucosa. Dichos cultivos desarrollaron un contenido lipídico similar; a una concentración 5.5 mM se produjo 25 veces más lípido mientras que a 20 mM cerca de 23 veces más con respecto al cultivo autotrófico. Cuando las células fueron crecidas heterotróficamente con glicerol 20 mM, su contenido lipídico fué mucho menor comparado con el de las dos condiciones heterotróficas con glucosa. El medio con glicerol 20 mM tuvo un incremento lipídico de cuatro veces comparado con el autotrófico. La menor fluorescencia y por lo tanto la menor cantidad de lípidos neutros, ocurrió en el cultivo autotrófico.

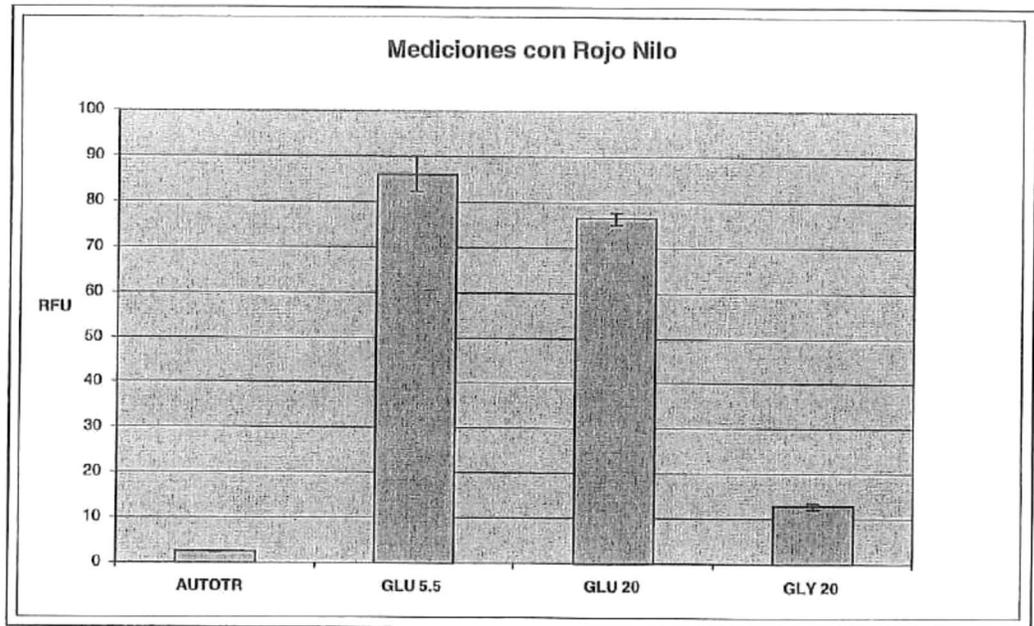


Figura 7. Mediciones lipídicas utilizando el tinte fluorescente rojo nilo en 4 condiciones diferentes: AUTOTR es el cultivo autotrófico, GLUC 5.5 es el cultivo heterotrófico con glucosa 5.5 mM, GLUC 20 es el cultivo heterotrófico con glucosa 20 mM, GLY 20 es el cultivo heterotrófico con glicerol 20 mM. RFU (unidades relativas de fluorescencia) es la fluorescencia de los lípidos neutros medida en unidades arbitrarias.

Se tomaron imágenes microscópicas de células cultivadas autotróficamente (no inducidos para producción de lípidos) y aquellas inducidas con glucosa 5.5 mM cultivadas heterotróficamente; ambas teñidas con rojo nilo. La Fig. 8 muestra un notable incremento en la fluorescencia de las células algales inducidas a la acumulación de lípidos y una muy baja fluorescencia emitida por las células autotróficas (no inducidas).

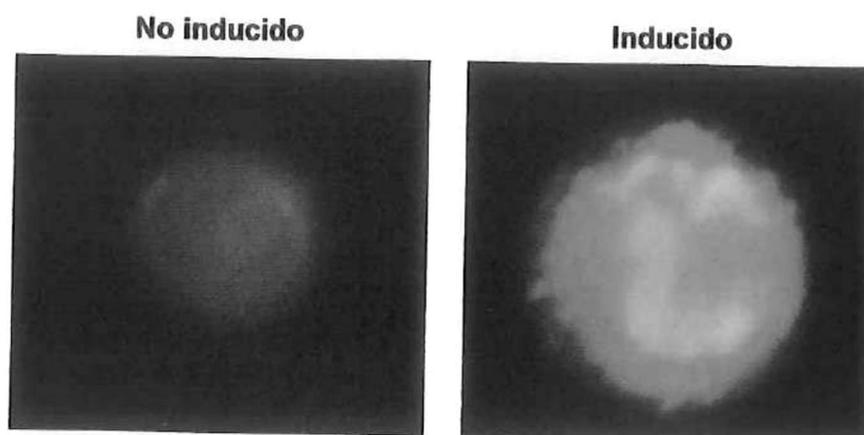


Figura 8. Imágenes microscópicas con fluorescencia de *Chlorella protothecoides*. A la izquierda se muestra una célula autotrófica/no inducida y a la derecha una célula heterotrófica (glucosa 5.5 mM) inducida para la sobreproducción lipídica

En los cultivos heterotróficos con glucosa 5.5 mM, los lípidos parecen estar organizados intracelularmente como gotas lipídicas citoplasmáticas (Fig. 9 B). No se observaron gotas lipídicas en las células autotróficas (Fig. 9 A).

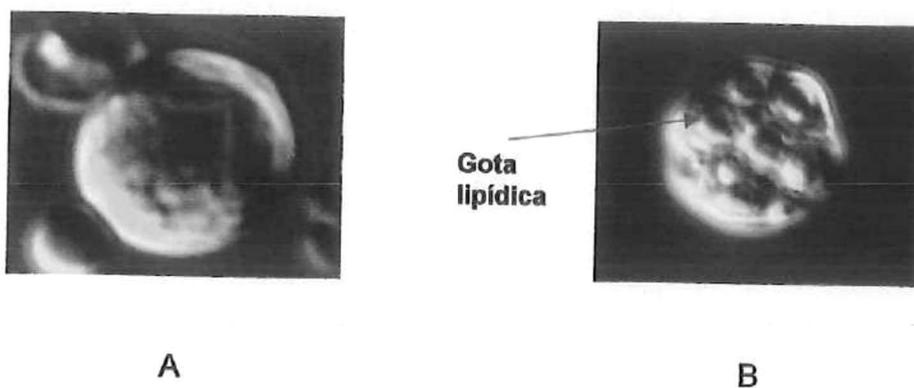


Figura 9. Imagen microscópica de *Chlorella protothecoides* bajo condiciones autotrofismo (A) y de heterotrofismo con 5.5 mM de glucosa (B). Se muestran gotas lipídicas en B señaladas con una flecha azul.

3. Análisis molecular

Extracción de RNA

Se evaluaron dos técnicas de aislamiento de RNA: el método de fenol caliente y el método de TRIzol. En el carril 1 de la Fig. 10 se señala mediante una flecha azul, el RNA de transferencia (tRNA) obtenido al utilizar la técnica de TRIzol. Ya que dicho RNA es de poco o nulo interés para propósitos de la clonación sustractiva. Al utilizar el método de fenol caliente no se obtuvo tRNA. Se optó por elegir ésta última técnica para extracción de RNA total.

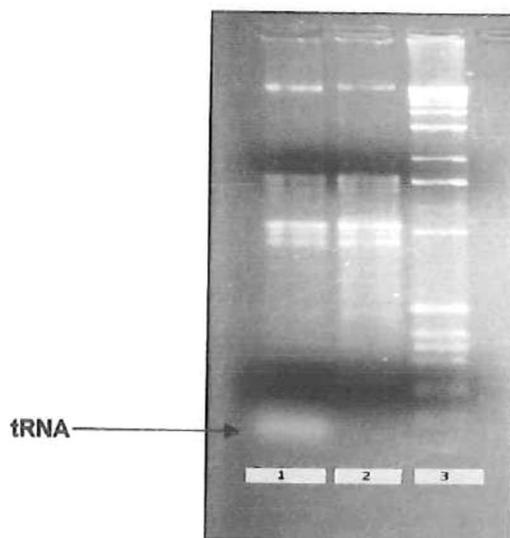


Figura 10. Comparación de dos métodos de extracción de RNA: TRIzol (carril 1) y método de fenol caliente (carril 2), marcador de peso molecular (carril 3). Las muestras de RNA fueron corridas en un gel de agarosa al 1.2 % teñido con bromuro de etidio. La flecha azul muestra presencia de tRNA en el carril 1

Clonación sustractiva

Mediante la técnica de clonación sustractiva delantera de cDNA basada en PCR, se aislaron un total de 365 clonas derivadas de transcritos inducidos mediante el crecimiento heterótrofo (añadiendo 5.5 mM de glucosa al medio

proteosa basal). Una vez realizadas la extracción plasmídica y la digestión para liberar el inserto, se evaluaron tanto la presencia como el tamaño de cada inserto y se secuenciaron un total de 250 genes. Dichas secuencias fueron examinadas para remover aquellas correspondientes a vectores de clonación, comparadas entre sí para identificar clones repetidos y analizadas mediante tBLASTx (Altschul *et al.*, 1997) para identificar posibles homólogos. A partir de dicho análisis, se identificaron 99 genes únicos. De acuerdo a su homología con genes conocidos, las secuencias fueron clasificadas de la siguiente forma: 30 genes con homología no significativa (genes sin correspondencia), 3 genes con función desconocida, 25 genes ribosomales, 9 genes homólogos a genes de otras algas (genes alga-homólogos), 8 genes de metabolismo de glucosa, 3 genes lipídicos, 3 genes que codifican para proteínas de cloroplasto, 5 genes que codifican para proteínas mitocondriales, 1 gen del ciclo TCA, 2 genes de síntesis de aminoácidos, 6 genes involucrados en el procesamiento de mRNA o en la transposición, 2 genes de plegamiento de proteínas, 1 gen de histona y 1 gen involucrado en formación de vesícula; de acuerdo a lo mostrado en tablas I a XII. Las tablas refieren el nombre del clon, el organismo y el gen correspondiente con mayor pariedad, así como el valor de E que le da significado estadístico a los alineamientos resultantes al utilizar tBLASTx. A menor valor de E, más significativo es un alineamiento (Altschul *et al.*, 1997)

Tabla I. Genes con función desconocida

Clona	Gen identificado	Valor de E
A43	<i>R. norvegicus</i> mRNA con similitud a proteína de hemocromatosis	9e-04
C9	<i>Arachis hypogaea</i> mRNA con similitud a proteína precursora PRP25 rica en prolina ácida	1e-14
F2	<i>Dictyostelium discoideum</i> AX4 proteína hipotética (DDBDRAFT_0202579) mRNA	7e-05

