CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis in silico* Y SU INSERSIÓN GENÉTICA EN EL CLOROPLASTO DE *Chlamydomonas reinhardtii*

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Agricultura Sustentable)

Presenta

Raziel Alejandro Sosa Salazar

La Paz, Baja California Sur, 31 de Agosto, 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 19 del Mes de Agosto del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS DE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis in silico* Y SU INSERSIÓN GENÉTICA EN EL CLOROPLASTO DE *Chlamydomonas reinhardtii*

Presentada por el alumno:

Raziel Alejandro Sosa Salazar

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Agricultura Sustentable.**

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

LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Gracia Alejandra Gómez Anduro
CO-TUTOR

Dra. Idalia Anahí Gómez Escobedo
CO-TUTOR

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA
DIRECTORIA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

Director de Tesis:
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Co-tutor:
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.

Co-tutor:
Dra. Idalia Analí Gámez Escobedo
Universidad Autónoma de Coahuila.

COMITÉ REVISOR DE TESIS
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dr. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Idalia Analí Gámez Escobedo

JURADO DE EXAMEN DE GRADO
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dra. Idalia Analí Gámez Escobedo

Suplente
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

RESUMEN

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) es un patógeno intracelular causante de la enfermedad de Jonhe o paratuberculosis en la mayoría de especies rumiantes domésticas y salvajes. Hasta el momento, no se tiene una vacuna que pueda proteger, prevenir o proporcionar protección completa contra esta infección. Sin embargo, se sabe que la respuesta celular inducida es la más adecuada contra MAP. En este escenario, las herramientas inmuno-informáticas nos permiten identificar proteínas como candidatos vacunales que se pueden expresar en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, que es inocua para los animales, aprovechando la inserción plastidial como estrategia de expresión. En este estudio se analizaron 100 proteínas de superficie de MAP usando herramientas inmuno-informáticas. En base a los resultados de predicción inmunogénica, se seleccionaron los genes que codifican para las proteínas *MAP0164*, *MAP0189* y *MAP2100*. Luego, los genes *MAP2100* y *MAP0189* se clonaron en el vector p320 para la modificación genética del cloroplasto de *C. reinhardtii*. En paralelo, se realizó la transformación genética de *E. coli* con las construcciones generadas, sabiendo que es posible producir proteínas recombinantes en este sistema de expresión. Se obtuvieron 23 colonias de *C. reinhardtii* que presentaron resistencia a selección por *Kanamicina* usando la construcción 2100-p320 y tres de ellas fueron analizadas y confirmadas como transformantes positivas por PCR. Por otro lado, se obtuvieron 3 colonias de *C. reinhardtii* que presentaron resistencia a *Espectinomicina* cuando se usaron las construcciones 0189-p320, pero ninguna de ellas se confirmó como positiva. Finalmente, la producción de las proteínas recombinantes MAP0189 y MAP2100 se pudo detectar mediante Western blots cuando se usó el sistema de *E. coli*, pero no así en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.

Esta tesis fue financiada con los proyectos SEP-CONACYT (No. 151818), CONACYT-INFR-2014-01 (No. 225924). Además, fueron financiados por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF) a través del proyecto PICSA 10-174 otorgado a los Dres. Jesús Agustín Badillo Corona y Luis Carlos Fernández Linares.

ABSTRACT

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis (MAP)* is an intracellular pathogen causative of Jonhe disease or paratuberculosis in most domestic or wild rumiant species. So far, there is no vaccine that can protect, prevent or provide complete protection against this infection, however it is known that the cellular response is the best suited to fight these pathogens. In this scenario, the immune tools allow us to identify proteins as vaccine candidates that can be expressed in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, which is harmless to animals, taking advantage of the plastid insertion and expression strategy. In this study 100 MAP surface proteins using immuno-computer tools were tested. Based on the results of immunogenic prediction, the genes that code for the proteins *MAP0164*, *MAP0189* and *MAP2100* were selected. The genes *MAP2100* and *MAP0189* were cloned into the vector p320 for genetic modification of *C. reinhardtii* chloroplast. In parallel, the genetic transformation of *E. coli* was performed with constructs generated, knowing that recombinant proteins can be produced in this expression system. 23 colonies were resistant to kanamycin by using the construction 2100-p320, three of them were analyzed by PCR resulting positive. Furthermore, 3 colonies of *C. reinhardtii* that were resistant to spectinomycin when 0189-p320 constructs were used, but none of them was confirmed as positive. Finally, the production of the recombinant proteins MAP0189 and MAP2100 could be detected by Western blot when expressed in *E. coli*, but not in the chloroplast of *C. reinhardtii.*

This thesis was funded with the proyects SEP-CONACYT (No. 151818), CONACYT-INFR-2014-01 (No. 225924). Moreover, it was financed by el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyT-DF) trough the proyect PICSA 10-174 awarded to Dr. Jesús Agustín Badillo Corona and Luis Carlos Fernández Linares

DEDICATORIA

A mis padres

A Josefina Salazar y a Jesús Sosa, por el amor que me dan, aunque estén lejos, siempre los llevo en mi corazón y creo me seguirán apoyando por cualquier camino que elija.

A mi familia

A mi familia en general que siempre están pendiente de mis nuevos proyectos y que siempre me alientan a seguir adelante pese a las adversidades.

A mis amigos

A mis amigos Carolina Garciglia, Karina Kao y Héctor Garza con quienes compartí muchas vivencias extraordinarias además de un cubículo lleno de enseñanzas, anécdotas, risas, llanto y un montón de buenas fiestas.

A mis amigos de la maestría Marcelo, Luis, Edisa, Paloma, Sergio, Peter, Eli, Pau, Kike, Betsy, Diana, Victor, Cristina, Pistina, Daniel, Tomás, Angélica, Cintya, Pipina, José Angel, Denisse, Bryan, Samuel, Susana por compartir sus conocimientos en diferentes áreas tanto de la ciencia como de la vida misma. Una gran generación de seres humanos.

A Mario Rojas que fue mi roomie durante un gran tiempo y un gran amigo que siempre estuvo al pendiente de mí, a mis amigos rollers que me apoyaron a mi llegada a la paz, a Mario Arce que me recibió en su casa sin siquiera conocerme y a las demás personas maravillosas que conocí en estos años en la Paz.

A las personas del laboratorio de Biotecnología Molecular I y II que me recibieron con los brazos abiertos y compartieron su conocimiento: A Karlita y a Daniel, a Marychuy por su ayuda en la redacción de la tesis. A Isabel, Ale, Caro, Hugo, Fermín, Taba, etc.

A Katherine por impulsarme a seguir adelante, motivándome y apoyándome en todo momento. Muchas gracias por estar a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada 484403 que permitió el desarrollo de esta investigación.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por permitirme realizar mis estudios de posgrado, en particular a su administración y a la gente encargada de posgrado.

Al CONACYT por el financiamiento de esta tesis a través de los proyectos SEP-CONACYT (No. 151818) y CONACYT-INFR-2014-01 (No. 225924).

Al Dr. Carlos Angulo por incluirme en sus proyectos de investigación y su entusiasmo en la investigación.

A la Dra. Gracia Gómez por las correcciones y observaciones.

A la Dra. Analí Gámez por su paciencia, sus aportaciones a las correcciones de la tesis y por siempre estar ahí para ayudarme cuando tenía dudas.

Al Dr. Jesús Agustín Badillo por recibirme en su laboratorio en la Ciudad de México durante un año, por darme todas las facilidades, un ambiente de trabajo sano, equipo y reactivos, por sus incontables consejos como investigador. Además quiero agradecerle por ser un gran amigo y estar al pendiente también del lado humano de un científico en formación.

A la Dra. Sawako Hori del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (UABC) por donar la cepa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 19698.

A los técnicos de los laboratorios de Patogénesis Microbiana (Dra. Martha Reyes), Biotecnología Vegetal (M.C. Mario Arce) y de Biología Molecular de Plantas (M.C. Julio Hernández) del CIBNOR por las facilidades y apoyo brindados para desarrollar esta investigación.

A los laboratorios de Biotecnología Molecular I y II de la UPIBI.

Contenido

I. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Género *Mycobacterium* 1

1.1.1 Complejo *Mycobacterium avium* 1

1.1.2 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 1

1.2 Paratuberculosis: Etiología, Signos Clínicos y Patogénesis 2

1.2.1 Impacto de la Paratuberculosis a Nivel Mundial 3

1.2.2 Paratuberculosis en México 4

1.3 Desarrollo de Vacunas 6

1.3.1 Selección inmuno-informática de antígenos: Vacunología Inversa 6

1.4 Plataformas de producción de proteínas recombinantes 7

1.4.1 Microalgas como plataformas de producción de proteínas recombinantes 8

1.5 Transformación genética de cloroplastos 9

1.5.1 Producción de proteínas recombinantes en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* 10

II. ANTECEDENTES 11

III. JUSTIFICACIÓN 13

IV. HIPÓTESIS 13

V. OBJETIVOS 13

V.I. OBJETIVO GENERAL 13

V.II. OBJETIVOS PARTICULARES 13

VI. MATERIALES Y MÉTODOS 15

6.1 Análisis *in silico* 15

6.1.1 Predicción de regiones de unión al CMH II y localización sub celular 15

6.1.2 Alineamiento de las secuencias candidatas 15

6.1.3 Predicción de epítopos a células T 16

6.1.4 Predicción de péptidos de unión al CMH II 16

6.1.5 Predicción de Epítopos de células B 16

6.1.6 Predicción de Epítopos de Linfocitos T citotóxicos 16

6.2 Análisis Fisicoquímicos *in silico* 16

6.2.1 Hidrofobicidad 16

6.2.2 Punto isoeléctrico 17

6.2.3 Estructura Secundaria 17
6.3 Microrganismos utilizados 17
6.3.1 MAP ATCC19698 17
6.3.2 *E. coli* Top10F´ 17
6.3.3 *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 wild type mt+ [137c] 17
6.4 Extracción de ADN genómico (ADNg) de *MAP* 18
6.5 Diseño de iniciadores 19
6.6 Amplificación por PCR de los genes candidatos 21
6.7 Electroforesis de ADN en geles de agarosa 22
6.8 Purificación de los genes candidatos 22
6.8.1 Digestión de ADN con enzimas de restricción 23
6.8.2 Tratamiento con fosfatasa alcalina 23
6.8.3 Ligación de fragmentos de ADN 24
6.8.4 Preparación de células calcio competentes 24
6.8.5 Minipreparación de ADN plásmidico 25
6.8.6 Maxipreparación de ADN plásmidico 25
6.9 Cultivo de *C. reinhardtii*, transformación y condiciones de crecimiento 25
6.9.1 Preparación de microacarreadores de tungsteno. 25
6.9.2 Metodología de Bombardeo 26
6.10 Selección de colonias transformadas y subcultivos 27
6.11 Confirmación de transformación por PCR 27
6.12 Extracción de proteínas de *C. reinhardti* 28
6.13 Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE) 28
6.14 Western Blot 29
VII. RESULTADOS 31
7.1 Análisis *in silico* 31
7.1.1 Predicción de regiones de unión al CMH II y localización sub celular 31
7.1.2 Alineamiento de las secuencias candidatas 31
7.1.3 Predicción de péptidos de unión al CMH I y II 34
7.1.4 Predicción de epítopos de células B y Linfocitos T citotóxicos. 35
7.1.5 Predicción de la respuesta inmune 36
7.2 Análisis Fisicoquímico 37

7.2.1 Punto isoeléctrico, Hidrofobicidad y estructura secundaria 37
7.3 Evaluación de la transformación genética del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii.* 39
7.3.1 Amplificación de los genes candidatos 39
7.3.2 Subclonación de los genes candidatos al vector pBlueScript II SK (+) 41
7.4 Transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* 44
7.5 Confirmación por PCR de las cepas transformadas de *C. reinhardtii*. 46
7.6 Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE) 48
7.7 Western blot 49
VIII. DISCUSIÓN 51
8.1 Unión y promiscuidad al CMH 51
8.2 Localización subcelular 52
8.3 Homología con el huésped 52
8.4 Predicción de la respuesta inmune 53
8.5 Potencial de proteínas de membrana como vacunas de sub unidades 54
8.6 Transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii.* 55
IX. CONCLUSIONES 59
X. PERSPECTIVAS 59
XI. BIBLIOGRAFÍA 60
XII. ANEXOS 73
11.1 Medios de cultivo 73
11.2 Antibióticos 75
11.3 Mantenimiento y conservación de cepas 75
11.4 Vectores plasmídicos 76
11.5 Geles de electroforesis de proteínas. 79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Reporte de la paratuberculosis en el mundo en el segundo semestre de 2013 76
Figura 2 Casos de paratuberculosis en México detectados mediante la técnica de ELISA durante el 2004 al 2009. 5
Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de los genes candidatos 39
Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de los genes candidatos con los sitios de corte Nde I, Sph I y el 3x FLAG.. 41
Figura 5 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión enzimática de los genes clonados en el vector pBlueScript II SK (+). 42
Figura 6 Digestión enzimática de los genes clonados en el vector pKM3.. 43
Figura 7 Purificación de genes y vectores para el ensamblaje al vector p320. 44
Figura 8 Progreso de las cepas posiblemente transformadas de *C. reinhardtii*.. 46
Figura 9 Amplificación por PCR del gen aphA-6 de colonias transformadas de C. reinhardtii.. 47
Figura 10 Amplificación por PCR del fragmento psbA-2100-rbcL de colonias transformadas de *C. reinhardtii*.. 47
Figura 11 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para la detección de las proteínas recombinantes MAP0189 y MAP2100. 48
Figura 12 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para la detección de las proteínas recombinantes MAP2100.. 49
Figura 13 Membrana de PVDF usada para la detección de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* MAP0189 y MAP2100 con el anticuerpo Anti-DDDDK. 50