Tabla II. Genes alga-homólogos

Clona	Gen identificado	Valor de E
B22,C41S	<i>C. reinhardtii</i> proteína integral de membrana	6e-26
B25	<i>C. reinhardtii</i> proteína hipotética	6e-16
B28	<i>C. reinhardtii</i> histona H2B variante (HBV1) mRNA	3e-24
B29,D29,D35	<i>C. protothecoides</i> mRNA parcial para cargador de AA (gen dee 4)	7e-49
B43	<i>C. incerta</i> proteína asociada a microtúbulos	3e-18
C43	<i>C. reinhardtii</i> proteína hipotética (CPLD38) mRNA	2e-25
D27	<i>C. reinhardtii</i> enzima ubiquitina-conjugativa (UBC10)	2e-77
D33	<i>C. reinhardtii</i> gen de flagelo largo 2 (LF2)	7e-08
E23,E42,F9	<i>C. protothecoides</i> mRNA para ferritina putativa (gen dee 188)	2e-68

Tabla III. Genes de metabolismo de glucosa

Clona	Gen identificado	Valor de E
A2-B7-A18	Proteína similar a cotransportador de hexosa	6e-16
C8	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa glicolítica	1e-14
C15	ADP-L-glicero-D-manoheptosa-6-epimerasa	0.012
C27	<i>C. reinhardtii</i> glicógeno sintasa kinasa 3	3e-12
D24	<i>C. reinhardtii</i> proteína fosfatasa 1 (PP1A)	4e-22
D26	<i>C. reinhardtii</i> epimerasa/ deshidratasa NAD dependiente(SNE5) mRNA	7e-09
E6	<i>C. reinhardtii</i> proteína pronosticada (CGLD19) mRNA	1e-05
F12	<i>Gallus gallus</i> mRNA para proteína ABC transportadora	3e-04

Tabla IV. Genes lipídicos

Clona	Gen identificado	Valor de E
A25-A26	Gen de propiomelanocortina	0.036
C15	<i>C. reinhardtii</i> policétido sintetasa tipo I	0.059
E31	<i>C. reinhardtii</i> acil-ACP desaturasa plastídica (FAB2)	5e-19

Tabla V. Genes que codifican para proteínas cloroplásticas

Clona	Gen identificado	Valor de E
A30-A34- E16-C38	<i>C. reinhardtii</i> translocón de membrana interna de cloroplasto	2e-15
C12	<i>Helicosporidium</i> sp. ex <i>Simulium jonesii</i> ferredoxina plastídica mRNA; gen nuclear para producto plastídico	2e-18
C26	<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i> proteína pronosticada (PHYPADRAFT_27510)	1e-12

Tabla VI. Genes que codifican para proteínas mitocondriales

Clona	Gen identificado	Valor de E
A35	<i>C. reinhardtii</i> ubiquinol: citocromo C óxido-reductasa	3e-21
B19	mRNA para NADH-citocromo b5 reductasa	1e-34
C6-C39	<i>C. protothecooides</i> mRNA para ubiquinona-citocromo c reductasa (dee10 gene) putativa	6e-64
F15	<i>O. lucimarinus</i> CCE9901 proteína pronosticada (CYC1)	6e-07
I 7	<i>Arabidopsis thaliana</i> citocromo c oxidasa-relacionada	1e-85

Tabla VII. Gen de ciclo TCA

Clona	Gen identificado	Valor de E
D3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> subunidad mitocondrial Fe/S de succinato-deshidrogenasa	6e-12

Tabla VIII. Genes de síntesis de aminoácidos

Clona	Gen identificado	Valor de E
F11	<i>Prototheca wickerhamii</i> mRNA para histidinol-fosfato transaminasa	2e-07
F20-E28	<i>A. thaliana</i> mRNA para familia de deshidratasas (AT1G29810)	5e-20

Tabla IX. Genes involucrados en procesamiento de mRNA o transposición

Clona	Gen identificado	Valor de E
A32	<i>C. reinhardtii</i> proteína ring-box	3e-60
B26	<i>Macaca mulata</i> 2 (LOC695164) mRNA pronosticado como similar a proteína tumoral p73 transcripto variante	2e-05
C23	<i>Emiliania huxleyi</i> pequeña ribonucleoproteína d2 putativa	2e-09
E25-E36	<i>C. reinhardtii</i> factor de splicing, componente de U5 snRNP y de el spliceosoma (PRP8) mRNA	9e-15
E38-E39	<i>C. reinhardtii</i> proteína pronosticada (CHLREDRAFT_190192)	7e-20
H47-I9	<i>Klebsiella pneumoniae</i> transposón TN3926, gen parcial tra7 para transposasa, región contigua pSL007	6e-04

Tabla X. Genes de plegamiento de proteínas

Clona	Gen identificado	Valor de E
C14	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> peptidil-prolil cis-trans isomerasa, tipo ciclofilina (CYN18-1) mRNA	2e-10
E11-E12	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> sahsp70 mRNA para proteína 70 de shock por calor	6e-35

Tabla XI. Gen de histona

Clona	Gen identificado	Valor de E
C31,B28	<i>C. reinhardtii</i> variante de histona H2B (HBV1) mRNA	3e-24

Tabla XII. Gen involucrado en formación de vesícula

Clona	Gen identificado	Valor de E
A19	<i>Oryza sativa</i> (grupo cultivable japónica) Os01g0265100	2e-12

qRT-PCR

Se seleccionaron genes de cada categoría (tablas II a la XII) en base a su posible relevancia en la acumulación de lípidos, a su posible relevancia en el crecimiento heterótrofo y a su valor de E. Se procedió a evaluar los niveles de mRNA mediante qRT-PCR. Se realizó una cuantificación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para cada gen seleccionado con el fin de medir el nivel de expresión durante el crecimiento autótrofo y heterótrofo. Se utilizaron las tres condiciones de heterotrofismo (glucosa 5.5 mM, glucosa 20 mM y glicerol 20 mM) en lugar de una sola, como en la técnica de clonación sustractiva. Los datos son presentados a continuación por categoría de genes seleccionados.

Genes alga-homólogos

En la Fig. 11 se muestran los niveles de mRNA correspondientes a dos genes seleccionados con homología a genes de algas: a la izquierda se observa el gen *dee 4* de *Chlorella protothecoides* (mRNA parcial para cargador de aminoácido) mostrando un incremento continuo de mRNA comparando autotrofismo con las 3 condiciones de heterotrofismo: se observa un triple

aumento con glucosa 5.5 mM, un incremento cuádruple con glucosa 20 mM y un séxtuple aumento con glicerol 20 mM. A la derecha, se observa el gen de *Chlamydomonas incerta* que codifica para una proteína asociada a microtúbulos, el cual muestra un triple incremento bajo la condición glucosa 20 mM seguido de un doble aumento con glicerol 20 mM y sin inducción en glucosa 5.5 mM. Todos comparados con la condición autotrófica.

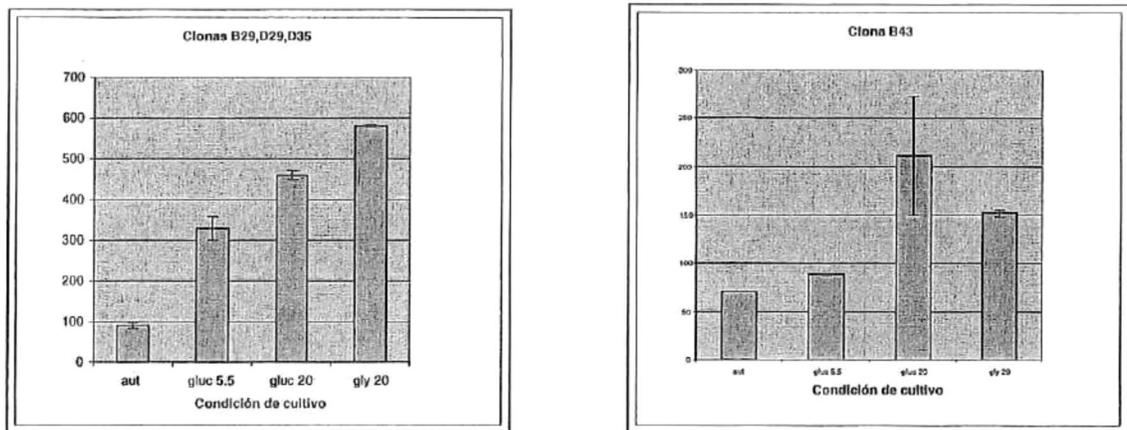


Figura 11. Niveles de mRNA para la clonas B29,D29,D35: *Chlorella protothecoides* mRNA parcial para cargador de aminoácidos (gen dee 4) y para la clona B43 *Chlamydomonas incerta* proteína relacionada con microtúbulos. El eje y muestra el nivel de inducción en ng/μL mientras que el eje x, la condición de cultivo correspondiente: aut indica la condición autotrófica, gluc 5.5 indica la condición heterotrófica con glucosa 5.5 mM, gluc 20 indica la condición heterotrófica con 20 mM de glucosa y gly 20 la condición heterotrófica con 20 mM de glicerol.

Genes lipídicos

Los tres genes involucrados en metabolismo lipídico fueron seleccionados para realizar qRT-PCR; gen propiomelanocortina, gen poliuretido sintetasa y gen plastídico acil-ACP desaturasa. Los tres genes presentaron la mayor inducción bajo la condición de cultivo con glicerol 20 mM, tal como se muestra en la Fig. 12. El gen desaturasa muestra dicha inducción

de manera contundente, puesto que la inducción es nula en la condición autotrófica y en glicerol es 7 veces mayor que en los cultivos heterotróficos con glucosa.

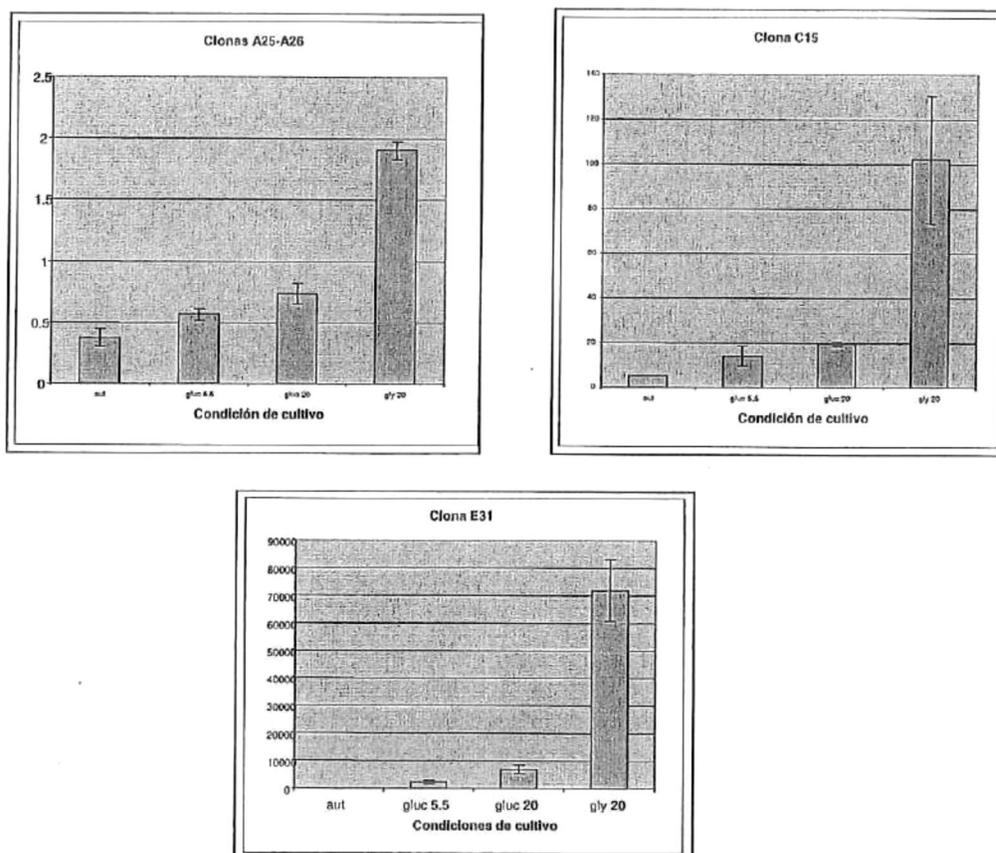


Figura 12. Niveles de mRNA para las clonas A25-A26 gen de propiomelanocortina, clona C15: *Chlamydomonas reinhardtii* policétido sintetasa tipo I y clona E31: *Chlamydomonas reinhardtii* gen plástido acyl-ACP desaturasa (FAB2).

Genes de metabolismo de glucosa

La Figura 13 muestra los dos genes glucosídicos seleccionados para analizar niveles de expresión de mRNA; a la izquierda se observa el gen co-transportador de hexosa y a la derecha el gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa. Ambos genes presentaron su máxima inducción en la

condición heterotrófica con glicerol 20 mM, el primero mostró un inducción aumentada 16 veces y el segundo 6 veces. Las condiciones heterotróficas con glucosa mostraron un aumento en la inducción a la par que el incremento de glucosa; doble inducción en baja concentración de glucosa y quíntuple inducción en alta concentración de glucosa, para el gen co-transportador de hexosa. El gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa presentó doble inducción en glucosa baja y triple inducción en glucosa alta.

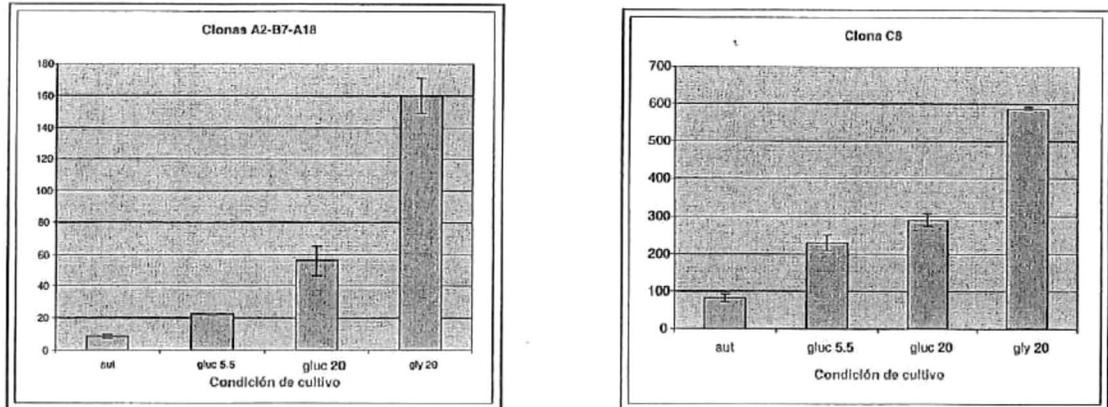


Figura 13. Niveles de mRNA para clonas A2-B7-A18: gen co-transportador de hexosa y clona C8: gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.

Gen de ciclo TCA (Krebs)

El gen que codifica para la subunidad mitocondrial Fe/S de succinato deshidrogenasa de *Chlamydomonas reinhardtii* presentó una doble inducción en la condición 20 mM glicerol. Este gen fué considerado sin inducción en las condiciones con baja y alta concentración de glucosa (Fig. 14).

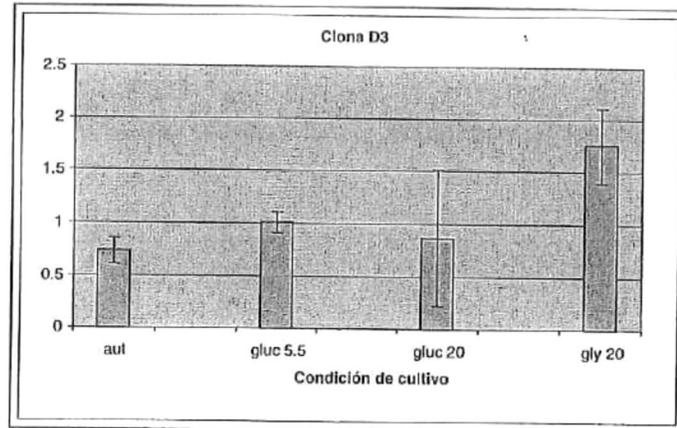


Figura 14. Niveles de mRNA para la clona D3. Subunidad mitocondrial Fe/S de succinato deshidrogenasa.

Genes que codifican para proteínas cloroplásticas

El gen de *Physcomitrella patens* que codifica para proteína pronosticada (PHYPADRAFT_27510) y que funciona como regulador negativo de la expresión de genes fotosintéticos específicos en respuesta a la luz y al oxígeno; presentó una única inducción en la condición de 5.5 mM de glucosa (Fig. 15).

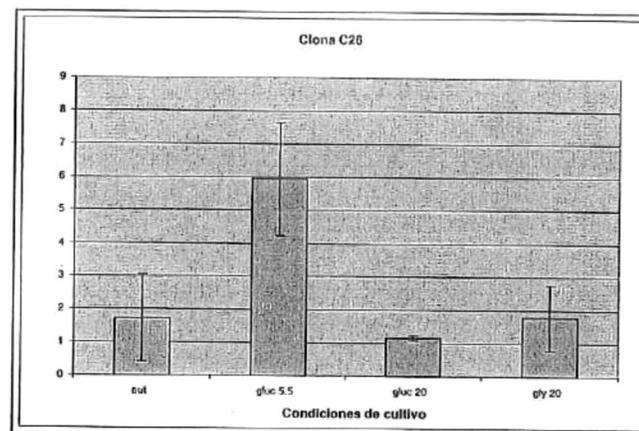


Figura 15. Niveles de mRNA para la clona C26: gen que codifica para proteína pronosticada (regulador negativo de la expresión de genes fotosintéticos específicos en respuesta a luz y al oxígeno).

Gen que codifica para proteínas mitocondriales

El mRNA de *Chlorella protothecoides* para ubiquinona putativa citocromo c reductasa (gen dee10) mostró una doble inducción en glucosa 5.5 mM y en glicerol 20 mM mientras que en glucosa 20 mM, presentó una inducción aumentada 2.5 veces (Fig. 16).

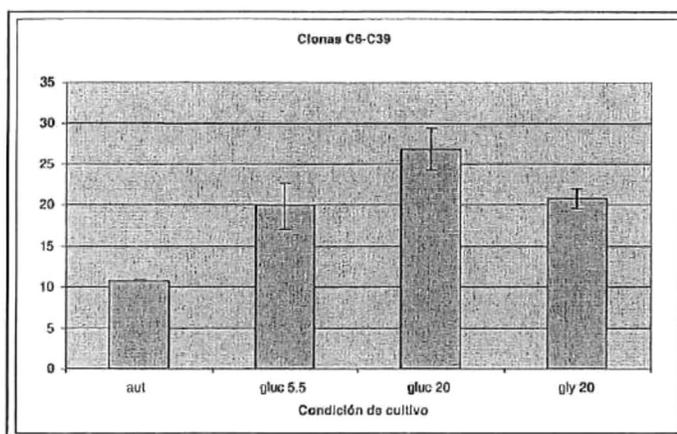


Figura 16. Niveles de mRNA para las clonas C6-C39. mRNA de *Chlorella protothecoides* para ubiquinona putativa citocromo c reductasa (gen dee10)

Genes involucrados en el procesamiento de mRNA o transposición

La Fig. 17 muestra del lado izquierdo, el gen que codifica para la proteína ring-box de *Chlamydomonas reinhardtii*, con un aumento en la inducción 1 a 2 veces en glicerol 20 mM y sin inducción en las condiciones de glucosa alta y baja. El gen del transposón TN3926 parcial tra7 de *Klebsiella pneumoniae* a la derecha, muestra una inducción continua a partir de glucosa baja con 1.5 aumentos, la glucosa alta con una doble inducción y el glicerol 20 mM con un aumento de 2.5 veces. En contraste, el gen que codifica para la

proteína pronosticada de *Chlamydomonas reinhardtii* (CHLREDRAFT_190192), no presentó inducción en las condiciones alta y baja de glucosa pero mostró un aumento de 2.5 veces en glicerol 20 mM (ver parte baja de la Fig. 17).