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Secuencia de los iniciadores sintetizados para la amplificación de los genes candidatos ...……. **19**

Tabla II. Secuencia de los iniciadores sintetizados con sitios de restricción y una etiqueta 3x FLAG ...…….. **20**

Tabla III. Secuencia de los iniciadores sintetizados con el sitio *PacI*……..…….. **21**

Tabla IV. Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas lineales …….…....……. **22**

Tabla V. Predicción de regiones de unión al CMH II y localización sub celular ……...… **32**

Tabla VI. Análisis de Identidad de proteínas de MAP con micobacterias patógenas **33**

Tabla VII. Número de epítopos de células T (CMH I y CMH II) estimados por NetMHC y NetMHCII ...…… **34**

Tabla VIII. Número de epítopos de células B usando el servidor ABCpred y número de epítopos de células T citotóxicas usando el servidor NetCTLpan 1.1 ...……..…….……. **35**

Tabla IX. Proteínas candidatas seleccionadas para los estudios de respuesta inmune …...3**6**

Tabla X. Análisis de punto isoeléctrico y de estructura celular usando la herramienta Compute pI/Mw del servidor ExPASy server y SCRATCH/Phyre 2.0 …….. **38**

Tabla XI. Eventos de transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* ……..…. **45**

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Género *Mycobacterium*

Existen más de 100 especies de microorganismos Gram positivos ricos en GC pertenecientes al Género *Mycobacterium*, el único género listado en la Familia *Mycobacteriaceae* en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Wayne y Kubica, 1986). Sin embargo, este género está estrechamente relacionado con otros géneros que contienen ácidos micólicos, como lo son *Caseobacter, Corynebacterium, Nocardia* y *Rhodococcus* (Goodfellow y Cross, 1984). Los miembros patogénicos de este grupo se caracterizan por un crecimiento lento en cultivo, mientras que los no patogénicos crecen considerablemente más rápido.

1.1.1 Complejo *Mycobacterium avium*

Históricamente el Complejo *Mycobacterium avium* (*MAC*) ha sido clasificado de acuerdo al grupo de micobacterias que exhiben superposiciones características fenotípicas, incluyendo características de crecimiento, fuente de aislamiento y virulencia en animales experimentales (Turenne y Alexander, 2010). Este complejo abarca patógenos especializados para aves y ganado (Matlova *et al*., 2005), así como patógenos oportunistas en humanos (Horsburgh *et al*., 1994; Chapman, 1977; Richter *et al* 2002). Son abundantes en diversas regiones geográficas, tipos de suelo, ecosistemas acuáticos, sistemas de distribución de agua urbana (Falkinham, 2002), e incluso se ha detectado ADN de *M. avium* en la estación espacial "Mir" (Kawamura *et al*., 2001).

1.1.2 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis (MAP)* es un patógeno intracelular Gram positivo que pertenece al Complejo *M. avium*. Tiene un tamaño aproximado de 0.5 µm a 1.5 µm, es ácido-cloro alcohol resistente, además de que posee resistencia a factores

ambientales, como el calor, deshidratación y a los rayos del sol (Whan *et al*., 2006; Grant *et al*., 2005; Manning y Collins, 2010).

Es de crecimiento muy lento, por lo regular, las colonias son visibles de 6 a 10 semanas en medio de cultivo Middlebrook (Lambrecht *et al*., 1988). Sin embargo, existen múltiples medios de cultivo para MAP (Whittington, 2010) de los cuales se pueden diferenciar distintos fenotipos: colonias rugosas, translúcidas y hemisféricas, colonias lisas y opacas, hasta aglomerados celulares densos (Hermon-Taylor y El-Zaatari, 2004; Payeur, 2005; Thorel, 1984). No obstante, algunos medios de cultivo requieren de un sideróforo como la micobactina, necesario para la adquisición de hierro como en su medio ambiente (Lambretch y Collins, 1992).

1.2 Paratuberculosis: Etiología, Signos Clínicos y Patogénesis

MAP es el agente causal de la paratuberculosis o enfermedad de Johne caracterizada por una enteritis crónica, linfagitis y adenopatías mesentéricas (Buergelt *et al*., 1978). Afecta principalmente a rumiantes como al ganado vacuno, ovejas, cabras, ciervos, bisontes, búfalos y camellos (Okura *et al*., 2010; Nielsen y Toft, 2009; Mackintosh y Griffin, 2010), no rumiantes (Florou *et al*., 2008) y primates (Singh *et al*., 2011). En humanos se le ha relacionado con la enfermedad de Crohn, una enfermedad crónica, sistémica con prominente patología gastrointestinal, sin embargo, se necesitan pruebas más contundentes para comprobar esta hipótesis (Behr, 2010).

Los signos clínicos de la Paratuberculosis son el debilitamiento lento y progresivo, iniciando por un decremento en el rendimiento de producción de leche, pérdida de pelaje, diarrea (poco común en pequeños rumiantes como cabras y ovejas) hasta la emaciación y la muerte. La ingestión de *MAP* puede ocurrir de manera directa vía fecal-oral o de manera indirecta por medio del calostro, leche, agua o alimentos contaminados. Esta bacteria es captada por las células M presentes en el rumen intestinal, que utilizan para atravesar la célula, enseguida los macrófagos sub-epiteliales captan al patógeno liberado por las células M y se produce una diseminación aparente. Simultáneamente el hospedero induce una respuesta celular Th1 (Coussens *et al*., 2010), mientras que algunas bacterias logran

sobrevivir dentro del fagosoma atenuando la maduración de otros monocitos (Kuehnel *et al*., 2001). Los animales pueden permanecer asintomáticos de dos a cuatro años. Conforme la infección progresa, disminuye la respuesta celular y se incrementa la respuesta mediada por anticuerpos.

1.2.1 Impacto de la Paratuberculosis a Nivel Mundial

La Paratuberculosis es una enfermedad que se encuentra distribuida a nivel mundial (Figura 1), sin embargo hay países que no cuentan con información disponible (WAHID, 2012). La prevalencia de esta enfermedad puede variar de acuerdo a los animales que utilizan como base para la agricultura y los animales infectados que son exportados a otras regiones (Manning y Collins 2010). El impacto de la paratuberculosis se refleja en pérdidas económicas debido a la reducción en la producción de carne o leche, disminuyendo así la oferta de ganado para exportación y la limitación en el mejoramiento genético. En Estados Unidos se ha incrementado la prevalencia en un 68% de dicho patógeno en hatos lecheros (USDA, 2008) que se reflejan en pérdidas económicas de más de 200 millones de dólares.

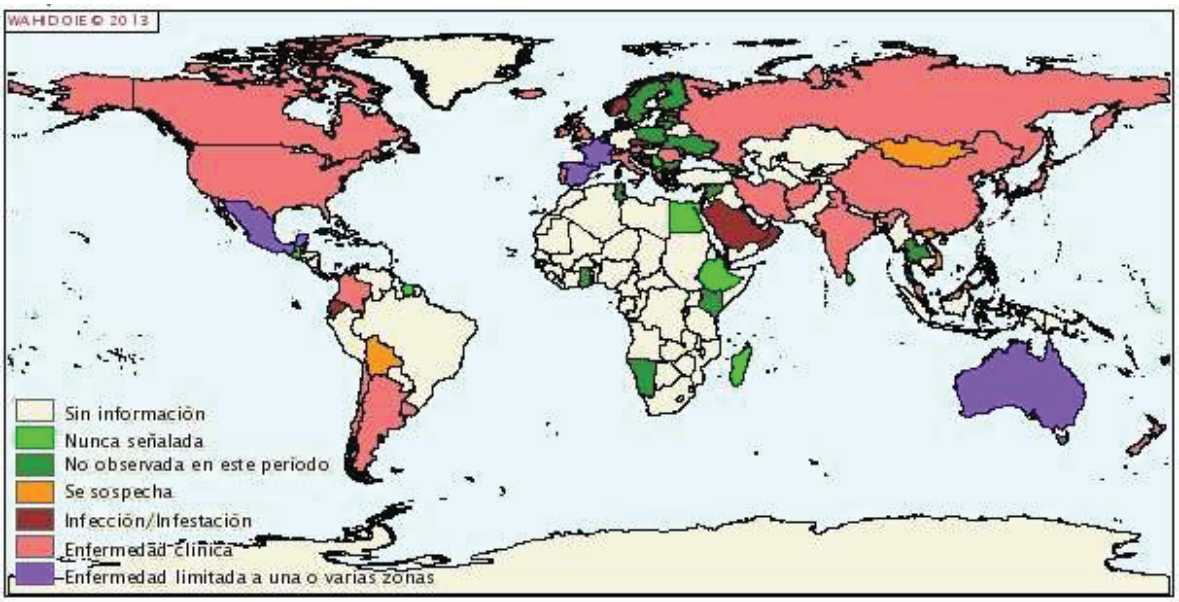

Figura 1 Reporte de la paratuberculosis en el mundo en el segundo semestre de 2013

Mientras que en el continente Europeo, Nielsen y Toft (2009) revelaron prevalencias de infecciones por *MAP* en ganado aproximadamente del 20% y de al menos 3-5% en algunos países de Europa.

1.2.2 Paratuberculosis en México

La situación en México acerca de la paratuberculosis no es muy clara, no existen los datos suficientes para establecer la situación real de esta enfermedad en cuanto a prevalencia, factores de riesgo asociados y pérdidas económicas. Pero, existen algunos trabajos que incluyen exámenes clínicos, serológicos, histológicos y patológicos que demuestran la presencia de *MAP* en rebaños ovinos y caprinos de varios estados con prevalencias que oscilan entre 7.09% y 33% (Estévez *et al*., 2007; Jaimes *et al*., 2008; Morón *et al*., 2013). En 2004 Chávez y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM realizaron los primeros estudios anatomopatológicos, serológicos y bacteriológicos para dicho patógeno, estos, además incluían técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) en más de 700 muestras. Los resultados arrojaron una frecuencia del 9% en bovinos, 19.72% en caprinos y 36% en ovinos en el país. Sin embargo, su distribución se encuentra a lo largo de México. Además se calculó el impacto económico de la paratuberculosis en bovinos lecheros del centro del país, donde recalcó que existían pérdidas por más de 10,000 pesos por vaca al año debido a la pérdida en la producción de lácteos.

Otro estudio que se realizó de 2004 a 2009 por parte de Chávez y colaboradores, fue el diagnóstico de la paratuberculosis alrededor del país por medio de la técnica de ELISA, donde se analizaron 7461 casos, que incluían ovinos, caprinos, bovinos, venados y llamas, de los cuales1370 resultaron ser casos positivos (Figura 2).

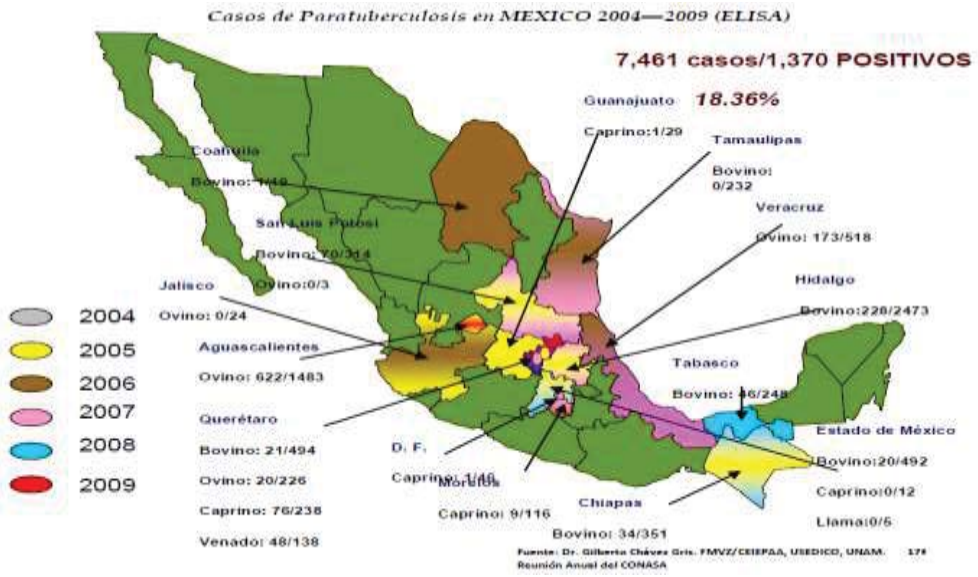

Figura 2 Casos de paratuberculosis en México detectados mediante la técnica de ELISA durante el 2004 al 2009. Fuente: FMVZ/USEDICO, CEIEPAA FMVZ UNAM 2004-2009.

En el 2010 el Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA), en conjunto con otras instituciones, recomendaron a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) llevar a cabo el: "Plan estratégico del programa para la atención de la Paratuberculosis en Ganado Bovino, Ovino y Caprino en México", en el que se enfoca en la implementación del conocimiento de la enfermedad, programa voluntario de prevención y control, control de movilizaciones e importaciones y la operación de un sistema de vigilancia epidemiológica con un costo aproximado de 19,520,000 pesos. Recientemente, en el 2013, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) publicó los laboratorios autorizados para el Diagnóstico de la Paratuberculosis, que se encuentran en los estados de Querétaro, Nuevo León, Estado de México, Tamaulipas, Jalisco y Chihuahua, en los que se utiliza la técnica de ELISA. Sin embargo, la lucha contra la erradicación de esta enfermedad, no solo se basa en el buen manejo del ganado y la prevención de contagio. Los enfoques actuales se dirigen a la fabricación de vacunas en contra de la paratuberculosis de manera que otorguen protección completa en modelos de infección.

1.3 Desarrollo de Vacunas

Una vacuna es un agente capaz de crear protección inmune en contra de una infección patógena específica y de las enfermedades que pudiera dar lugar. El uso de vacunas ha sido indispensable en la erradicación de enfermedades como la viruela (Nabel, 2013), y representan la intervención médica más efectiva. Las vacunas tradicionales o de Primera generación están basadas en el aislamiento de un agente infeccioso atenuado, inactivado o con toxinas destoxificadas por tratamientos químicos, tendiendo a una eficacia desde el 50 hasta el 100% como vacunas preventivas (Grimm y Ackerman, 2013). Las vacunas de Segunda Generación surgieron a partir de la necesidad de conocer que factores o componentes del patógeno son los suficientes para producir una respuesta inmune, disminuyendo los efectos secundarios. Están hechas a partir de componentes celulares purificados (vacunas de sub unidades) y se han utilizado en contra de tétano, influenza, hepatitis B, ántrax, difteria y la enfermedad de Lyme (Bagnoli *et al*., 2011). No obstante, hasta el momento las formulaciones de vacunas vivas atenuadas en contra de la enfermedad de Johne no parecen ofrecer una protección adecuada en contra de la infección de *MAP* en cabras (Hines *et al*., 2014) al igual que las vacunas comercialmente disponibles hechas a partir de células muertas por calor en modelos infecciosos (Rosseels y Huygen, 2008).

Gracias a la secuenciación del primer organismo vivo (Fleischmann *et al*., 1995) la biotecnología dio un paso enorme en el desarrollo de las vacunas. Las vacunas de Tercera Generación o Vacunología Inversa permiten el análisis de genomas de microorganismos patógenos, permitiendo la selección de posibles candidatos vacunales por medio de la identificación de epítopos, a través de herramientas inmuno-informáticas y "ómicas", que permiten una protección extensa.

1.3.1 Selección inmuno-informática de antígenos: Vacunología Inversa

La inmuno-informática ha emergido como un campo importante el cual actúa como una intersección entre la inmunología experimental y los enfoques computacionales. Una de las aplicaciones surgidas a partir de esta área es la vacunología inversa. Esta analiza el genoma del patógeno con el objetivo de identificar proteínas con potencial antigénico. Esto

representa una ventaja, debido a que no es necesario cultivar el patógeno y luego extraer las proteínas y hacer pruebas de antigenicidad, ahorrando tiempo y dinero (Davies & Flower, 2007).

Los criterios para la selección de posibles candidatos vacunales varían de acuerdo a las necesidades del problema. Algunas de las características que se consideran son: la localización sub celular de la proteína, debido a que las proteínas secretadas o expuestas del patógeno son el primer contacto con el hospedero; el número de hélices transmembranales; la probabilidad de adhesión; la predicción de la conservación de las secuencias entre patógenos; la similitud de la secuencia del patógeno respecto al hospedero; y la predicción del número de epítopos, y la predicción de la unión de epítopos al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I y Clase II (CMH I y CMH II respectivamente).

La producción de vacunas a partir de sub unidades por medio de la vacunología inversa, en sistemas de expresión de proteínas recombinantes que permitan reducir los costos de producción, que sean capaces de ser almacenadas y transportadas sin refrigeración, que brinden una alternativa viable y sean fácil de escalar a bajos costos, permitirán un gran avance en contra de enfermedades como la paratuberculosis.

1.4 Plataformas de producción de proteínas recombinantes

A la fecha, existen diversas plataformas de producción de proteínas recombinantes. La elección del sistema de expresión depende de la proteína en cuestión y la aplicación que se le vaya a dar a esta.

La manipulación genética en bacterias como *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes es muy sencilla, requiere un tiempo corto de regeneración y el mantenimiento de los cultivos es económico. Sin embargo, algunas bacterias como *E. coli* no son convenientes para la expresión de proteínas de gran tamaño o complejos proteicos debido a que no llevan a cabo modificaciones post-transcripcionales como la formación de enlaces disulfuro y glicosilaciones que son importantes para el correcto plegamiento de proteínas complejas (Demain y Vaishnav 2009).

Las levaduras por otro lado, tienen la habilidad de plegar proteínas complejas y desarrollar modificaciones post-traduccionales ya que tienen un sistema de expresión eucariota que permite una alta productividad de proteínas a bajo costo y de rápida escalabilidad. No obstante, algunas levaduras hiperglicosilan las proteínas recombinantes (Çelik y Çalik, 2012). En algunos casos, la glicosilación de proteínas determina la estabilidad de la proteína, solubilidad, antigenicidad, plegamiento, localización, actividad biológica, y circulación de la vida media (Palomares *et al.,* 2004).

Otro sistema de expresión de proteínas recombinantes como las líneas celulares de mamíferos, son consideradas la plataforma principal de producción de proteínas heterólogas complejas, permiten un alto grado de calidad proteica y modificaciones post traduccionales (Zhu, 2012). No obstante, se obtienen niveles de expresión bajos, ya que éstas pueden ser inestables y, además, los costos de producción son muy altos (Corchero *et al*., 2013).

En contraste, las plantas han desarrollado exitosamente la mayoría de las modificaciones post-traduccionales requeridas para la actividad de proteínas eucariotas complejas, proveen una flexibilidad tremenda en términos de escala, costo, seguridad y problemas regulatorios. Los sistemas de expresión en plantas actuales se basan en tres aspectos principales, que incluyen la expresión del genoma, la expresión del cloroplasto y el sistema de expresión a través de virus (Guan *et al.,* 2013).

1.4.1 Microalgas como plataformas de producción de proteínas recombinantes

Las Microalgas además de servir como un recurso natural mayor de macromoléculas como carotenoides, ácidos grasos poli insaturados de cadena larga y ficocoloides (Walker *et al*., 2005) han surgido como una gran promesa en la biotecnología en los últimos años, presentando condiciones extraordinarias para ser utilizadas como sistema de expresión de proteínas recombinantes. Las microalgas tienen altas tasas de crecimiento, comúnmente doblan su masa celular dentro de 24 h y son fáciles de manejar los cultivos en laboratorio ya que pueden crecer heterotróficamente o fototróficamente. La mayoría de las microalgas verdes entran en la categoría GRAS (por sus siglas en inglés: Generally regarded as safe),

consideradas como seguras, pueden ser administradas vía oral, lo que permite una estimulación en la mucosa e inmunidad humoral en contra de los patógenos si es administrada con componentes antigénicos.

La producción de proteínas recombinantes en microalgas pueden ser expresadas a partir del genoma nuclear, de cloroplasto o de mitocondria (Hall *et al*., 1993; Manuell *et al*., 2007; Yamasaki *et al*., 2005) utilizando metodologías estándar como bombardeo de micro proyectiles o electroporación (EL-Sheekh, 2000; Wang *et al*., 2007). El bombardeo de micro proyectiles o bio balística consta de la introducción de ADN directamente dentro de los organelos a alta velocidad, utilizando proyectiles de tungsteno u oro recubiertos de ADN disparados con una pistola accionada con helio (Koop *et al*., 2007), mientras que la electroporación es una técnica en la cual se aplica un campo eléctrico a las células para incrementar la permeabilidad de la membrana, permitiendo la introducción de ADN al interior de la célula.

1.5 Transformación genética de cloroplastos

Los cloroplastos se encuentran presentes en células de plantas y algas eucariotas. Proveen la fuente primaria de alimento en el mundo. Al realizar la fotosíntesis, secuestran carbono, producen almidón, sintetizan aminoácidos, ácidos grasos, pigmentos y participan en aspectos clave del metabolismo del nitrógeno y del azufre (Verma y Daniell, 2007). Cada cloroplasto puede tener hasta cientos de copias de su propio genoma, esta característica de poliploidía le permite la integración por recombinación homóloga de muchas copias del gen de interés, alcanzando así altos niveles de expresión (Manuell *et al*., 2007). En 1989 se logró la primera transformación estable del cloroplasto en *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton *et al*., 1988). Esta técnica dio pie a transformaciones de otras especies de microalgas. *C. reinhardtii* es la especie modelo por excelencia en la transformación genética de microalgas, alcanzado niveles de expresión de proteína total soluble del 20% (Surzycki *et al*., 2009).

1.5.1 Producción de proteínas recombinantes en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*

C. reinhardtii ha sido durante muchos años una especie modelo para estudios de ingeniería genética y biología molecular. En los años recientes, se han llevado a cabo múltiples transformaciones de esta alga verde con el objetivo de producir proteínas de interés terapéutico como lo son hormonas (Kim *et al*., 2002), anticuerpos monoclonales humanos (Rasala y Mayfield, 2011) y vacunas de subunidades (Gregory *et al*., 2012).

En el 2012 Gregory y colaboradores demostraron que la transformación plastidial en *C. reinhardtii* era capaz de producir vacunas candidatas estructuralmente complejas para el bloqueo de la transmisión de la malaria, a diferencia de *E. coli* y en *S. cerevisiae* cuyas proteínas no lograron el correcto plegamiento de sus estructuras (Kaslow *et al*., 1992; Gozar *et al.,* 1998).

El acelerado crecimiento en el desarrollo de vacunas y otras proteínas de interés a través de la transformación genética del cloroplasto se debe a que posee características para el correcto ensamblaje de proteínas complejas que otros sistemas de expresión no producen, como la viabilidad de expresar múltiples proteínas de ARN mensajeros policistrónicos, la integración dirigida de transgenes, la ausencia del silenciamiento de genes y que no existe una transmisión de polen como ocurre en los sistemas de transformación nuclear (Wang *et al*., 2009).

II. ANTECEDENTES

La Vacunología inversa comienza con el análisis bioinformático de las secuencias del genoma para predecir los mejores candidatos a vacunas utilizando distintas herramientas. Hoy en día más y más genomas de patógenos microbianos están siendo secuenciados convirtiéndose en estrategias emergentes importantes de desarrollo de vacunas.

La primera vacuna desarrollada a partir de la Vacunología Inversa surgió para combatir a la meningitis meningococcal, enfermedad causada por Neisseria *meningitidis* (Giuliani *et al*., 2006). Inicialmente se identificaron 570 ORFs, de los cuales 350 proteínas fueron expresadas *in vitro*, sin embargo, solo siete proteínas indujeron inmunidad en todos los serotipos.

Otro ejemplo en la selección de antígenos para combatir enfermedades como la tuberculosis, se desarrolló en 2005 por Mustafa y Shaban, quienes identificaron epítopos promiscuos de células Th1 de tres antígenos secretados principales, (*ESAT-6, CFP10 y MPt70*) por medio de un servidor virtual de predicción basado en matrices (ProPred) http://www.imtech.res.in/raghava/propred/para la unión de péptidos a 51 alelos HLA-DR.

Recientemente, Gurung y colaboradores en 2012 identificaron 8 proteínas de *MAP* como vacunas potenciales, debido a que presentaban una gran cantidad de epítopos para células B y T en su secuencia de aminoácidos en contra de *MAP*. Estas proteínas fueron previamente identificadas que eran sobre expresadas bajo condiciones de estrés *in vitro*, lo cual de manera natural inducen una respuesta similar a la latencia que está involucrada en evadir los mecanismos de defensa del huésped.

En los últimos años se han desarrollado herramientas y protocolos para la transformación genética del cloroplasto de *C. reinhardtii* con el fin de obtener moléculas de alto valor para la industria biotecnológica, como posibles vacunas candidatas en contra de virus, bacterias, malaria y otras enfermedades. Sin embargo, esta plataforma biotecnológica no se ha utilizado para la expresión de genes seleccionados mediantes análisis por vacunología inversa.

El primer reporte de un antígeno sintetizado en algas, fue de la molécula quimérica que comprende a la proteína estructural VP1 del virus de la fiebre aftosa y a la sub unidad beta de la toxina del cólera (*CTB*), un conocido adyuvante de la mucosa (Sun *et al*., 2003). Este antígeno ya ha sido expresado en plantas y demostró despertar inmunidad oral en ratones (Wigdorovitz *et al.,* 2009).

Wang y colaboradores en 2008 expresaron en el cloroplasto de *C. reinhardtii* la proteína ácido glutámico descarboxilasa huma 65 para combatir a la diabetes de Tipo I. Se probó y reaccionó con suero de pacientes diabéticos y hubo inducción en la proliferación de células de bazo de ratones diabéticos no obesos.

Recientemente, Demurtas y colaboradores en 2013 produjeron E7GGG, la cual es una forma atenuada mutada de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano (*HPV*) tipo 16. La expresión en cloroplasto permitió la acumulación de proteína alcanzando niveles de hasta el 0.12% de proteína total soluble.