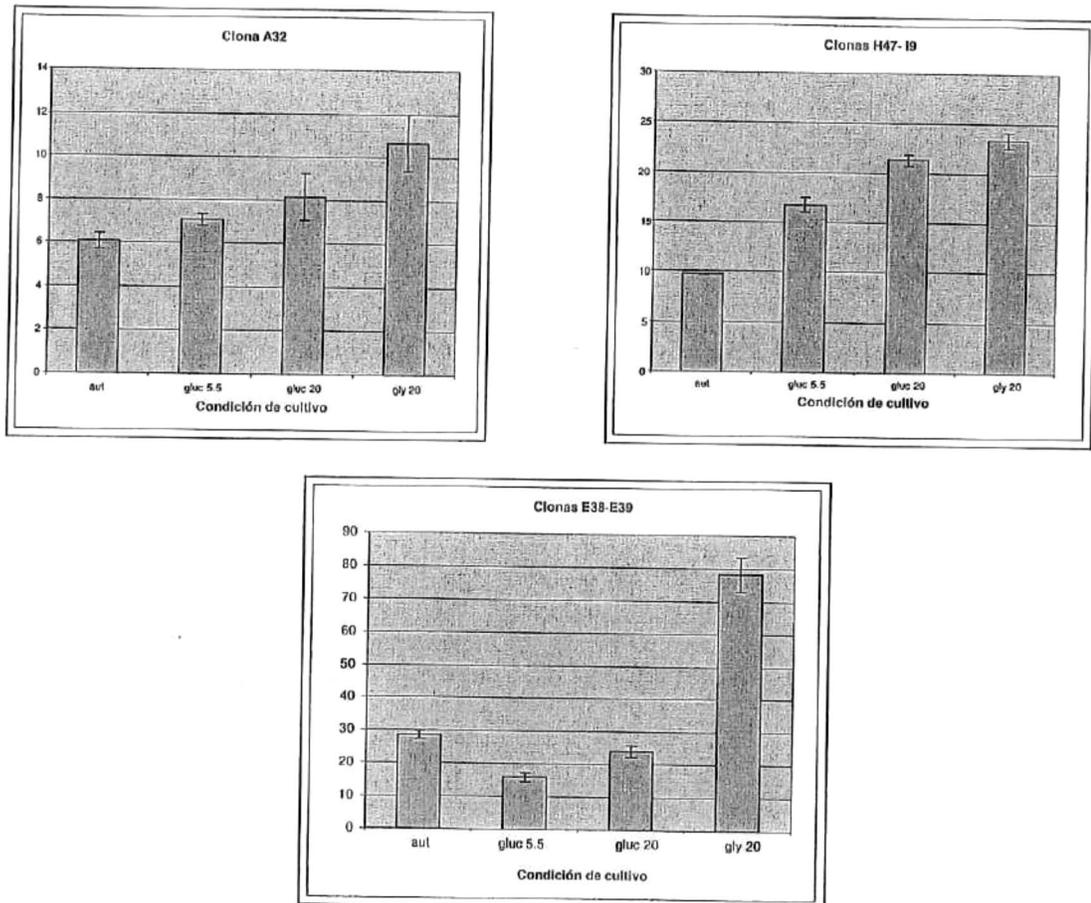


Figura 17. Niveles de mRNA para la clona A32: gen que codifica para proteína ring-box de *Chlamydomonas reinhardtii*, clonas H47-19: gen parcial tra7 para transposasa, *Klebsiella pneumoniae* transposón TN3926, región contigua pSL007, y clonas E38-E39: gen de *Chlamydomonas reinhardtii* que codifica para proteína pronosticada (CHLREDRAFT_190192)

Gen involucrado en formación de vesícula

El gen Os01g0265100 de *Oryza sativa* (grupo cultivable japónica), involucrado en el ensamblaje de proteínas de revestimiento durante la formación de vesículas. Presentó un doble aumento de inducción en la

condición de glucosa baja, un aumento de 1.5 veces en la condición de glucosa alta y un triple aumento en la condición glicerol 20 mM (Fig. 18).

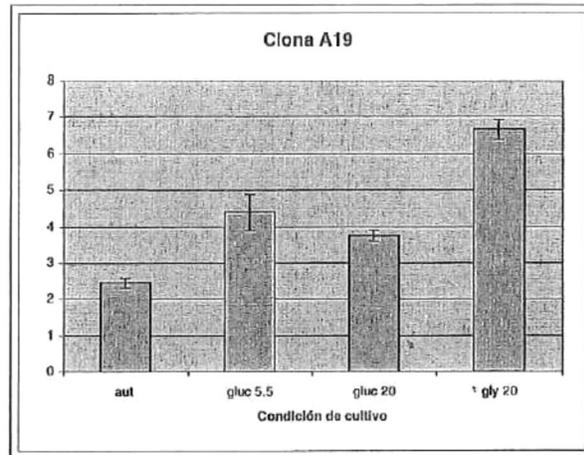


Figura 18. Niveles de mRNA para la clona A19: gen Os01g0265100 de *Oryza sativa* (grupo cultivable japonica)

DISCUSIÓN

Al estimular una acumulación lipídica en *C. protothecoides* mediante el crecimiento heterotrófico, se esperaba obtener una inducción específica de genes involucrados en dicha acumulación con respecto a la que se presentó bajo condiciones autótrofas con menor abundancia de lípidos. Los datos obtenidos mediante la técnica de clonación sustractiva delantera, no apoyaron dicha hipótesis. Una hipótesis alterna es que los genes clave pueden tener regulación negativa cuando *C. protothecoides* acumula lípidos bajo condiciones de heterotrofismo. Por ejemplo, los genes involucrados en la síntesis de carbohidratos pueden apagarse y promover un mayor flujo de carbono hacia la síntesis de lípidos (Sheehan *et al.*, 1998). Si este fuera el caso, entonces la técnica de clonación sustractiva reversa sería la apropiada. Otra posibilidad es que los genes involucrados en la acumulación lipídica de *C. protothecoides* no necesitan estar altamente regulados o sub-regulados bajo condiciones heterotróficas, puesto que la regulación ocurre preferentemente a nivel metabólico. La regulación de enzimas mediante cambios en las concentraciones de metabolitos, puede alterar el flujo de carbono y lograr un incremento en la acumulación de lípidos. Debido a que éste nivel regulatorio no involucra cambios en la expresión génica, sus condiciones no pueden ser detectadas mediante la técnica de clonación sustractiva.

Sin tomar en cuenta la identificación de los genes involucrados en acumulación de lípidos, los datos indican que el método sustractivo funcionó correctamente. Como evidencia se tiene la clonación exitosa de tres grupos de genes relacionados a cambios metabólicos y de tasa de crecimiento, ocurridos durante el heterotrofismo. Estos incluyen genes identificados previamente en *C. protothecoides* en respuesta a la decoloración, genes de proteínas ribosomales y genes transportadores de hexosa. Los genes dee 4, dee 10 y dee 188 relacionados con la palidez, fueron aislados en un trabajo previo de clonación sustractiva (Hörtensteiner *et al*, 2000) en *C. protothecoides*, durante la pérdida de la coloración verdosa y la degradación de clorofila; al crecer las células en oscuridad, en un medio de cultivo con 5% de glucosa y deficiente en nitrógeno. Estos tres genes fueron identificados en la presente investigación. Asimismo veinticinco genes de proteínas ribosómicas fueron identificados mediante sustracción delantera, los cuales podrían estar relacionados con la tasa de crecimiento acelerado (Fig. 4 y Snoep *et al.*, 2006) de las células en los cultivos heterotróficos. A partir de la genoteca sustractiva delantera fueron identificados también los genes múltiples que codifican para co-transportadores de hexosa, cuya inducción es consistente con el crecimiento heterotrófico en glucosa.

A pesar de que no pudo demostrarse la hipótesis que establece que los genes involucrados en la acumulación de lípidos lograrían ser inducidos y aislados a través del método sustractivo delantero, se puede establecer que el

análisis de los genes que se lograron aislar permite explorar algunos de los cambios metabólicos que ocurren en las células sometidas a las diferentes condiciones de crecimiento, tal como se describe a continuación.

Genes de metabolismo de glucosa

a) Co-transportador de hexosa

El azúcar presente en el cultivo ingresa a la microalga a través de la membrana celular, con ayuda de una familia de transportadores de azúcar denominada, sistema HUP de captación de hexosa (Sauer y Tanner, 1989; Will *et al.*, 1998). Se trata de un sistema de transporte activo de azúcar (acoplado a un gradiente- H^+) inducible (Tanner, 2000). El análisis de secuencias de las clonas aisladas mediante sustracción delantera, indica que por los menos existen 3 copias de este tipo de genes. Estas pueden codificar para proteínas con diferente afinidad o capacidad para transporte o regulación diferente (Stadler *et al.*, 1995; Will *et al.*, 1998). No fué posible distinguir entre copias individuales mediante qPCR, debido a su alta similitud. Por lo tanto, no se logró determinar si todas las copias respondían de la misma manera.

En general, los co-transportadores de hexosa son inducidos en presencia de glucosa (Fig. 13). La inducción es mayor con 20 mM de glucosa que con 5.5 mM, lo cual sugiere que la célula está transportando más glucosa a mayor concentración de la misma. Es posible que las diferentes copias del transportador sean inducidas en cada condición por separado, por ejemplo el

transportador con mayor afinidad puede estar inducido por una baja concentración de glucosa.

Los co-transportadores presentan la mayor inducción en presencia de glicerol 20 mM. Esto podría deberse a una respuesta por inanición. Si la célula prefiere glucosa como fuente de carbono, en su ausencia induce al transportador a alternar con la fuente de azúcar disponible (Xie *et al.*, 2004). Otra explicación es que uno de los transportadores de azúcar o una de las tres copias diferentes tiene mayor afinidad por el glicerol (Will *et al.*, 1997) mostrando una mayor inducción en presencia de glicerol.

b) Glucólisis y gen de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

Las moléculas de glucosa o las de glicerol entran a la célula, son procesadas por la vía glucolítica en el citoplasma y en el cloroplasto, son escindidas y producen piruvato y energía. Durante la presente investigación, se identificó un gen que participa en dicha vía, el gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, que cataliza la conversión del gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato con producción de $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Fig. 19).

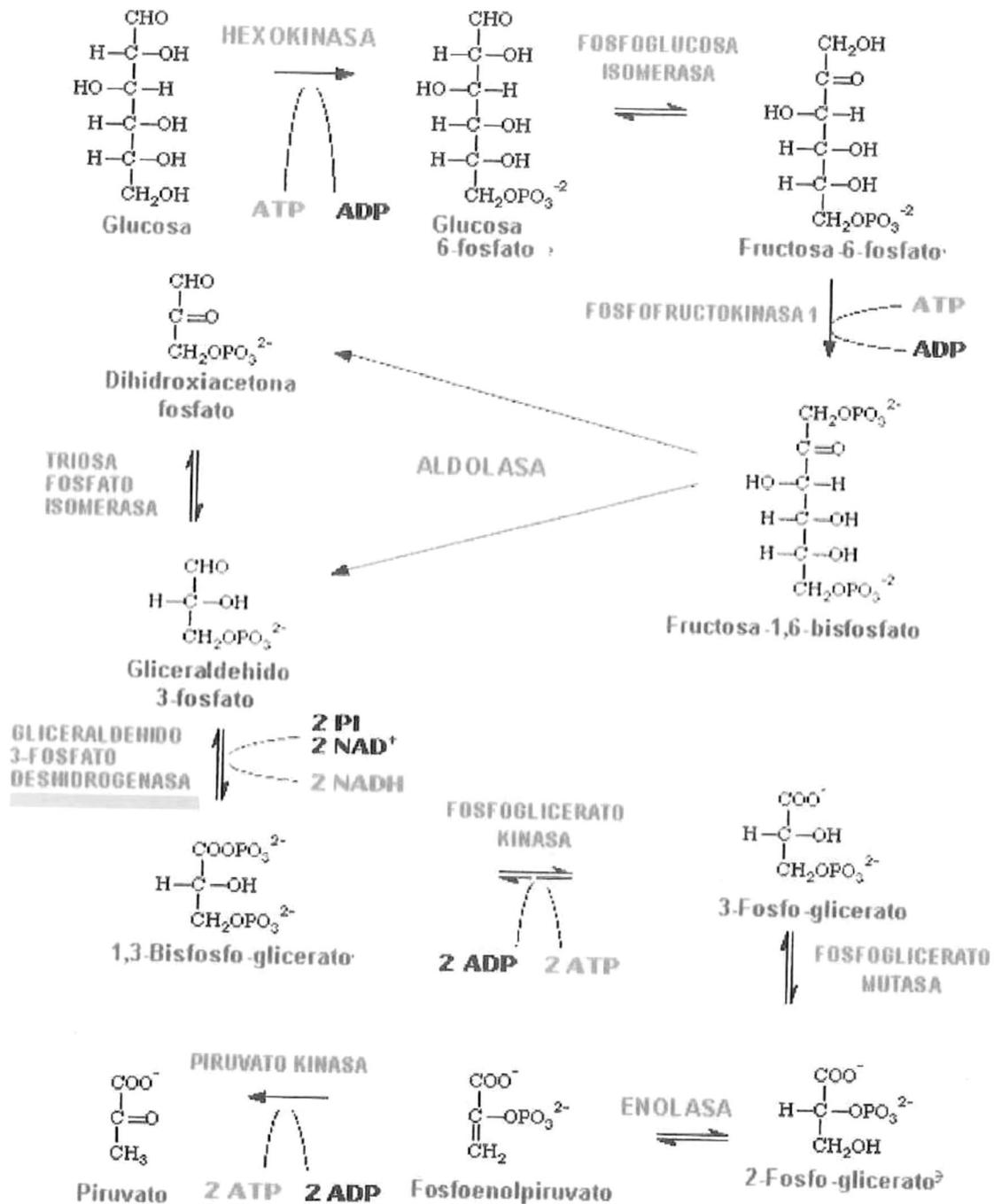


Figura 19. Vía glucolítica. Es una secuencia de diez reacciones que involucra a diez compuestos intermedios. El gen gliceralehido-3-fosfato-deshidrogenasa (subrayado en amarillo) fué identificado mediante la técnica de clonación sustractiva (Fig. de <http://biotech.icmb.utexas.edu/glycolysis/pathway.html>)

Este gen presentó la mayor inducción en la condición de cultivo con glicerol 20 mM (Fig. 13). Existen varias posibles explicaciones o consecuencias de ello. El glicerol se encuentra a dos etapas de reacción previas a ésta enzima mientras que la glucosa se encuentra cuatro reacciones antes de la misma. La glucosa puede ser convertida a una forma de almacenaje (almidón) y el glicerol no (Aubert S. *et al.*, 1994). Ambos factores pueden reducir el flujo de carbono de glucosa a través de ésta etapa de reacción, y podría explicar porqué el gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa muestra tan alta inducción en glicerol. El glicerol potencialmente puede ser utilizado directamente en la síntesis de triglicéridos (Aubert S. *et al.*, 1994), pero la inducción de el gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa indica que el carbono del glicerol entra preferentemente a la ruta glucolítica. Esto puede ser para generar energía en forma de ATP para la célula. Tomando como base al mol, se tiene que el glicerol posee la mitad de energía de la glucosa; entonces mayor procesamiento de glicerol que de glucosa es necesario para generar energía en la célula. La enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa cataliza la única etapa de la glucólisis que rinde NADH. Esta molécula va directamente al sistema de transporte de electrones y produce 3 ATPs. De forma global, los datos son consistentes en la utilización del glicerol por la célula como un fuente de energía a través de la glucólisis, con preferencia a usar el glicerol como un intermediario directo en la síntesis de lípidos.

Ha sido comprobado [Hörtensteiner *et al.* en 2000, Katayama y Benson en 1966, Xu *et al.* en 2006] que *C. protothecoides* crecida bajo condiciones heterotróficas con glucosa, es sometida a una degradación de clorofila y por lo tanto a la pérdida de su capacidad fotosintética. Pero en presencia de glicerol en el medio, una baja actividad fotosintética persiste, tal como lo sugiere el tono verde remanente observado en el cultivo con glicerol 20 mM (ver Fig. 5). Durante dicha condición de crecimiento, las células podrían elaborar una baja cantidad de glucosa mediante la fotosíntesis para satisfacer el requerimiento de carbono del ciclo de las pentosas, pero insuficiente para la vía glucolítica; lo cual se compensaría con la inducción de gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.

Una molécula de glucosa posee una estructura de seis carbonos y una de glicerol, solo tres carbonos. Los cultivos con glucosa y con glicerol presentan una marcada diferencia en su producción lipídica. Una concentración de glucosa de 5.5 mM indujo un aumento lipídico de 25 veces, la glucosa 20 mM un incremento de 23 veces y en contraste el glicerol 20 mM solo induce un incremento de 4 veces respecto a la condición autótrofa (Fig. 7). Existen dos factores que pueden contribuir a ello: 1) la tasa de crecimiento en presencia de glicerol es mayor que en glucosa, por lo que más energía se dirige al crecimiento que a la producción de lípidos y 2) debido a que el glicerol tiene la mitad de número de carbonos que la glucosa, posee un menor rendimiento energético, lo cual puede reducir la producción de lípidos.

Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) y el gen succinato-deshidrogenasa

Como se muestra en la Fig. 20, como preparativo para el ciclo de Krebs, dos piruvatos por molécula de glucosa (formados durante la glicólisis) entran a la mitocondria. Un átomo de carbono es removido y unido al oxígeno para formar dióxido de carbono. Como resultado de este paso, se forma una molécula de acetilo. Dicha molécula de dos carbonos, se oxida y se une a la coenzima A para formar acetil-CoA y entrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs. Produciendo 2 ATP, 6 NADH, y 2 FADH₂ por molécula de glucosa, puesto que el ciclo ocurre dos veces por cada molécula de glucosa metabolizada (Mathews, 1986).

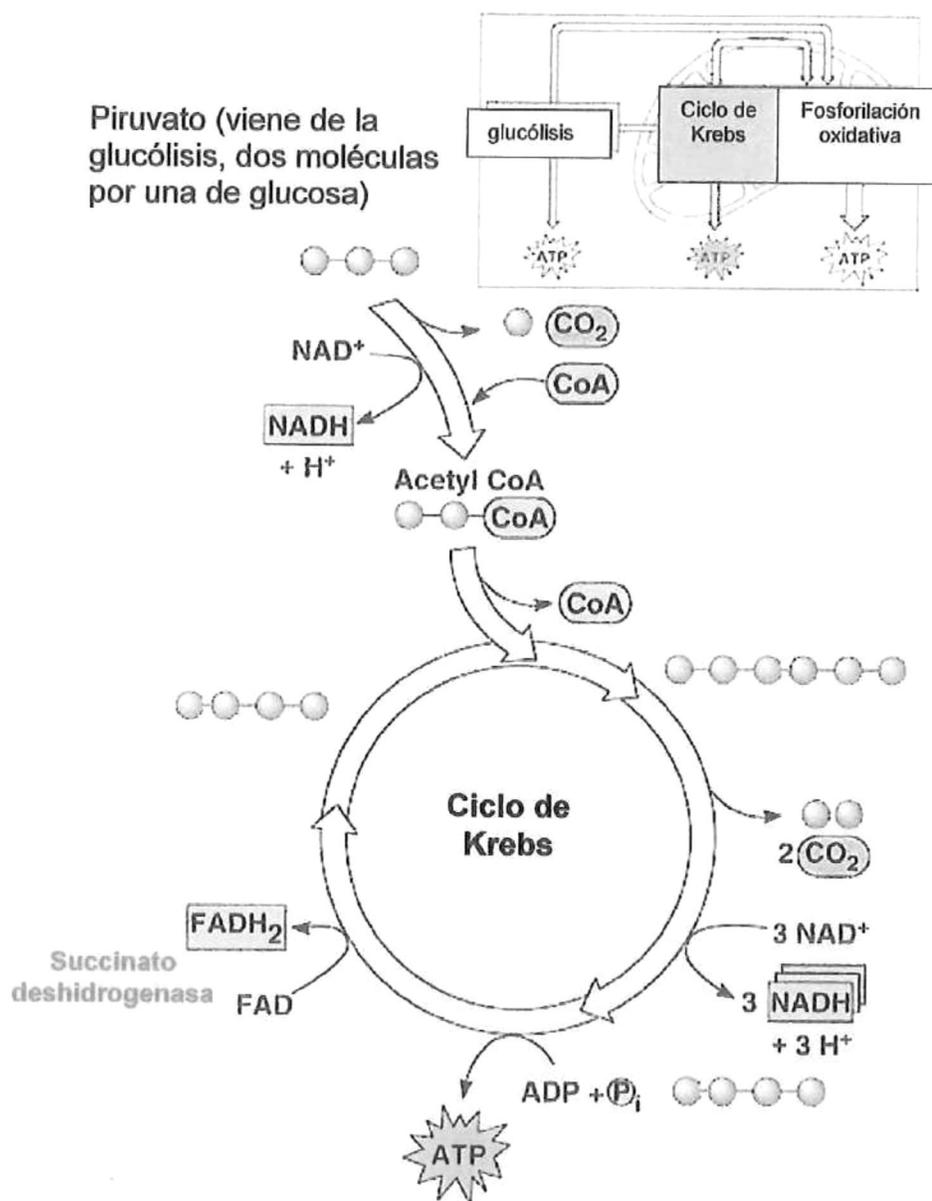


Figura 20. Ciclo de Krebs. La enzima Succinato deshidrogenasa produce FADH₂, dona sus electrones y se incorpora a la fosforilación oxidativa (Copyright © 2008. Pearsons Education, Inc., publishing as Pearsons Benjamin Cummings)

Succinato deshidrogenasa (gen sustraído D3) cataliza la transformación de succinato a fumarato, es la única enzima de ésta vía que produce FADH₂,

dona sus electrones (sistema transportador de electrones) incorporándose a la fosforilación oxidativa para sintetizar 2 ATP. FADH_2 libera una par de electrones al sistema transportador de electrones (Fig. 21). Cada par de electrones es transferido de un nivel con alta energía a uno de baja energía. Durante el proceso, se libera energía que puede ser utilizada para sintetizar 2 ATP por cada FADH_2 . Succinato deshidrogenasa participa tanto en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como en el sistema mitocondrial transportador de electrones y la fosforilación oxidativa (Mathews, 1986), dirigidos hacia la producción de energía (Fig. 22).