A la fecha solo existe un reporte de transformación de *C. reinhardtii* par la producción de candidatos a vacunas contra el complejo *Mycobcaterium*. En ese trabajo se logró expresar el gen *esxH* de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual codifica un antígeno de células T inmuno dominante de 10 KDa de peso (Pratheesh y Kurup, 2013). Por consiguiente, la estrategia de este trabajo fue generar los vectores de transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii* para la expresión y producción de genes con potencial vacunal a evaluarse contra la infección causada por *MAP*.

III. JUSTIFICACIÓN

Los altos costos de producción, almacenamiento y purificación de las vacunas "tradicionales" hacen necesaria la implementación de otros métodos para la obtención de estas y otras moléculas de interés biomédico necesarias para el control de enfermedades como la paratuberculosis. El presente trabajo pretende implementar la transformación plastidial de *Chlamydomonas reinhardtii* para la producción de proteínas recombinantes con potencial a evaluarse como vacunas contra la paratuberculosis.

IV. HIPÓTESIS

Es posible la inserción genética en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* para la producción de proteínas recombinantes con capacidad antigénica de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

V. OBJETIVOS

V.I. OBJETIVO GENERAL

Insertar en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* los genes seleccionados *in silico* con potencial a evaluarse como vacunas contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

V.II. OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar y seleccionar *in silico* antígenos de MAP con potencial para evaluarse como vacunas.
- Construir los vectores de transformación que contengan los antígenos con potencial a evaluarse en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.
- Determinar la presencia de los genes de interés en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.

- Analizar la presencia de las proteínas recombinantes producidas en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis *in silico*

Con el fin de seleccionar y clasificar secuencias de proteínas de *MAP* como candidatos vacunales se utilizaron programas y servidores inmuno-informáticos en línea tomando en cuenta características de probabilidad antigénica. Las secuencias de acuerdo a su clasificación funcional II.C.5 Otras proteínas de membrana (n=100) reportadas por Li y colaboradores en 2005. Se descargaron en formato FASTA de la base de datos del GenBank® NIH en el Centro Nacional de Biotecnología y de la Información (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

6.1.1 Predicción de regiones de unión al CMH II y localización sub celular

Las 100 secuencias reportadas como Otras proteínas de membrana de *MAP* K-10 fueron sometidas a un análisis de unión al CMH II por medio del servidor en línea ProPed disponible en: http://www.imtech.res.in/raghava/propred/ (Singh y Raghava, 2001), el cual es una herramienta web gráfica que utiliza algoritmos de predicción basados en matrices cuantitativas de literatura publicada por (Sturniolo *et al*., 1999) empleando una tabla de coeficientes entre la posición del aminoácido. El valor de corte utilizado fue del 3% y se utilizaron 51 alelos de antígenos de leucocitos de humanos (HLA-DR) disponibles en el servidor que cubren más del 90% de moléculas CMH II expresadas en células presentadoras de antígenos. Por otra parte, se utilizó el servidor TMHMM para la predicción de hélices transmembranales basados en el Modelo Markov de las secuencias candidatas, disponible en http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/.

6.1.2 Alineamiento de las secuencias candidatas

Se realizó el alineamiento local básico de las 10 secuencias candidatas que codifican proteínas con el programa en línea blastp disponible en: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins del Centro Nacional de Biotecnología y de la Información (NCBI) con el fin de conocer la similitud entre las

proteínas de *Bos taurus,* *Mus musculus* y *MAP* para descartar aquellas secuencias que compartan o traslapen péptidos considerados epítopos. Además se realizó el alineamiento local básico de las secuencias de *MAP* con otras micobacterias.

6.1.3 Predicción de epítopos a células T

Se realizó la predicción de péptidos de unión al CMH I con los alelos de ratón (H-2-Db, H-2-Dd, H-2-Kb, H-2-Kk y H-2-Ld) utilizando redes neuronales artificiales mediante el servidor NetMHC 3.2, disponible en http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/.

6.1.4 Predicción de péptidos de unión al CMH II

Se realizó la predicción de péptidos de unión al CMH II con los alelos de ratón (H-2-IAb y H-2-IAd) utilizando redes neuronales artificiales mediante el servidor NetMHCII 2.2, disponible en http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/.

6.1.5 Predicción de Epítopos de células B

Se localizaron regiones de Epítopos de células B en las secuencias candidatas por medio del programa ABCPred, disponible en: http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/index.html, utilizando un valor de corte de 0.7.

6.1.6 Predicción de Epítopos de Linfocitos T citotóxicos

Se realizó la predicción de los epítopos de linfocitos T citotóxicos de las secuencias candidatas mediante el servidor NetCTL 1.2, disponible en: http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/.

6.2 Análisis Fisicoquímicos *in silico*

6.2.1 Hidrofobicidad

Se analizaron las secuencias candidatas en el programa Protscale, disponible en http://web.expasy.org/protscale/ para calcular y representar la Hidrofobicidad utilizando la escala propuesta por Kyte y Doolittle en 1982.

6.2.2 Punto isoeléctrico

Se determinó el valor teórico del punto isoeléctrico de las secuencias candidatas con ayuda del programa Compute pI/Mwtool, disponible en: http://web.expasy.org/compute_pi/.

6.2.3 Estructura Secundaria

Se realizó la predicción de la estructura secundaria en base a la secuencia de aminoácidos de las secuencias candidatas por medio del servidor SCRATCH disponible en: http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/.

6.3 Microrganismos utilizados

6.3.1 MAP ATCC19698

Es una cepa de referencia donada por la Dra. Sawako de la Universidad Autónoma de Baja California en Ensenada, Baja California, México.

La cepa ATCC19698 de *MAP* fue cultivada durante seis semanas a una temperatura de 39°C con el medio en caldo Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ), complementado con 10% de albúmina-dextrosa-catalasa (ADC) (Becton Dickinson) y 4 mL (2 mg) micobactina J (Allied Monitor, Inc., Fayette, MO).

6.3.2 *E. coli* Top10F´

Genotipo F' (lacIq Tn10(tetR)) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ^- (Invitrogen) (Dcekier, 2008). Cepa utilizada para la selección con base en el color de colonias transformadas con vectores que expresan el péptido alfa de la beta-galactosidasa sin necesidad de emplear IPTG.

6.3.3 *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 wild type mt+ [137c]

Cepa silvestre aislada por G. M. Smith en el año 1945 en Amherst MA, contiene mutaciones en los genes *nit1* y *nit2,* los cuales bloquean la actividad de la nitrato reductasa,

por lo que no puede crecer en presencia de nitrógeno como su única fuente de nitrógeno (*The Chlamydomonas Sourcebook* [Harris (1989)], p. 215). Sin embargo, la mayoría de las especies de *Chlamydomonas* son capaces de asimilar nitratos, nitritos y amonio como única fuente de nitrógeno.

Fue obtenida del centro de recursos de Chlamydomonas y cultivada en condiciones asépticas en medio solido TAP a una temperatura de 25°C bajo iluminación constante con una lámpara de luz blanca de 40 Watts. En los cultivos líquidos las cepas fueron crecidas bajo las mismas condiciones de temperatura e iluminación a 100 rpm de agitación.

6.4 Extracción de ADN genómico (ADNg) de *MAP*

Se tomaron 5 mL de cultivo de *MAP* que fueron centrifugados a 13 500 *rpm* durante 20 min para después resuspender la pastilla en 1 mL de buffer de lisis (Tris 1 M pH 8.0, EDTA 1 mM y 1% Tritón 100 X). Posteriormente, las muestras sufrieron un choque térmico, se calentaron a 90°C durante 10 min y enseguida se llevaron a -80°C por otros 10 min. Se adicionaron 40 µL de lisozima (20 mg/mL) y se incubaron durante dos horas a 37°C. A continuación se le añadieron 4 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó durante 30 min a 68°C. Después se centrifugó a 13 500 *rpm* durante 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Enseguida se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó en vortex durante 30 segundos y se añadieron 20 µL de RNAsa a 100 µg/mL que se incubaron a 37°C durante una hora. Luego, se centrifugó a 10 000 *rpm* durante dos min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo. Después, se sumaron 0.6 volúmenes de isopropanol frío y se incubó a -80°C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 13 500 *rpm* durante 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Enseguida, se añadieron 500 µL de etanol frío al 70% y se mezcló suavemente por inversión. Se centrifugó a máxima velocidad durante cinco min y se removió el etanol mediante la pipeta y el uso del concentrador de vacío (Eppendorf® Brand Vacufuge ® Modelo 5301). Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 30 µL de agua miliQ.

6.5 Diseño de iniciadores

El diseño de los iniciadores para las secuencias candidatas se realizaron por medio del programa Oligo7 disponible en: http://www.oligo.net/downloads.html.

Los iniciadores se mandaron sintetizar al Instituto de Biotecnología (UNAM) y fueron utilizados para la amplificación de cada uno de los genes. Primero, se diluyeron en un volumen de agua miliQ hasta alcanzar una concentración de 1 nmol/µL, y posteriormente un volumen de esta solución se llevó a una concentración de 1 pmol/µL para su uso en las reacciones de PCR para amplificar la secuencia correspondiente a cada uno de los genes de *MAP* (Sambrook y Russell, 2001) (Tabla 1).

Tabla I. Secuencia de los iniciadores sintetizados para la amplificación de los genes candidatos.

Gen	Secuencia de iniciadores	No de bases	Acceso en GenBank
MAP0065	F 5′-GTGACCGGCGCTGCCGAGCC-3′ R 5′-TCATGTCGCCCCGGCCAGCG-3′	1638 pb	2718732
MAP0164	F 5′-GTGACATCGCCGCATAAGGT-3′ R 5′-TCAGTGGCGAATCCACGTGA-3′	1530 pb	2721337
MAP0189	F 5′-GTGATCCAGGTGTGCTCTCAATG-3′ R 5′-CTATGCTGCCGGTTCCTGG-3′	1005 pb	2717723
MAP0215	F 5′-ATGAGGCGGCCCGGCTGG-3′ R 5′-TCACTCGCGCGGCGGCGGTG-3′	1920 pb	2720344
MAP0901	F 5′-GTGACACGGGTGGAGGACAACC-3′ R 5′-CTATTCCCCGGGCCGGCG-3′	1401 pb	2718955
MAP2100	F 5′-ATGATCACCTCCAAGCTGCG-3′ R 5′-TCATGTCGCCGAACGGATCT-3′	1761 pb	2720755
MAP2499	F 5′-ATGCTCCTGGCACTGCTGCGC-3′ R 5′-TCATGGGGTGCCCCCGGTG-3′	1758 pb	2719119

MAP2327	F 5′-ATGGGATTCATCCGGCCCAATCT-3′ R 5′-TCAGGAATCGCTGACCCGGC-3′	1740 pb	2720494

Además, se diseñaron 10 pares de iniciadores con sitios de restricción *Nde I*, *Sph I* y una etiqueta 3x FLAG. Se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Secuencia de los iniciadores sintetizados con sitios de restricción y una etiqueta 3x FLAG.

Iniciador	Secuencia	No de bases
RSS1	5′GGAATTCCATATGGACTATAAGGATCAC GACGGTGACTACAAGGACCACGACATTG ATTACAAGGACGACGACGACAAGATGAC ATCGCCGCATAAGGTC 3′	100
RSS2	5′GGAATTCCATATGTTAGTGGCGAATCCA CGTGAAGAGCCCTCC 3′	43
RSS3	5′GGAATTCCATATGGACTATAAGGATCAC GACGGTGACTACAAGGACCACGACATTG ATTACAAGGACGACGACGACAAGATGATC CAGGTGTGCTCTCAA 3′	100
RSS4	5′GGAATTCCATATGACATGCATGCTTATGC TGCCGGTTCCTGGCCCTTGAACTC 3′	53
RSS5	5′GGAATTCCATATGGACTATAAGGATCAC GACGGTGACTACAAGGACCACGACATTG ATTACAAGGACGACGACGACAAGATGAC AGATCTGAGCGAGAAG 3′	100
RSS6	5′GGAATTCCATATGACATGCATGCTTATCC GCCGCCGCCCGGGGACGCGCCCAG 3′	53
RSS7	5′GGAATTCCATATGGACTATAAGGATCAC GACGGTGACTACAAGGACCACGACATTG ATTACAAGGACGACGACGACAAGATGATC ACCTCCAAGCTGCGC 3′	100
RSS8	5′GGAATTCCATATGACATGCATGCTTATGT CGCCGAACGGATCTTCCCGGGTGA 3′	53
RSS9	5′GGAATTCCATATGGACTATAAGGATCAC GACGGTGACTACAAGGACCACGACATTG ATTACAAGGACGACGACGACAAGATGAG CGAACTGATCAAAGAG 3′	100
RSS10	5′GGAATTCCATATGACATGCATGCTTATTA ATTCAGTTTATGACCCAGCTTGCT 3′	53

Por otra parte, se diseñaron los iniciadores JAB476 y JAB477 que amplifican la región 5' del promotor *psbA* y la región 3' del terminador *rbcL* de *C. reinhardtii* añadiéndole un sitio *Pac I* en los extremos (Tabla III).

Tabla III. Secuencia de los iniciadores sintetizados con el sitio *PacI*.