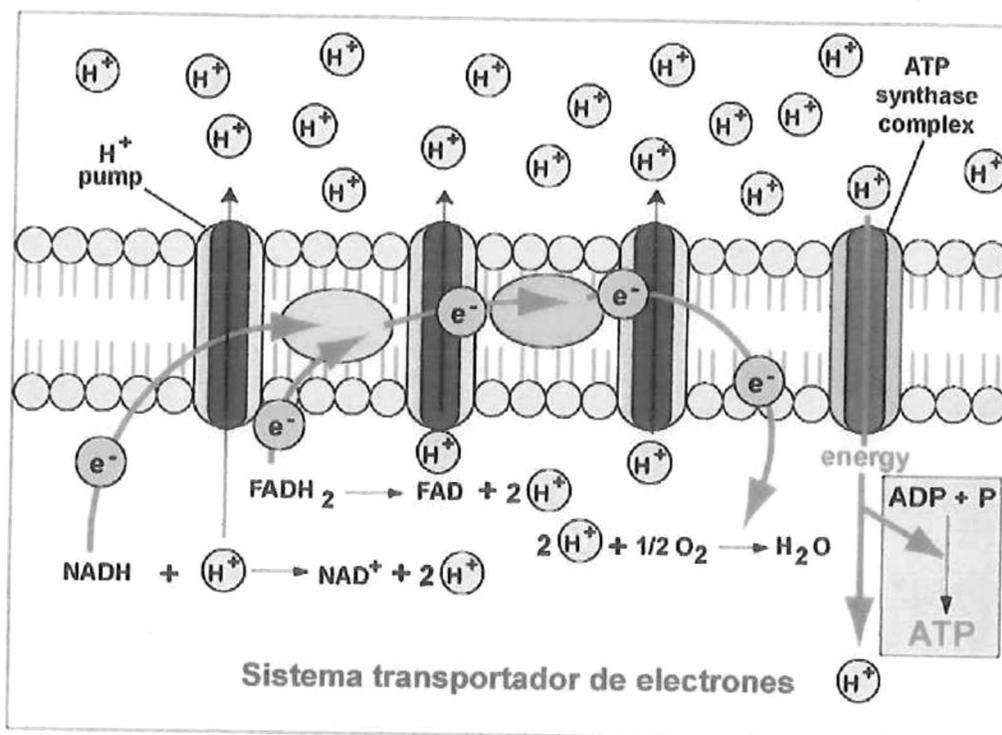


Figura 21. Sistema transportador de electrones. NAD^+ y FAD son moléculas transportadoras de electrones. El sistema crea un gradiente que se utiliza para producir ATP. Mientras H^+ se van hacia un menor gradiente, ATP se genera a través del complejo ATP-sintasa. (Figura de http://www-1.unipv.it/webbio/anatcomp/freitas/2008-2009/chemios_il.jpg)

Así como el gen gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de glucólisis, el gen succinato deshidrogenasa también presentó una mayor inducción en presencia de glicerol (Fig. 13), lo cual es consistente con la necesidad de la célula de producir mayor cantidad de energía requerida para soportar un crecimiento acelerado.

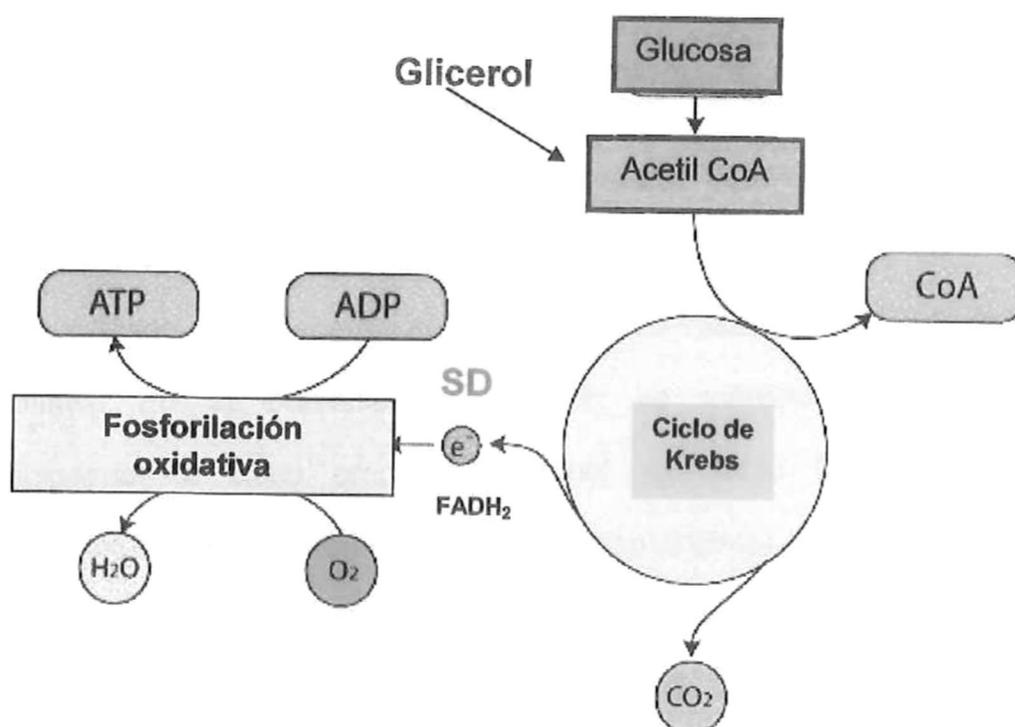


Figura 22. Succinato deshidrogenasa (SD) participa tanto en el ciclo de Krebs como en el sistema de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. FADH₂ se encuentra unido covalentemente a SD (De: http://users.fmrib.ox.ac.uk/~Estuart/thesis/chapter_3/section3_3.html).

suministro equitativo de energía por la mitocondria a través de la fosforilación oxidativa.

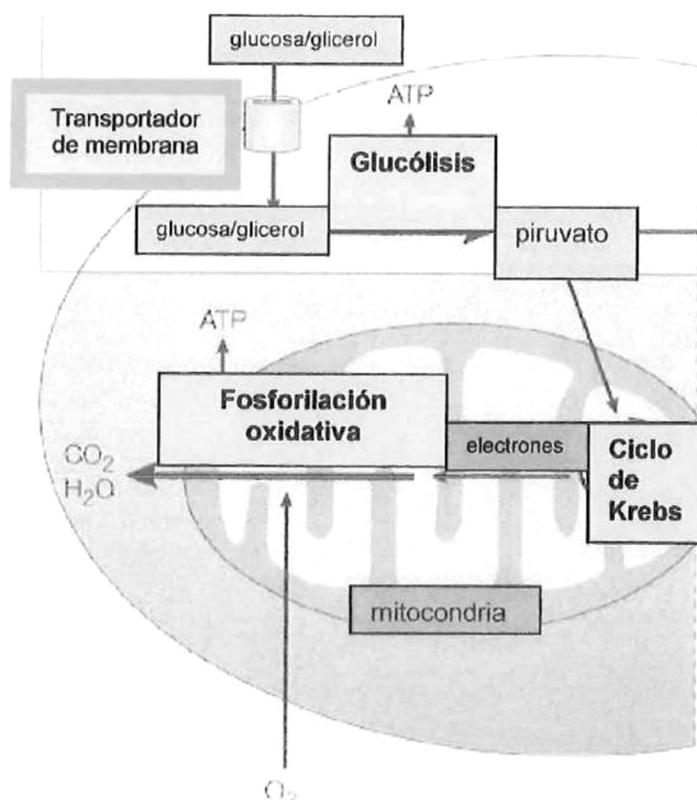


Figura 23. Esquema general de transporte de azúcar, glicólisis y fosforilación oxidativa en *C. protothecoïdes* (Adaptado de Sitkovsky and Lukashev, 2005)

Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa es la única enzima que produce 2 NADH en la ruta glucolítica y succinato deshidrogenasa es la única enzima que produce FADH₂ en el ciclo de Krebs, sus genes correspondientes son inducidos mayormente en glicerol 20 mM, favoreciendo un requerimiento

energético celular mayor, principalmente para su crecimiento. En el caso del sistema transportador de electrones y fosforilación oxidativa (los cuales producen la mayor cantidad de energía en forma de ATP: 32 ATP's a partir del rompimiento de 1 molécula de glucosa), se identificaron 5 genes altamente regulados bajo la condición glucosa 5.5 mM (Tabla 6) y un gen con niveles similares de inducción en las tres condiciones heterotróficas (Fig. 16). Puede ser que la vasta energía suministrada por la mitocondria a partir de la fosforilación oxidativa fluye de manera análoga en las células que crecen en los tres tipos de cultivos heterotróficos; sin tener relación con tasa de crecimiento o producción de lípidos.

Genes lipídicos

Gen de policétido sintetasa tipo I de *Chlamydomonas reinhardtii*

Los policétidos son metabolitos secundarios derivados de la polimerización de subunidades de acetilo y propionilo en un proceso similar al de la síntesis de ácidos grasos. La policétido sintetasa (PKS) es un complejo enzimático con múltiples dominios que se asemeja tanto en estructura como en funcionamiento, al complejo de la ácido graso sintetasa (FAS) involucrada en el metabolismo lipídico. FAS y PKS catalizan la condensación secuencial de unidades acilo en cadenas crecientes en carbonos. Ambas enzimas poseen un grupo similar de dominios funcionales: cetoacil sintetasa (KS), acil transferasa (AT), cetoacil reductasa (KR), deshidratasa (DH), enoil reductasa (ER),

proteína acarreadora de acilos (ACP) y tioesterasa (TE). Los genes PKS tipo I están presentes en genomas de otras clorofíceas como *Ostreococcus lucimarinus* y *Ostreococcus tauri* (John *et al.*, 2008). Un gen policétido sintetasa tipo I fué identificado en el presente trabajo, se desconoce su producto. Su mayor inducción fué en glicerol (Fig. 12).

Gen propiomelanocortina (POMC)

POMC es un precursor polipeptídico que requiere modificación post-traducciona para liberar pequeños fragmentos biológicamente activos, llamados melanocortinas. En humanos y en ratones, el gen POMC participa en el balance energético y en metabolismo lipídico. Por ejemplo; datos genéticos de humanos indican que el impedimento de la síntesis o del procesamiento de POMC, resulta en obesidad (Coll *et al.*, 2009). En la presente investigación, la mayor inducción para este gen, fué en el cultivo con glicerol que rindió menos lípidos, sugiriendo que la actividad de POMC favorece el metabolismo lipídico y evita la acumulación de los mismos. En cuanto a los cultivos con glucosa abundantes en lípidos, POMC pudiera estar impedida y por ello favorece la acumulación de lípidos.

Gen para acil-ACP desaturasa plastídica (FAB2) de *Chlamydomonas reinhardtii*

Acil-ACP desaturasa es una enzima cloroplástica soluble que introduce el primer doble enlace en ácidos grasos saturados, produciendo ácidos grasos mono-insaturados. Miembros de esta clase de desaturasas solubles poseen especificidad para sustratos de cierta longitud de cadena e introducen un doble enlace entre átomos de carbono definidos. Por ejemplo, delta 9-estearoil-ACP es específica para ácido esteárico e introduce un doble enlace entre el carbono 9 y 10 produciendo ácido oléico con unión ACP (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/158278943>). Los ácidos grasos sintetizados en el cloroplasto de *C. protothecoides* son desaturados por FAB2. Su gen correspondiente presenta la mayor inducción en glicerol (Fig. 12) y la mayor cantidad de mRNA (7000 ng/ μ L) entre todos los genes cuantificados para expresión mediante qRT-PCR. Este gen puede tener la mayor inducción en la condición heterotrófica con glicerol debido a un mayor grado de instauración o a que existen sustratos específicos en mayor proporción en glicerol que en glucosa.