Iniciador	Secuencia	No de bases
JAB476	5'gccgcgtattaattaaATCGATGTCGACCGTCCTA T3'	36
JAB477	5'gccgcgtattaattaaCACGTAAGCGCATTTTCTT A3'	36

6.6 Amplificación por PCR de los genes candidatos

Se llevó a cabo la amplificación por PCR de algunos de los genes seleccionados de *MAP*. La enzima que se utilizó fue GoTaq® Flexi que ofrece una amplificación robusta igual a, y en algunos casos superior a la taq ADN polimerasa convencional. Asimismo, debido al alto contenido de guaninas y citosinas que presentan los genes de *MAP* fue necesaria la adición de dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final del 5%.

Las reacciones se realizaron utilizando el equipo PTC-200. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 seg, un gradiente de temperatura de alineación desde los 61°C hasta los 67°C por 30 seg, 72°C por 1 min con 50 seg y una extensión final de 72°C por 10 min.

En la amplificación de los genes candidatos con los iniciadores de la Tabla II se realizaron de acuerdo a las condiciones del kit KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen), enzima de alta fidelidad, la cual se usa para la amplificación de templados de ADN ricos en guaninas y citosinas. Las temperaturas de alineamiento en el PCR para la amplificación de los genes fueron de 64°C para *MAP0164* y *MAP0189* mientras que para *mTagBFP* y *MAP2100* fueron de 66°C.

En el caso de los genes candidatos la amplificación con los iniciadores JAB476 y JAB477 se estableció con la enzima Phusion ADN Polimerasa (New England Biolabs) de acuerdo con las condiciones sugeridas por el proveedor, utilizando las mismas temperaturas de alineamiento que con los iniciadores de la Tabla II.

6.7 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los geles de agarosa permiten la visualización y separación de fragmentos de ADN así como la determinación aproximada de su tamaño. La concentración de los geles de agarosa depende del tamaño de los fragmentos de ADN a separar (Tabla IV).

Tabla IV. Concentración recomendada de gel de agarosa para separar moléculas lineales.

% de agarosa	Tamaños de ADN (pb)
0.75	10 000 – 15 0000
1	500 – 10 000
1.25	300 – 5000
1.5	200 – 4000
2.0	100 – 2500
2.5	50 – 1000

La técnica se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Sambrook y Russell (2001). La agarosa fue disuelta en Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, calentando en microondas hasta observarse una solución transparente.

Las muestras de ADN se mezclaron con 1/10 de volumen final de tampón de carga 6X, posteriormente fueron cargadas en los pozos del gel de agarosa y corridas a un voltaje de 120V durante 35 min. Para la visualización del ADN por medio de tinción se agregó 1 µL por cada 100 mL de agarosa de SYBR® Safe.

6.8 Purificación de los genes candidatos

Los productos correspondientes al tamaño de los genes fueron cortados, se les agregó un volumen igual de la solución de unión de membrana incluida en el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) a tubos Eppendorf. Enseguida, se aplicó vortex y fueron

incubados a temperaturas de 50-65°C durante 10 min para inmediatamente centrifugar a máxima velocidad y asegurarse que el contenido quedara al fondo de los tubos. El producto de PCR se incubó durante un min en las columnas SV a temperatura ambiente y enseguida se centrifugó para que este producto de PCR pasara a través de la membrana de las columnas SV. El sobrenadante fue descartado y la membrana fue lavada con 700 µL de solución de lavado de membranas, previamente diluida con etanol al 95%. Se centrifugó una vez más a máxima velocidad durante un min y se descartó el sobrenadante y se repitió el mismo paso. Finalmente, a las membranas secadas al vacío les fueron agregadas 50 µL de agua libre de nucleasas, se centrifugaron y se colectaron en tubos nuevos de 1.5 mL.

6.8.1 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción o endonucleasas son enzimas que reconocen secuencias cortas y específicas de ADN y cortan la doble cadena de ADN en sitios específicos o adyacentes a su secuencia de reconocimiento. Las enzimas de restricción utilizadas fueron: *EcoR V, Nde I, Sph I, Pac I* y *BamH I*, mismas que se usaron en volúmenes de reacción de 20-50 µL bajo las condiciones de reacción sugeridas por los fabricantes (New England Biolabs). Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C durante 4 hrs, posteriormente se corrieron en un gel de agarosa. En algunos casos, las bandas específicas fueron cortadas y purificadas a partir del gel.

6.8.2 Tratamiento con fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima hidrolasa capaz de remover grupos fosfatos del extremo 5’ terminal y es utilizada para prevenir la religación de los vectores de clonación linearizados. La fosfatasa alcalina utilizada fue la fosfatasa alcalina de camarón (SAP) de Promega. Para la reacción de desfosforilación se incubó 1 U de SAP por cada microgramo de ADN digerido con endonucleasas a 37°C durante 30 min en buffer SAP 1X, en un volumen final de 30-50 µL. Se inactivó la enzima por incubación a 65°C durante 15 min, posteriormente se centrifugó la reacción y se obtuvo una alícuota de 2 µL para la ligación.

6.8.3 Ligación de fragmentos de ADN

Las ADN ligasas catalizan la formación de un enlace fosfodiester entre el hidroxilo 3' y el fosfato 5' de los residuos adyacentes de ADN. La ligación de los insertos en el interior de los vectores empleados se realizó con la enzima T4 ADN ligasa (Fermentas) utilizando una proporción molar inserto: vector 3:1. Para calcular la cantidad de inserto a adicionar se siguió la siguiente formula:

$$\frac{ng\ de\ vector \times longitud\ en\ kb\ del\ inserto}{longitud\ en\ kb\ vector} \times \frac{proporción\ molar\ inserto}{vector} = ng\ de\ inserto$$

Una vez calculada la relación, la reacción se llevó a un volumen de 10 µL, adicionando 1 µL de buffer 10X, 1 U de T4 ADN ligasa y agua. Se incubó toda la noche a 4°C y posteriormente se utilizaron de 2-7 µL de la mezcla para transformar con células calcio-competentes de *E. coli* con el fin de amplificar el producto de la ligación.

6.8.4 Preparación de células calcio competentes

La cepa utilizada fue *E. coli Top10F* para las clonaciones en todos los vectores utilizados. Se inoculó una colonia de la cepa *E. coli Top10F* en 5 mL de medio de cultivo LB estéril, con agitación de 200 rpm a 37°C durante toda la noche. Posteriormente en un matraz de 50 mL de medio LB estéril se inoculó con 1 mL de cultivo previo y se incubó a 37°C con agitación constante de 4-5 horas hasta obtener una densidad óptica (OD) de 0.4-0.6 a 600 nm. Transcurrido el tiempo indicado se colocó el matraz en hielo durante 15 min, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min a 4°C retirando el sobrenadante. La pastilla formada fue resuspendida cuidadosamente en CaCl2 0.1 M frío; se realizaron 3 lavados con CaCl2 0.1 M frío con 20 mL, 10 mL y 7.5 mL respectivamente y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min. En cada paso de lavado, el matraz fue colocado en hielo durante 15 min. Se realizaron alícuotas de 50 µL y fueron mantenidas a -70°C.

6.8.5 Minipreparación de ADN plásmidico

La extracción de ADN plásmidico a pequeña escala se llevó a cabo por medio del kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) atendiendo el protocolo establecido por la compañía.

6.8.6 Maxipreparación de ADN plásmidico

Para obtener mayores concentraciones de ADN y así poder utilizarlo para el recubrimiento de las partículas de tungsteno, se realizó la maxipreparación de ADN utilizando el kit HiSpeed Plasmid Purification (QIAGEN), el cual está basado en un procedimiento modificado de lisis alcalina, seguida de la unión del ADN plásmidico a la resina de intercambio de aniones QIAGEN, bajo las condiciones apropiadas de pH y baja salinidad.

6.9 Cultivo de *C. reinhardtii*, transformación y condiciones de crecimiento

Se utilizó la cepa cc125 de *Chlamydomonas reinhardtii* de (CC-125, The *Chlamydomonas* Core-Collection Center, Duke University). Antes de la transformación, la cepa creció a mediados de la fase logarítmica (aproximadamente 8×10^5 a 2×10^6cel/mL) en medio TAP (tris-ácido-fosfato) a 29°C en agitador rotatorio. Las células se cosecharon mediante centrifugación y resuspensión en medio TAP a una concentración de 3×10^7 cel/mL. Se tomaron 200 µL y se inocularon en placas de medio solido TAP en forma de gota en el centro de la misma, al término de esta inoculación se incubaron a una temperatura de 25°C en condiciones de obscuridad por un tiempo de dos horas.

6.9.1 Preparación de microacarreadores de tungsteno.

Para la preparación de microacarreadores para el bombardeo partículas con ADN al interior del cloroplasto de *C. reinhardtii* se utilizó la metodología descrita por Sanford *et al*. (1993).

Se pesaron 30 mg de micro partículas de tungsteno con un tamaño de 0.7 µm en un tubo Eppendorf de 1.5 mL para añadirle 1 mL de etanol al 70% y se agitó vigorosamente de 3-5

min. Durante 15 min se dejaron remojando las partículas en etanol al 70%, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante un min para crear una pastilla y desechar el sobrenadante. Después, la pastilla se lavó con un mL de agua estéril durante tres ocasiones, aplicando vortex, dejando reposar, centrifugando y descartando el sobrenadante. Enseguida, se agregaron 500 µL de glicerol estéril al 50% para llevar a una concentración de 60 mg/mL. Se agitaron las partículas aplicando vortex durante 5 min para deshacer partículas aglomeradas y se transfirieron 50 µL de la suspensión de micro partículas a un tubo estéril de 1.5 mL en el cual se le añadieron 5 µL de ADN (1 µg/µL), 50 µL de CaCl2 (2.5 M) y 20 µL de espermidina (0.1 M) mientras se agitaba la suspensión. Enseguida, se dejaron asentar las micro partículas durante un min, posteriormente, se centrifugaron para obtener una pastilla descartando el sobrenadante y se le aplicó un lavado con etanol al 70% (grado HPLC), se desechó el sobrenadante y se le añadieron 120 µL de etanol al 100%. La pastilla fue resuspendida suavemente invirtiendo el tubo varias veces y se esperó a que el etanol bajará por las paredes.

Se colocaron aproximadamente 30 µL de la mezcla en los discos macro, esparciendo con la punta de la micropipeta en un diámetro de 2-3 cm. Se dejó secar la mezcla en los discos macro y enseguida se llevó a cabo el bombardeo de las micropartículas con ADN al cloroplasto de *C. reinhardtii*.

6.9.2 Metodología de Bombardeo

Se realizó el bombardeo de micro partículas de tungsteno con los vectores que expresan los genes seleccionados en condiciones de esterilidad bajo la campana de flujo laminar y con la esterilización del equipo de bombardeo Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System con etanol al 70%. Inicialmente, se abrió la válvula principal del tanque de helio a 200 psi, al igual que fue encendida la bomba de vacío.

Para la transformación, se utilizaron discos de ruptura de 1 100 psi (Bio-Rad), la caja Petri que contenía las células se colocó a una distancia de nueve centímetros y se generó vacío hasta alcanzar 20 mm de Hg dentro de la cámara de transformación, se mantuvo el vacío y

se realizó el disparo de las micropartículas con ADN contenidas en el macroacarreador. Una vez hecho el disparo de las micropartículas, las placas de medio TAP con células de *C. reinhardtii* se incubaron a 25°C en oscuridad por un periodo de 24 horas, al término del tiempo de incubación, las placas fueron transferidas a una cámara de crecimiento con una temperatura de 25°C con iluminación constante.

6.10 Selección de colonias transformadas y subcultivos

Para cada sesión de bombardeo se utilizaron controles. El positivo que consta de la cepa de *C. reinhardtii* en medio TAP sin antibiótico y sometida al proceso de bombardeo, excepto que las partículas no contenían ADN. Para el control negativo se utilizó la cepa de *C. reinhardtii* en medio TAP con antibiótico (*Kanamicina*) y sometida al proceso de bombardeo, excepto que las partículas no contenían ADN. Las placas que fueron bombardeadas se mantuvieron en incubación a 25°C al menos durante cuatro semanas. Las líneas transformadas fueron recuperadas hasta que el control negativo murió en su totalidad y en las placas transformadas aparecieron pequeñas colonias que fueron resembradas a nuevas placas de medio TAP con *Kanamicina* entre 2-3 semanas. Se realizaron tres resiembras con el objetivo de tener líneas homoplásmicas. Las líneas que mostraron crecimiento fueron analizadas por PCR para la confirmación de inserción de genes.

6.11 Confirmación de transformación por PCR

Para la confirmación de líneas transformadas se realizaron amplificaciones de ADN por PCR de las líneas recuperadas resistentes a *Kanamicina*. Se tomaron tres colonias como referencia, la cuales fueron centrifugadas por separado a una velocidad de 13 000 *rpm* para formar una pastilla, estas fueron resuspendidas en 50 μL de solución Chelex-100 (5%). Enseguida, se aplicó vortex durante 5-10 seg y se incubaron a 98°C por 12 min, posteriormente se enfriaron en hielo por un min. Después, se aplicó vortex durante 5 seg y se centrifugó a 13 000 *rpm*.

Para la reacción de confirmación de transformación mediante PCR, se tomaron 2 μL de la extracción de ADN de *C. reinhardtii* como templado, y se llevó a cabo utilizando la

polimerasa Phusion High-Fidelity DNA (Thermo Scientific) para amplificar el gen *aphA-6* con los iniciadores qfJABC8 y qrJABC8 que confiere resistencia a *Kanamicina* y el gen *MAP2100* con los iniciadores JAB476 y JAB477 con temperaturas de alineamiento de 55° C y 66°C respectivamente.