Genes que codifican para proteínas cloroplásticas

***C. reinhardtii* translocón de membrana interna de cloroplasto (Tic 20)**

Las proteínas codificadas en el núcleo son importadas del citoplasma a través de la doble membrana cloroplástica. Para ello participan dos complejos protéicos, el complejo Toc localizado en la membrana externa y el complejo Tic localizado en la membrana interna. El complejo Toc reconoce

proteínas específicas mediante una secuencia desprendible N-terminal y es responsable primario de la translocación a través de la membrana externa. El complejo Tic transloca la proteína a través de la membrana interna. Tic 20 se encuentra profundamente embebida en la membrana interna y funciona como una proteína conductora que forma parte del complejo Tic (Benz *et al.*, 2009). Tic 20 influye y participa en la importación de proteínas hacia el cloroplasto en *C. protothecoides* bajo condiciones de heterotrofismo. Sin embargo, no existe una clara relación entre la expresión del gen Tic 20 y el incremento lipídico.

Gen de ferredoxina plastídica

La ferredoxina es una proteína acarreadora de electrones que participa en cadenas redox en plástidos no fotosintéticos. Puede ser reducida por NADPH, y actúa como un cofactor para varias enzimas plastídicas, tales como aquellas involucradas en la desaturación de ácidos grasos (de Koning *et al.*, 2004). Puesto que la oxidación de NADPH y la reducción de ferredoxina ocurren en cloroplastos no fotosintéticos, como aquellos presentes en las células cultivadas heterotróficamente con glucosa; subsecuentemente la ferredoxina puede proveer de energía reductora a la enzima plastídica acil-ACP desaturasa (previamente mencionada en la sección de genes lipídicos) la cual es una enzima ferredoxina-dependiente.

Gen para proteína pronosticada PHYPADRAFT_27510

El producto de este gen actúa como un regulador negativo de la expresión de genes fotosintéticos específicos en respuesta a oxígeno y luz. Se cree que promueve la acumulación de un represor putativo que inhibe la expresión de genes fotosintéticos específicos (Yeliseev, 1995). Solo hubo inducción en la condición heterotrófica con glucosa 5.5 mM (que rinde la mayor cantidad de lípidos), la cual mostró una clara pérdida de color verde (Fig. 5) y probablemente una gran acumulación del represor putativo de la fotosíntesis.

Genes homólogos a genes de otras algas

Cargador de aminoácidos (gen *dee 4*)

El producto del gen *dee 4* está involucrado en la remoción de aminoácidos acumulados durante la degradación de proteínas (Hörtensteiner *et al.*, 2000). Este gen mostró un incremento creciente en su inducción a partir del cultivo heterótrofo con glucosa baja, glucosa alta y glicerol (Fig. 11). El grado de degradación protéica puede verse acentuado a la par que el incremento de glucosa. El cultivo con la mayor cantidad disponible de aminoácidos potencialmente degradables sería el de glicerol.

Gen para proteína asociada a microtúbulos de *C. incerta*

Los resultados de qPCR para este gen no están relacionados con tasa de crecimiento o con acumulación lipídica.

Genes involucrados en el procesamiento de mRNA o transposición***C. reinhardtii* gen de proteína ring-box**

Este gen puede estar involucrado en proteólisis mediada por ubiquitina (Mladek *et al.*, 2003). Su inducción es mayor en la condición de glicerol, lo cual puede relacionarlo a degradación de proteínas y crecimiento acelerado.

Gen parcial tra 7 para transposasa

Este gen muestra inducción continua en las condiciones glucosa baja, glucosa alta y glicerol. Su relación con la biosíntesis lipídica es desconocida

Gen para proteína pronosticada de *C. reinhardtii*

Este gen es inducido solamente en la condición de glicerol. Dado que su producto es desconocido no se puede relacionar con la biosíntesis lipídica en *C. protothecoides*.

Gen involucrado en formación de vescícula**Gen de proteína hipotética Os01g0265100**

La inducción máxima en glicerol puede ser debido a más vesículas formadas por el aparato de Golgi, las cuales pueden realizar varias funciones en *C. protothecoides*. Debido a que se trata de una respuesta general, la expresión génica no puede asociarse con la biosíntesis lipídica.

Consideraciones finales

En general hubo una respuesta global en *Chlorella protothecoides* al ser sometida a tres condiciones de crecimiento heterotrófico. Aunada a la acumulación lipídica, se desarrollaron cambios en tasa de crecimiento, en la coloración, la glucólisis, el ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa, la proteólisis y sobre todo en el flujo de energía. Podemos afirmar que la fuente de azúcar provista a los cultivos heterótrofos ingresa a las células de *C. protothecoides* con ayuda de transportadores (hexosa), se desdobra mediante glucólisis, pasa por el ciclo de Krebs, genera electrones que van a la cadena transportadora y a producción de ATP mediante fosforilación oxidativa, a la par que hay una actividad ribosomal aumentada, incremento en proteólisis y remoción de aminoácidos degradados. Lo anterior conlleva a un aumento en tasa de crecimiento (sobre todo en cultivo con glicerol) y de acumulación de lípidos (mayormente en cultivos con glucosa), pérdida de actividad fotosintética (marcadamente en glucosa) y una incrementada generación de energía.

El cultivo con la mayor inducción para la mayoría de los genes fué el complementado con glicerol, excepto para 3 genes: a) gen de *C. incerta* que codifica para una proteína asociada a microtúbulos, mayormente expresado en glucosa 20 mM, b) El gen de *Physcomitrella patens* que codifica para proteína que inhibe la fotosíntesis, que solo presenta inducción bajo la condición de 5.5

mM de glucosa y c) el gen de *C. protothecoides* que codifica para ubiquinona putativa citocromo c reductasa (gen *dee10*), que presentó una inducción similar bajo las 3 condiciones heterotróficas. Por lo tanto, se puede asumir hay selectividad en la expresión génica durante la condición con glicerol. El mayor cambio de tonalidad (palidecimiento) ocurrió en los cultivos con glucosa. El crecimiento más acelerado fué en el cultivo con glicerol. La mayor acumulación lipídica fué en el cultivo con glucosa 5.5 mM. Se considera que el cultivo amarillo-verdoso con glicerol y poca acumulación lipídica, presentó una tasa fotosintética remanente y produjo gran cantidad de energía a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs principalmente dirigida al crecimiento. Los cultivos de tonalidad amarilla con glucosa y fotosíntesis abatida, requerían menos energía de la vía glicolítica y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos puesto que desarrollaron una menor tasa de crecimiento pero una mayor acumulación de lípidos.

En cuanto a la fosforilación oxidativa y transporte de electrones, al no encontrarse diferencias significativas en la generación de energía a partir de ésta ruta, se puede suponer que ocurre en forma similar en las células crecidas heterotróficamente.

En lo que respecta a biosíntesis lipídica, se obtuvo un gen de desaturasa, el cual presentó una inducción bastante marcada a partir de

glucosa baja, alta y glicerol. Este fué el único gen que muestra relación directa con síntesis de lípidos, específicamente con la insaturación de ácidos grasos y que pudiera indicar que tanto la concentración como la fuente de azúcar suplementada a *C. protothecoides* en un cultivo heterótrofo afecta el grado de insaturación de los ácidos grasos.

Es importante considerar que el glicerol es un subproducto de la producción de biodiesel y que a pesar de que rindió la menor acumulación de lípidos, provoca un acelerado crecimiento de las células y permite a las mismas mantener cierta fotosíntesis remanente. Se sugiere experimentar con varias concentraciones de glicerol y simultáneamente probar con subproductos alternos de diferentes procesos industriales como coadyuvantes en la acumulación lipídica de *Chlorella protothecoides*.

CONCLUSIONES

- Se corroboró el alto contenido lipídico en los cultivos heterótrofos mediante la tinción rojo nilo para lípidos neutros, presentando el mayor contenido (25 veces más lípidos que en autotrofismo) el cultivo heterótrofo suplementado con glucosa 5.5 mM.
- La mayoría de los genes mostraron su más alto nivel de expresión (desde 2 hasta 16 veces aumentado) en el cultivo heterótrofo suplementado con glicerol 20 mM, sin embargo éste no fué el cultivo con la mayor acumulación de lípidos
- En general se presenta preferencia en el incremento de flujo de energía en el metabolismo de *C. protothecoides* marcadamente en la condición de glicerol, que presentó el crecimiento más acelerado (2.6 veces mayor crecimiento que en autotrofismo) y la menor acumulación lipídica en heterotrofismo. Por lo tanto la búsqueda de genes potenciales para la sobreproducción de lípidos no deben estar dirigidos a este tipo de cultivo sino a los de glucosa
- Genes clave pueden estar regulados negativamente mientras *C. protothecoides* acumula lípidos bajo condiciones de heterotrofismo. Por lo que una combinación de clonación sustractiva delantera y reversa ofrecerían un

panorama más adecuado de los mecanismos moleculares involucrados en la acumulación de lípidos.

- Se identificaron genes involucrados en varias rutas metabólicas y funciones celulares. Existe la posibilidad de que una regulación metabólica y cambios en el flujo de energía ocurran preferentemente durante la acumulación de lípidos y el acelerado crecimiento de *C. protothecoides*. Un perfil metabólico sería de gran interés científico y ayudaría a la explotación de ésta cepa a nivel industrial para producción de biodiesel

LITERATURA CITADA

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

- Armbrust, E.V. 1999. Identification of a New Gene Family Expressed during the Onset of Sexual Reproduction in the Centric Diatom *Thalassiosira weissfloggi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (7): 3121-3128

- Aubert, S., E. Gout, R. Bligny, R. Douce. 1994. Multiple Effects of Glycerol on Plant Cell Metabolism. *J. Biol. Chem.* 269 (34): 21420-21427.

- Banerjee, A., R. Sharma, Y. Chisti, U.C. Banerjee. 2002. Botryococcus braunii: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 22(3): 245-279.

- Basova, M.M. 2005. Fatty acid composition of lipids in microalgae. *Int. J. Algae.* 7:33-57.

- Beste, D. J., J. Peters, T. Hooper, C. Avignone-Rossa, M. E. Bushell and J. McFadden 2005. Compiling a Molecular Inventory for *Mycobacterium bovis*

- BCG at Two Growth Rates: Evidence for Growth Rate-Mediated Regulation of Ribosome Biosynthesis and Lipid Metabolism. *J. Bacteriol.* 187(5):1677-1684.
- Casadevall, E., D. Dif, C. Largeau, C. Gudin, D. Chaumont and O. Desant. 1985. Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition. *Biotech. and Bioeng.* 27(3):286–295
- Coll, A.P. and Y.C. Tung. 2009. Pro-opiomelanocortin (POMC) derived peptides and the regulation of energy homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300: 147–151
- Cooksey, K.E., J.B.Guckert, S.A.Williams, P.R.Callis. 1987. Fluorometric determination of the neutral lipid content of microalgal cells using Nile Red. *J. Microbiol. Met.* 6:333 - 345
- Chung, C.-C., S.-P.L. Hwang, J. Chang. 2005. Cooccurrence of ScDSP Gene Expression, Cell Death, and DNA Fragmentation in a Marine Diatom, *Skeletonema costatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(12):8744-8751
- Davis, K.A., M. Hildebrand, B. Palenik. 2006. Gene Expression Induced by Copper Stress in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Eukaryotic Cell.*

5(7):1157-1168

- de Vries, S.C., J. Springer, J.G.H. Wessels. 1982. Diversity of abundant mRNA sequences and patterns of protein synthesis in etiolated and greened pea seedlings. *Planta*. 156:129-135

- de Koning, A.P., P.J. Keeling 2004. Nucleus-Encoded Genes for Plastid-Targeted Proteins in *Helicosporidium*: Functional Diversity of a Cryptic Plastid in a Parasitic Alga. *Eukaryotic Cell*. 3(5):1198-1205

- Eelsey, D., D. Jameson, B. Raleigh, M.J.Cooney. 2007. Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *J. Microbiol. Met.* 68. 639–642

- Uwe, J., B. Beszteri, E. Derelle, Y.V. de Peer, B. Read, H. Moreau and A. Cembella. 2008. Novel Insights into Evolution of Protistan Polyketide Synthases through Phylogenomic Analysis. *Protist*. 159: 21-30.

- Happe, T., A. Kaminski. 2002. Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem*. 269: 1022-1032

- Hildebrand, M., K. Dahlin. 2000. Nitrate transporter genes from the diatom *Cylindrotheca fusiformis* (Bacillariophyceae): mRNA levels controlled by nitrogen source and by the cell cycle. ***J. Phycol.*** 36:702-713
- Endo, H., H. Hosoya and T. Koibuchi. 1977. Growth Yields of *Chlorella regularis* in Dark-heterotrophic Continuous Cultures Using Acetate: Studies on *Chlorella regularis*, Heterotrophic Fast-Growing Strain (III). ***J. Ferment. Technol.*** 55: 369-379.
- Hu, Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, A. Darzins. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. ***The Plant Journal.*** 54: 621-639.
- Hörtensteiner S., J. Chinner., P. Matile, H. Thomas and I.S. Donnison. 2000. Chlorophyll breakdown in *Chlorella protothecoides*: characterization of degreening and cloning of degreening-related genes. ***Plant Mol. Biol.*** 42: 439-450
- Kessler E., Volker A.R. 1992. Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the University of Texas at Austin. ***J. Phycol.*** 28: 553-558

- Katayama M., A. Benson. 1967. Linolenate and Photosynthetic Activity in *Chlorella protothecoides*. ***Plant Physiol.*** 42. 308-313

- Lee, R.E. 2008. ***Phycology***. 4a. Edición. Cambridge: Cambridge University Press.139-243

- Lee, S.J., B.D. June, H.M. Oh. 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. ***Biotechnology Techniques***. 12(07): 553-556

- Li, Y., J.G. Qin. 2005. Comparison of growth and lipid content in three *Botryococcus braunii* strains. ***J. Appl. Phycol.*** 17: 551-556

- Mathews, C., V. Holde. ***Biochemistry***. 2a. Edición. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., New York. 278-697

- McGinnis, K.M., T.A. Dempster and M.R. Sommerfeld. 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. ***J. Appl. Phycol.*** 9:19–24

- Merzlyak, M.N., O.B. Chivkunova, O.A. Gorelova, I.V. Reshetnikova, A.E. Solovchenko, I. Khozin-Goldberg and Z. Cohen. 2007. Effect of nitrogen

starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta).

J. Phycol. 43:833–843.

- Metzger, P. and C. Largeau. 2005. *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 486-496

- Miao, X.L., Q.Y. Wu, 2004a. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J. Biotechnol.* 110:85–93.

- Mladek, C., K. Guger, M.-T. Hauser. 2003. Identification and Characterization of the *ARIADNE* Gene Family in *Arabidopsis*. A Group of Putative E3 Ligases. *Plant Physiol.* 131: 27–40

- Ohlrogge J. and J. Browse 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell.* 7:957-970.

- Reyes, F., L. Marchant, L. Norambuena, R. Nilo, H. Silva, and A. Orellana. 2006. AtUTr1, a UDP-glucose/UDP-galactose Transporter from *Arabidopsis thaliana*, Is Located in the Endoplasmic Reticulum and Up-regulated by the Unfolded Protein Response. *J.B. Chem.* 281(14): 9145–9151.

- Roessler, P.G., L.M. Brown, T.G. Dunahay, D.A. Heacox, E.E. Jarvis, J.C. Schneider, S.G. Talbot, K.G. Zeiler. 1994. Genetic engineering approaches for enhanced production of biodiesel fuel from microalgae. **A.C.S. Symp. Ser.** 566: 255-270

- Roessler, P.G. 1988. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. **Arch. Biochem. Biophys.** 267: 521–528.

- Sagerström, C.G., B.I. Sun, H.L. Sive. 1997. Subtractive cloning: past, present and future. **Annu. Rev. Biochem.** 66:751-83.

- Sauer, N., W. Tanner. 1989. The hexose carrier from *Chlorella*. cDNA cloning of a eukaryotic H⁺- cotransporter. **FEBS Letters.** 259: 43-46

- Sheehan, J., T. Dunahay, J. Brenemann, P. Roessler. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development, July 1998. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-Biodiesel from Algae. **Close Out Report. National Renewable Energy Laboratory/TP 580-24190.** Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

- Sitkovsky, M. and D. Lukashev. 2005. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 α and adenosine receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 5:712-721

- Snoep, J.L., H.V Westerhoff, J.M. Rohwer. 2006. Is there an optimal ribosome concentration for maximal protein production? *IEE Proc.-Syst. Biol.* 153(5):398-400

- Stadler, R., K. Wolf, C. Hilgarth, W. Tanner, N. Sauer. 1995. Subcellular Localization of the Inducible *Chlorella* HUPI Monosaccharide-H⁺ Symporter and Cloning of a Co-Induced Galactose-H⁺ Symporter. *Plant Physiol.* 107: 33-41

- Tanner, W. 2000. The *Chlorella* hexose/H⁺-symporters. *Int. Rev. Cytol.* 200:101-41

- Tonon, T., D. Harvey, T.R. Larson, Y. Li and A.I. Graham. 2005. Acyl-CoA elongase activity and gene from the marine microalga *Pavlova lutheri* (Haptophyceae). *J. Appl. Phycol.* 17: 111–118.

- Volker, A.R., C. Ciniglia, P. Cennamo, S. Cozzolino, G. Pinto, A. Pollio. 2002. Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella*-like isolates from low pH environments (pH < 3.0). *BMC Evol. Biol.* 2:13

- Andreas, W., R. Grassl, J. Erdmenger, T. Caspari, W. Tanner. 1998. Alteration of Substrate Affinities and Specificities of the *Chlorella* Hexose/H1 Symporters by Mutations and Construction of Chimeras. **J. Biol. Chem.** 273 (19) 11456–11462

- Wu Q. Y., S. Yin, G. Y. Sheng and J. M. Fu. 1994. **Sci. in China Series B-Chem.** 37: 326.

- Xie, X., H. Wilkinson, A. Correa, Z. Lewis, D. Bell-Pedersen, D. Ebbole. 2004. Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.** 41: 1104 -1119

- Xu, H., X. Miao, Q. Wu. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. **J. Biotechnol.** 126:499-507

- Yeliseev, A. and S. Kaplan. 1995. A Sensory Transducer Homologous to the Mammalian Peripheral-type Benzodiazepine Receptor Regulates Photosynthetic Membrane Complex Formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. **J. Biol. Chem.** 270 (36). 21167–21175.

- Zhang X-N., Z-C. Qu, Y-Z. Wan, H-W. Zhang, D-L Shen. 2002. Application of Suppression Subtractive Hybridization (SSH) to Cloning Differentially Expressed cDNA in *Dunaliella salina* (Chlorophyta) Under Hyperosmotic Shock. ***Plant. Mol. Biol. Rep.*** 20:49-57

APÉNDICE

1. Medio Proteosa (para un volumen total de 1 L con un pH ~6.8)

a) Preparar medio Bristol. Agregar cada uno de los componentes en el orden especificado en 900 mL de agua desionizada, agitando continuamente

#	Componente	Cantidad	Concentración de sin. stock	Concentración final
1	NaNO ₃ (Fisher BP360-500)	10 mL/L	10 g/400mL dH ₂ O	2.94 mM
2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mL/L	1 g/400mL dH ₂ O	0.17 mM
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10 mL/L	3 g/400mL dH ₂ O	0.3 mM
4	K ₂ HPO ₄	10 mL/L	3 g/400mL dH ₂ O	0.43 mM
5	KH ₂ PO ₄	10 mL/L	7 g/400mL dH ₂ O	1.29 mM
6	NaCl	10 mL/L	1 g/400mL dH ₂ O	0.43 mM

b) Añadir 1 gramo de proteosa peptona (Difco) al medio Bristol

c) Agregar 6 mL/L de solución de metales

d) Aforar a 1L

*Para preparar medio sólido con 1.5% de agar añadir 15 g de agar en el matraz; no mezclar

e) Cubrir cuidadosamente y esterilizar en autoclave

f) Enfriar a temperatura ambiente y agregar 1 mL/L de solución de vitaminas

f) Si es requerido, almacenar en refrigerador

2. Solución de metales para Medio Proteosa (para un volumen total de 1 L)

a) Agregar cada nutriente en el orden listado a continuación a 950 mL de agua desionizada. *Nota: El Na₂EDTA debe disolverse completamente antes de añadir los otros componentes al medio*

#	Componente	Cantidad	Concentración final
1	Na ₂ EDTA·2H ₂ O (Sigma ED255)	0.75 g/L	2 mM
2	FeCl ₃ ·6H ₂ O (Sigma 1513)	0.097 g/L	0.36 mM
3	MnCl ₂ ·4H ₂ O (J. T. Baker 2540)	0.041 g/L	0.21 mM
	ZnCl ₂ (Sigma Z-0152)	0.005 g/L	0.037 mM
5	CoCl ₂ ·6H ₂ O (Sigma C-3169)	0.002 g/L	0.0084 mM
6	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (J.T. Baker 3764)	0.004 g/L	0.017 mM

b) Aforar a 1 L

c) Almacenar a 4° C si es requerido

3. Solución Stock de Vitaminas para Medio Proteosa

a) Disolver los componentes mencionados a continuación en 900 mL de agua desionizada.

#	Componente	Cantidad
1	Vitamina B ₁ (Tiamina-HCl)	200 mg
2	Viamina B ₁₂ (cianocobalamina)	4 mg
3	Biotina (vitamina H)	2 mg

b) Aforar a 1 L

c) Esterilizar por filtración

d) Almacenar a 4°C