6.12 Extracción de proteínas de *C. reinhardti*

Se seleccionó una de las colonias de *C. reinhardtii* como referencia que resultaron positivas a las amplificaciones por PCR de los genes *aphA6* y *MAP2100* del vector 2100-p320. Con esta colonia fue inoculado un matraz con 100 mL de medio TAP y antibiótico (*Kanamicina*) para la extracción de proteínas. Además, se utilizó un control negativo, el cual constó de una cepa no transformada de *C. reinhardtii.* Los cultivos líquidos se centrifugaron una vez que alcanzaron una concentración de 1x106 células/mL, se centrifugaron a 6000 *rpm* durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se colocaron en 2 mL de buffer de extracción de proteínas (Ver Anexos). La mezcla se maceró en frío durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 8 mL del buffer de extracción de proteínas y centrifugaron durante 10 min a 6000 *rpm* y se recuperó el sobrenadante como proteína total soluble.

6.13 Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

Para la obtención de proteínas recombinantes, además del uso de la expresión en cloroplasto, se utilizó la cepa BL21 star de *E. coli* como control de la expresión de los genes seleccionados.

Se prepararon dos geles de poliacrilamida. El primero llamado gel de resolución se preparó al 12% y el segundo gel llamado empacador se preparó al 5% (ver Anexos).

Primero se colocó el gel de resolución, enseguida se le agregó isopropanol para evitar burbujas dentro del gel y que este polimerizara de manera uniforme en condiciones anaerobias. Posteriormente, se agregó el gel empacador encima del primer gel. Una vez polimerizados se colocaron en la cámara de electroforesis vertical y se llenó con el buffer de electroforesis *Laemmli* (Tris 12g, Glicina 57.6 g, SDS 2g aforado a dos litros de agua).

Se midió la concentración de las proteínas extraídas. Se tomaron 15 µg por cada muestra y fueron calentadas a 90°C durante cinco minutos con el buffer *2x Laemmli Sample Buffer* (65.8 M Tris-HCl, pH 6.8, 2.1% SDS, 26.3% (p/v) glicerol, 0.01% azul de bromofenol) a una proporción 1:1. Las condiciones en las que se corrieron los geles de proteínas una vez cargadas las muestras en los pozos de los geles fueron a 70 V por 30 min y 90 V durante 2 hora 20 min.

Ulteriormente, uno de los geles se colocó en solución fijadora (50% Metanol, 10% ácido acético, 40% Agua) por 30 min, una vez pasado el tiempo se descartó la solución fijadora y se agregó la solución de teñimiento (50% metanol, 10% ácido acético, 40% agua, 0.25% azul de coomasie) por 1 hora. Enseguida se colocó en solución desteñidora (10% ácido acético, 90% agua) hasta que el patrón de bandeo se volviera nítido.

6.14 Western Blot

Al finalizar la electroforesis, el gel de separación se dejó incubando en buffer de transferencia de proteínas 1x (48 mMTris, 39 mMGlicina, 2.5 mMSDS, 20% (v/v) metanol), previamente enfriado a 4°C, durante 10 min. Además, se dejaron incubando dos papeles filtro *Extra Thick Blot Paper* (Biorad) de 10 x 8cm y una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Biorad). Al momento se colocaron en el equipo para transferencia de proteínas *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Biorad) uno de los papeles filtro, la membrana de PVDF, el gel de poliacrilamida y el otro papel filtro creando un sándwich. La transferencia se realizó a 20 V durante 1 hora.

Finalizando el tiempo de la transferencia de proteínas, la membrana se enjuagó con PBST. Se llevó a cabo el bloqueo de la membrana con una solución de leche descremada al 5% con PBST. Después del bloqueo de la membrana se realizaron cinco lavados con PBST (previamente frío) de cinco minutos cada uno con agitación. Enseguida se colocó el anticuerpo monoclonal Anti-DDDDK (equivalente al anticuerpo 3X FLAG) (diluido 1:7000 en 15 mL de PBST) y se dejó incubando durante 1 hora. Al término de la hora, se descartó el anticuerpo Anti-DDDDK y se realizaron cinco lavados con PBST. Al concluir los lavados con PBST, la membrana se lavó con agua destilada y se agregaron 1.5 mL de

Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer) como especifica las instrucciones del fabricante para poder revelar la membrana, inmediatamente después se colocó en un fotodocumentador (Biorad) para poder obtener la imagen de la detección.

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis *in silico*

7.1.1 Predicción de regiones de unión al CMH II y localización sub celular

En el análisis de predicción de regiones de unión al CMH II (ProPed), se sometieron las 100 secuencias reportadas como Otras proteínas de membrana de MAP K-10, solo las 10 secuencias que presentaron una mayor afinidad a este fueron elegidas para continuar los análisis. Estas secuencias mostraron uniones al CMH II en los 51 alelos HLA-DR disponibles. La proteína *MAP0164* mostró el porcentaje de unión mayor con un 96.67 %, seguida de *MAP2327* con un 90% de unión y *MAP0901* con un 88.83 %. Así mismo, estas proteínas presentaron los epítopos más promiscuos: VVILGAIAI de *MAP0614* que era reconocido por el CMH II en los 51 alelos, VVILDAQPI de *MAP2327* reconocido en 50 ocasiones y LVIIAAVTL de *MAP0901*, reconocido en 49 ocasiones. Por otra parte, los resultados de localización sub celular de las proteínas de *MAP* fueron analizados por el software de localización subcelular pSORT (PSORT: http://www.psort.org/psortb/) (Yu N *et al*., 2010). La predicción de localización de todas las proteínas fue reportada como proteínas de membrana (Tabla V).

7.1.2 Alineamiento de las secuencias candidatas

Los análisis de homología con micobacterias patógenas mostraron porcentajes de identidad del 45-100 % y coberturas con un rango de 2-100 % (Tabla VI). La mayoría de las proteínas seleccionadas presentaron homología con *M. avium* subps. *avium ATCC25291* y una menor similitud con *M. avium* subps. *hominissuis* 104, en la cual *MAP2414c* no presentó similitud alguna.

Tabla V. Predicción de regiones de unión al CMH II y localización sub celular.

	Tamaño		Unión de proteínas y promiscuidad a los alelos HLA-DR					Promiscuidad de epítopos con mayor unión a los alelos HLA-DR			
Proteína	(aa)	LS	No. unión	Probados	% unión	% unión mayor	Epítopo	Posición	No. unión	Probados	% unión
MAP0065	545	M	51	51	100	82.65	VVMFFNIAA	189-197	41	51	82.65
MAP0164	509	M	51	51	100	96.67	VVILGAIAI	230-238	51	51	96.67
MAP0189	334	M	51	51	100	82.65	VVRYLLLVI	133-141	37	51	82.65
MAP0215	639	M	51	51	100	86.32	YRIDRVPRY	611-619	26	51	86.32
MAP0434	339	M	51	51	100	86.38	FVRSITIYL	277-285	47	51	86.38
MAP0901	466	M	51	51	100	88.33	LVIIAAVTL	29-37	49	51	88.33
MAP2100	586	M	51	51	100	82.11	WVFDMVMLV	553-361	34	51	82.11
MAP2327	579	M	51	51	100	90	VVILDAQPI	521-529	50	51	90
MAP2414c	869	M	51	51	100	83.62	LVLTASLTI	455-463	38	51	83.62
MAP2499	585	M	51	51	100	84.48	WVMSHMLPL	173-181	36	51	84.48
*Ag85b**	330	E	51	51	100	72.22	FVRSSNLKF	271-279	26	51	50.98
*ESAT-6**	96	E	49	51	96.07	68.37	VRAYQSMAS	65-73	44	51	86.27

Las proteínas en negritas tienen los valores más altos (%) de las puntuaciones más altas (100 secuencias analizadas).

El puntaje está calculado sobre el valor de unión más alto de cualquier epítopo en una secuencia proteica.

LS= Localización sub celular estimada utilizando el servidor TMHMM: M-Membrana. * Proteínas de referencia

Tabla VI. Análisis de Identidad de proteínas de MAP con micobacterias patógenas.

Proteína	*Mycobacterium,* excluyendo *MAP K10*		*Mycobacterium tuberculosis*		*Mycobacterium bovis*		*M. avium subs. hominissuis 104*		*M. avium subs. avium ATCC25291*	
	Identidad (%)	*Cobertura (%)*	*Identidad (%)*	*Cobertura (%)*	*Identidad (%)*	*Cobertura (%)*	*Identidad (%)*	*Cobertura (%)*	*Identidad (%)*	*Cobertura (%)*
MAP0065	100	100	82	98	81	98	35	4	99	100
MAP0164	100	100	84	97	92	51	48	4	99	93
MAP0189	100	91	63	100	63	100	53	4	96	86
MAP0215	100	100	82	97	82	96	50	2	99	100
MAP0434	100	100	76	93	75	96	50	5	99	100
MAP0901	100	87	80	83	80	83	45	4	97	92
MAP2100	99	100	45	91	45	91	57	3	98	100
MAP2327	99	100	65	91	64	99	32	5	99	100
MAP2414c	100	100	79	100	79	100	-	-	98	100
MAP2499	100	100	79	98	79	98	39	8	98	100
Ag85b	99	100	93	12	96	7	96	34	99	100
ESAT-6	100	100	80	100	80	100	33	31	100	100

7.1.3 Predicción de péptidos de unión al CMH I y II

Con el fin de caracterizar la afinidad y traslape de epítopos a alelos CMH I y CMH II de ratones, se utilizaron servidores NetMHC y NetMHCII (Tabla VII). Cada proteína se predice que posee un gran número de epítopos con afinidad débil y un número relativamente bajo de epítopos de afinidad fuerte para cualquiera de los CMH. En el caso de CMH I, se estimó que las proteínas poseían epítopos con afinidad fuerte y débil. La media del número de epítopos con afinidad fuerte fue de 6.3 (rango = 3-11) mientras que para los epítopos débiles fue de 22.8 (rango = 14-32). Por otra parte, la media de epítopos con una afinidad fuerte y débil fue de 7.5 (rango = 0-14) y 117.2 (rango = 49-203), respectivamente.

MAP2414c, MAP2327, MAP0434, MAP2100 y *MAP2499* fueron las proteínas que tuvieron el mayor número de epítopos de afinidad fuerte al CMH I, mientras que *MAP2100, MAP2414c, MAP0189* y *MAP0164* fueron las proteínas con el mayor número de epítopos con afinidad fuerte al CMH II.

Tabla VII. Número de epítopos de células T (CMH I y CMH II) estimados por NetMHC y NetMHCII.

	Afinidad por CMH I (cT) (H-2)		Afinidad por CMH I (cT) (BoLA)		Afinidad por CMH II (Th) (H-2)	
Proteína	Fuerte	Débil	Fuerte	Débil	Fuerte	Débil
MAP0065	6	29	0	25	4	138
MAP0164	6	14	2	6	10	118
MAP0189	4	20	2	12	12	80
MAP0215	4	21	3	27	5	125
MAP0434	7	21	4	12	4	49
MAP0901	3	14	2	11	7	118
MAP2100	7	32	6	17	14	203
MAP2327	8	26	4	25	0	94

|*MAP2414c*	11	30	6	29	13	111
MAP2499	7	21	3	21	6	136
Ag85b	7	6	10	15	8	60
ESAT-6	2	6	3	4	4	20

7.1.4 Predicción de epítopos de células B y Linfocitos T citotóxicos.

Todas las proteínas analizadas tuvieron epítopos de unión predichos a células B (media = 18.2; rango = 8-25) y a células T citotóxicas (media = 26.2; rango = 4-43) utilizando los servidores ABCpred y NetCTLpan1.1., respectivamente (Tabla VIII, r= 0,911, p <0,001). Sólo dos proteínas (*MAP0065* y *MAP2414c*) presentaron un número mayor de epítopos B que epítopos cT.

Tabla VIII. Número de epítopos de células B usando el servidor ABCpred y número de epítopos de células T citotóxicas usando el servidor NetCTLpan 1.1

Proteína	Epítopos de células B[a]	Epítopos de célulascT[b]
MAP0065	21	4
MAP0164	11	23
MAP0189	16	18
MAP0215	25	32
MAP0434	8	20
MAP0901	22	28
MAP2100	20	33
MAP2327	13	43
MAP2414c	32	31
MAP2499	14	30
Ag85b	10	15
ESAT-6	3	4

[a] Se estableció un valor de corte de 0.7.

[b] Se utilizaron los parámetros recomendados por el programa.

Las proteínas subrayadas poseen mayor número de epítopos de células B que epítopos de células cT.

7.1.5 Predicción de la respuesta inmune

Se identificaron 10 proteínas como potenciales candidatos para la evaluación de inmunogenicidad (Tabla IX). Cinco proteínas (*MAP0164, MAP0189, MAP0434, MAP2327* y *MAP2499*) se identificaron por tener epítopos que podrían ser candidatos potenciales para inducir respuestas de tipo celular, mientras que *MAP0215* y *MAP0901* fueron identificadas como proteínas candidatas para inducir una respuesta mediada por anticuerpos. Las 3 proteínas restantes (*MAP0065*, *MAP2100* y *MAP2414c*) tuvieron un gran número de epítopos tanto de células B, células citotóxicas y afinidad por los CMH I y II que podrían evaluarse tanto para inducir una respuesta mediada por células y anticuerpos.

Tabla IX. Proteínas candidatas seleccionadas para los estudios de respuesta inmune.

Proteína	Función	Tipo de Epítopo	Tipo de respuesta inmune
MAP0065	Probable proteína de membrana	Células T y B	Mediada por células y anticuerpos
MAP0164	Probable proteína de membrana	Células T y CMH II	Mediada por células
MAP0189	Probable proteína de membrana	CMH II	Mediada por células
MAP0215	Proteína de membrana integral	Células B	Mediada por anticuerpos
MAP0434	Posible proteína de membrana	CMH I	Mediada por células
MAP0901	Posible proteína de membrana	Células B	Mediada por anticuerpos
MAP2100	Transportador ABC	Células T, B, CMH I y CMH II	Mediada por células y anticuerpos
MAP2327	Posible proteína de membrana	Células T y CMH I	Mediada por células
MAP2414c	Proteína de tolerancia a	Células T, B, CMH I y CMH II	Mediada por células y

	metales pesados		anticuerpos
MAP2499	Transportador ABC	CMH I	Mediada por células
Ag85b	Micosil transferasa	Células T citotóxicas	Mediada por células
ESAT-6	Proteína hipotética	CMH II, células T y células T citotóxicas	Mediada por células

*Las letras en negritas indican a las proteínas con epítopos sobrelapados al CMH I and CMH II.

7.2 Análisis Fisicoquímico

7.2.1 Punto isoeléctrico, Hidrofobicidad y estructura secundaria

El análisis del punto isoeléctrico (pI) mostró a ocho proteínas con características alcalinas (*MAP0065*, *MAP0164*, *MAP0189*, *MAP0215*, *MAP0434*, *MAP2100*, *MAP2327* y *MAP2499*) y a dos proteínas con características ácidas (*MAP0901* y *MAP2414c*) (Tabla 7). El promedio general del pI fue 8.54 (rango = 4.85 a 10.83), mientras que para los alcalinos y ácidos fue de 9.23 (rango = 7.34-10.) y 5.77 (4.85-6.7), respectivamente.

La estructura secundaria estimada con los programas SCRATCH y PHYRE 2.0 reveló un promedio general de 19.1 (rango = 6-28) y 18.2 (rango = 9-32) de alfa hélices, respectivamente (Tabla X). Las láminas beta estimadas fueron en promedio 15.7 (rango = 7-28) y 6.1 (rango = 0-18) con SCRATCH y PHYRE 2.0, respectivamente.
SCRATCH estimó que *MAP2414c* y *MAP0189* tenían el mayor (n = 28) y el menor (n = 6) número de hélices alfa, respectivamente; en cambio PHYRE 2.0 determinó que *MAP2414c* tuvo el número mayor (n = 32) y *MAP0189* el número menor (n = 9) de hélices alfa. SCRATCH estimó que *MAP2414c* y *MAP0189* tenían el número mayor (n = 28) y menor (n = 7) de láminas beta, respectivamente. *MAP2414c* (n = 18) tuvo el mayor número de acuerdo con PHYRE 2.0, sin embargo, este programa no fue capaz de determinar láminas beta para *MAP0065* y *MAP0434*.

Tabla X. Análisis de punto isoeléctrico y de estructura celular usando la herramienta Compute pI/Mw del servidor ExPASy server y SCRATCH/Phyre 2.0.

		Número de estructuras			
		SCRATCH		PHYRE 2.0	
Proteína	Punto isoeléctrico	Alfa Hélice	Beta Lámina	Alfa Hélice	Beta Lámina
MAP0065	9.86	23	13	15	0
MAP0164	7.96	16	14	17	4
MAP0189	10.83	6	7	9	2
MAP0215	9.74	24	25	21	4
MAP0434	8.76	17	11	12	0
MAP0901	4.85	15	13	14	4
MAP2100	10.59	21	15	18	11
MAP2327	7.34	22	18	25	9
MAP2414c	6.70	28	28	32	18
MAP2499	8.80	19	13	19	9
Ag85b	5.33	12	11	12	9
ESAT-6	4.39	3	1	2	0

7.3 Evaluación de la transformación genética del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii.*

7.3.1 Amplificación de los genes candidatos

Se logró la amplificación de productos con tamaños aproximados de 1530 pb, 1005pb y 1761pb correspondientes a los carriles 2, 3 y 6 de los genes *MAP0164*, *MAP0189* y *MAP2100* candidatos a evaluarse. No se logró la amplificación de los genes *MAP0065*, *MAP0215* y *MAP0901* que corresponden a los carriles 1, 4 y 5 por no utilizar las temperaturas óptimas de alineamiento, mientras que los carriles 7 y 8 correspondientes a los genes *MAP2327* y *MAP3101*, respectivamente y presentaron múltiples amplicones (Figura 3).

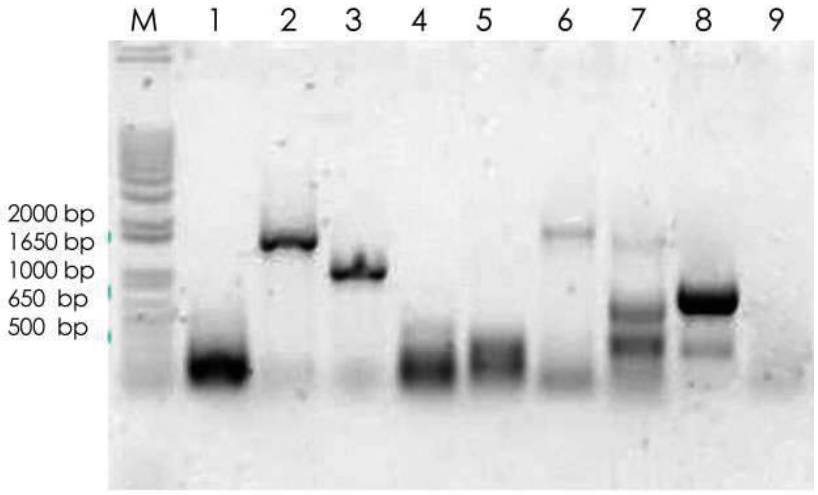

Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de los genes candidatos. M.- Marcador de peso molecular 1 Kb plus. 1.- *MAP0065*. 2.- *MAP0164* (~1530 bp) 3.- *MAP0189* (~1005 bp) 4.- *MAP0215* 5.- *MAP0901* 6.- *MAP2100* (~1761 bp) 7.- *MAP2327* 8.- *MAP310* (Control Positivo) 9.- Control Negativo

Como parte de la estrategia para clonar los genes en un vector de expresión de cloroplastos, se diseñaron los iniciadores RSS1-RSS2 que contienen el sitio de corte *Nde I* y la secuencia codificante 3x FLAG en el extremo 5' para amplificar el gen *MAP0164* con el fin de introducir sitios de corte, unir con el promotor *psbA* y el terminador *rbcL* en el vector pKM3 (Figura 16) y facilite la detección de la proteína una vez que la haya traducido *C. reinhardtii*.

Igualmente se diseñaron los iniciadores RSS3-RSS4, RSS5-RSS6, RSS7-RSS8 y RSS9-RSS10 que contienen los sitios de corte *Nde I* y *Sph I* además de la secuencia codificante 3x FLAG en el extremo 5' para la amplificación de los genes *MAP0189*, *MAP1609* (*Ag85b*), *MAP2100* y *mTagpBFP* respectivamente. En el caso de los genes *MAP0164* y *MAP0189* les fue sustituido el primer nucleótido del codón de inicio de una Guanina a una Adenina debido al uso preferente de codones de *C. reinhardtii*. Los cuales aparecen en la Tabla II.

mTagBFP fue incluida en el estudio para utilizarla como un control de cuantificación de proteínas en estudios posteriores. Este gen que codifica para la proteína azul fluorescente se obtuvo del registro de partes biológicas estándar de IGEM.

Posteriormente, se realizó la amplificación de los genes *MAP0164*, *MAP0189*, *MAP2100* y *mTagBFP* con los iniciadores que contienen la etiqueta 3x FLAG y los sitios de corte *Nde I* y *Sph I*.

Las temperaturas de alineamiento en el PCR para la amplificación de los genes fueron de 64°C para *MAP0164* y *MAP0189* mientras que para *mTagBFP* y *MAP2100* fueron de 66°C (Figura 4). Por otro lado, no se llevó a cabo la amplificación de *Ag85b* debido a que el ADN de *MAP* se encontraba degradado.

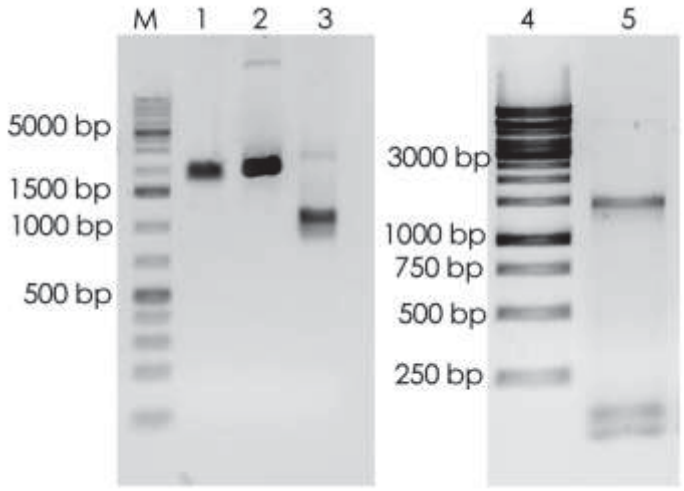

Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación de los genes candidatos con los sitios de corte *Nde I, Sph I* y el 3x FLAG. M.- Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder plus. 1.- *MAP0164* (~1608 bp) 2.- *MAP2100* (~1849 bp) 3.- *mTagBFP* (~793 bp) 4.- Marcador de Peso Molecular 1kb DNA Ladder 5.- *MAP0189* (~1100 bp).

7.3.2 Subclonación de los genes candidatos al vector pBlueScript II SK (+)

Se llevó a cabo la reacción de ligación de los genes en el plásmido pBlueScript II SK (+) (Figura 15) para obtener un número mayor de copias. Se utilizó la T4 ADN ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se incubaron a 4°C toda la noche y posteriormente se utilizaron 3 µL de la reacción de ligación para la transformación de células competentes TOP 10. Una vez seleccionadas las colonias en medio LB con resistencia a *ampicilina*, se incubaron toda la noche en 5 mL de medio LB con 50 mg/µL de *ampicilina*. Se realizó la extracción del ADN plásmidico mediante el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System y se llevó a cabo la reacción de digestión para liberar los productos.

Para el caso del gen *MAP0164*, se procedió primero a la digestión del plásmido pBlueScript II SK (+) con la enzima *EcoR V*, enseguida, se corrió en un gel de agarosa al 1%, se purificó mediante columna, se eluyó en 20 µL y se realizó la reacción de ligación.

Se transformó con células calcio-competentes al igual que el resto de los genes y se seleccionaron las colonias que contenían el inserto. Para esto, se extrajo el ADN plásmidico y se realizaron reacciones de digestión para los cuatro genes (Figura 5).

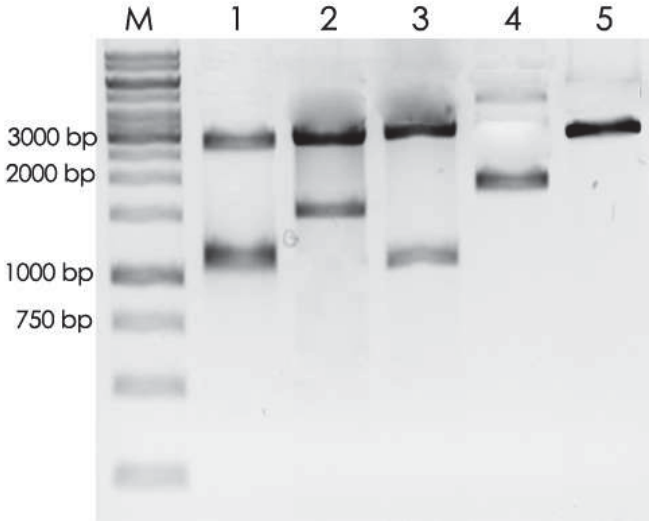

Figura 5 Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la digestión enzimática de los genes clonados en el vector pBlueScript II SK (+). M.-1 Kb DNA Ladder. 1.-*mTagBFP* (790 bp). 2.-*MAP0164* (1608 bp). 3.-*MAP0189* (1095 bp). 4.-*MAP2100* (1851 bp). 5.-pBlueScript II SK +

7.3.3 Subclonación al vector pKM3

Una vez digeridos los cuatro genes de pBlueScript II SK (+), se purificaron, se digirieron y se ligaron al vector pKM3 por separado utilizando las enzimas *Nde I* y *Sph I* para *mTagBFP*, *MAP0189* y *MAP2100* y *Nde I* para *MAP0164*. Para los primeros tres genes se llevó a cabo la ligación de la misma manera que con pBlueScript II SK (+) a pKM3. *MAP0164* a diferencia de los otros genes se ligó a un pkM3 que fue desfosforilado con una temperatura de 30 min a 37°C y la inactivación de la fosfatasa fue de 20 min a 65°C.

Ya ensamblados en el vector pKM3, los genes que no contienen sitio de corte para *BamH I* pueden ser directamente transferidos a un vector p320 (Figura 17) con gen de selección en *Pac I* utilizando los iniciadores JAB476 y JAB477.

Los que sí tienen *BamH I* pueden ser transferidos al sitio *Spe I* utilizando los iniciadores JAB354 y JAB355.

Se confirmó la introducción de los genes candidatos al vector pkM3 mediante digestión enzimática en las cuales se obtuvieron los tamaños esperados (Figura 6).

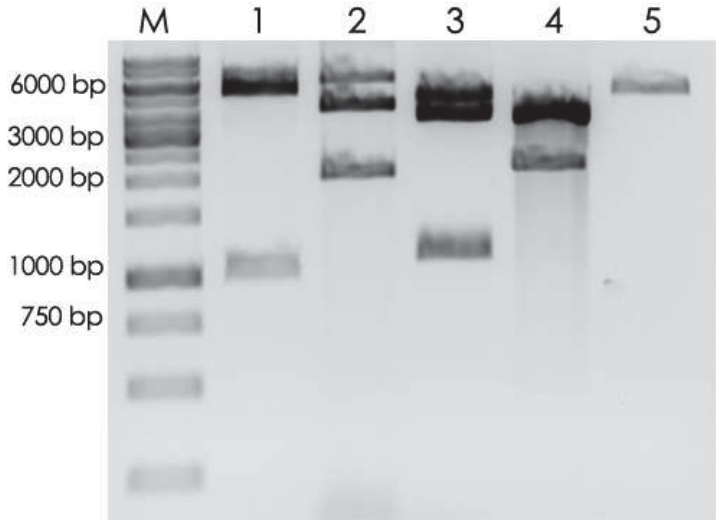

Figura 6 Digestión enzimática de los genes clonados en el vector pKM3. M.-1 Kb DNA Ladder. 1.-*mTagBFP* (790 bp). 2.-*MAP0164* (1608 bp). 3.-*MAP0189* (1095 bp). 4.-*MAP2100* (1851 bp). 5.-pKM3 (3861 bp).

7.3.4 Construcción del vector de recombinación homóloga p320.

Se llevó a cabo la amplificación de los genes *MAP2100* y *mTagBFP* con los iniciadores JAB476 y JAB477 que amplifican el promotor *psbA* y el terminador *rbcL*, estos contienen un sitio *Pac I*. Posteriormente fueron clonados en el vector pBlueScript II SK (+) para obtener un mayor número de copias y se realizó una reacción de restricción con la enzima *Pac I*, al igual que con el vector p320 (Figura 7).

Para la introducción del gen *MAP0189* con el promotor *psbA* y el terminador *rbcL* se llevó a cabo la restricción del vector MAP0189-pkM3 con la enzima *BamH I*. Enseguida se liberó el gen *aphA-6* del vector p320 con la enzima *BamH I* y así poder ligar el inserto MAP0189-pkM3 al vector p320 a través del sitio *BamH I* (Figura 7).

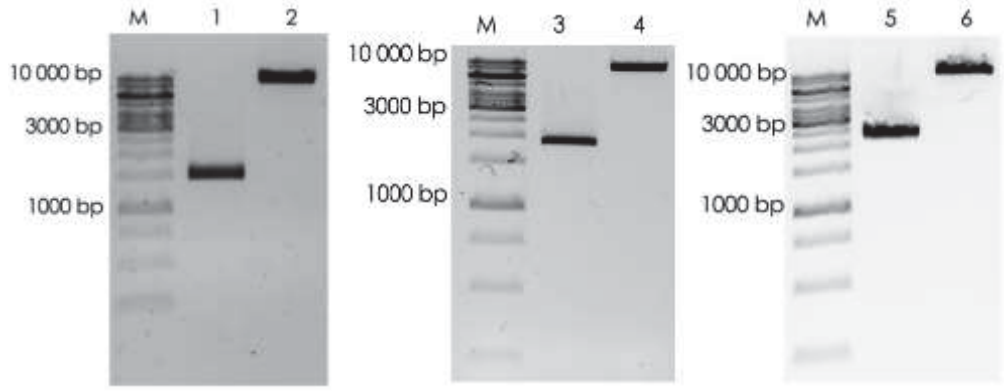

Figura 7 Purificación de genes y vectores para el ensamblaje al vector p320. M.-1 Kb DNA Ladder. 1.- *psbA-BFP-rbcL* (1528 bp). 2 y 6.- p320 (9959 bp). 3.- *psbA-0189-rbcL* (1845 bp). 4.- *psbA-2100-rbcL* (2584 bp).

Se confirmaron por restricción y secuenciación la introducción de los genes *MAP2100* y *MAP0189* en la orientación y marcos de lectura correctos al vector de expresión p320.

7.4 Transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii*

Para la transformación de las cepas de *C. reinhardtii* se hicieron cultivos líquidos bajo las condiciones ya mencionadas con el fin de alcanzar la densidad celular óptima para la transformación (Shengwu, 2008). Al término del periodo de incubación del cultivo, las células se prepararon para el bombardeo mediante una centrifugación y una sustitución de medio TAP a un menor volumen. Luego, las células se sembraron en forma de gota con un volumen de 200 µL en cajas Petri con medio TAP y la concentración correspondiente del antibiótico *Kanamicina* para las cepas que fueran transformadas con el vector 2100-p320 y *Espectinomicina* para las cepas que fueran transformadas con los vectores 0189-p320 y p228. Para todos los eventos de bombardeo se utilizaron los controles positivos y negativos y se resumen en la Tabla XI obteniendo posibles colonias transformadas.

Tabla XI. Eventos de transformación de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Vector 2100-p320			Vector 0189-p320 y p228		
Fecha del evento	Número de placas bombardeadas	Número de colonias resistentes*	Fecha del evento	Número de placas bombardeadas	Número de colonias resistentes*
12 Marzo 2015	12	0	31 Marzo 2015	8	0
16 Abril 2015	4	2	02 Abril 2015	8	3
18 Marzo 2015	5	7	27 Abril 2015	3	0
27 Abril 2015	3	14			

*El número de colonias resistentes, se refiere a aquellas colonias que prevalecieron en medio de selección al menos 45 días después de los eventos de bombardeo.

En la Figura 8 se ejemplifica el seguimiento que se le dio a las cepas posiblemente transformadas con cada uno de los vectores de transformación de cloroplasto.

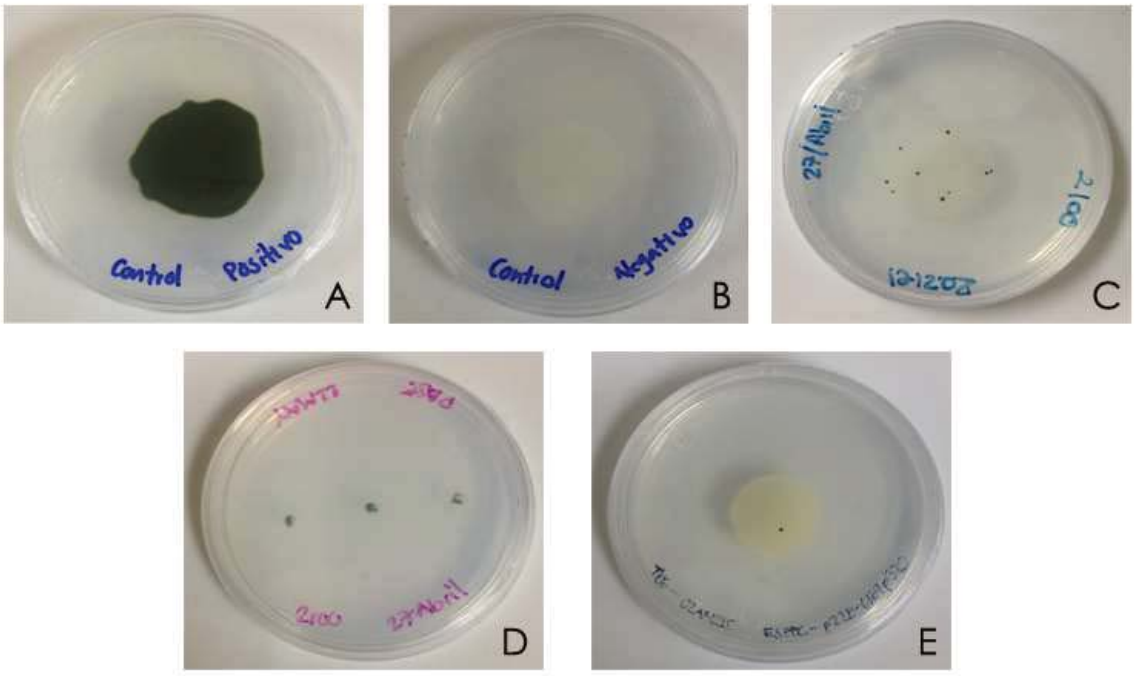

Figura 8 Progreso de las cepas posiblemente transformadas de *C. reinhardtii*. A) Control de crecimiento de *C. reinhardtii* sobre medio TAP sin antibiótico. B) Control negativo de *C. reinhardtii* sobre medio TAP con *Kanamicina*. C) Resultado de la transformación con el vector 2100-p320. D) Cepas posiblemente transformadas con el vector 2100-p320 en su primer recambio en medio TAP con *Kanamicina*. E) Resultado de la transformación con los vectores 0189-p320 y p228.

7.5 Confirmación por PCR de las cepas transformadas de *C. reinhardtii*.

Considerando que las colonias de *C. reinhardtii* presentaron resistencia al antibiótico de selección, están transformadas, se analizaron tres colonias al azar con el vector 2100-p320 y fueron sometidas a extracción de ADN por medio de Chelex al 5% y se utilizaron 2 µL como templado para la amplificación por PCR.

La amplificación del gen *aphA-6* y el fragmento *psbA*-2100-*rbcL* resultaron en fragmentos de aproximadamente 250 bp y 2500 bp respectivamente, fueron obtenidos del ADN de las colonias que fueron transformadas y cultivadas en medio que contiene el antibiótico *Kanamicina* (Figuras 9 y 10, carriles 1-3). Por otro lado, no se obtuvo amplificación del ADN de células no transformadas (Figuras 9 y 10, carriles WT y control negativo).

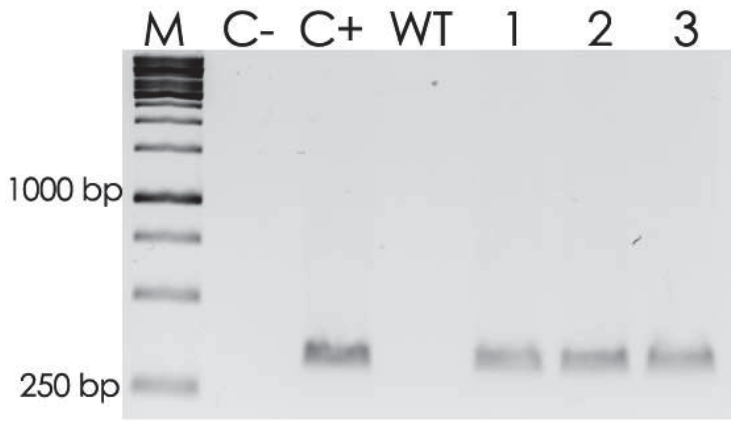

Figura 9 Amplificación por PCR del gen *aphA-6* de colonias transformadas de *C. reinhardtii*. M.- 1 Kb DNA Ladder. C-. Control negativo (Reacción de PCR sin ADN). C+. Control Positivo (Reacción de PCR con un plásmido que posee el gen *aphA-6*. WT. *C. reinhardtii* sin transformar. 1-3. Cepas de *C. reinhardtii* transformadas.

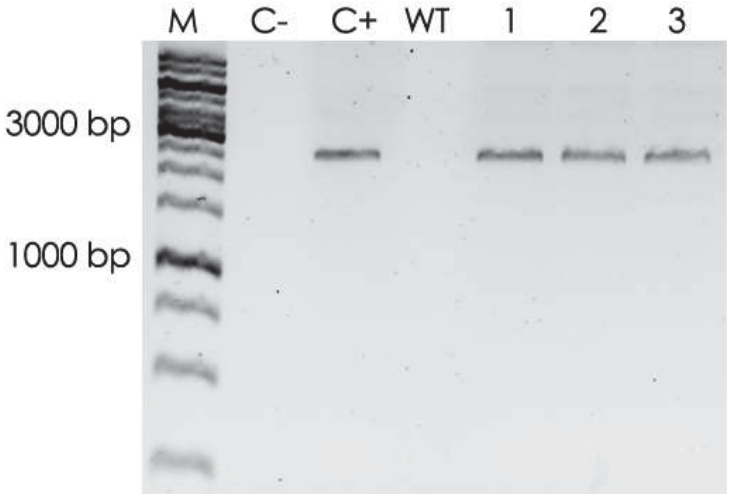

Figura 10 Amplificación por PCR del fragmento *psbA-2100-rbcL* de colonias transformadas de *C. reinhardtii*. M.- 1 Kb DNA Ladder. C-. Control negativo (Reacción de PCR sin ADN). C+. Control Positivo (Reacción de PCR con un plásmido que posee el *gen aphA-6*. WT. *C. reinhardtii* sin transformar. 1-3. Cepas de *C. reinhardtii* transformadas.

7.6 Electroforesis de proteínas en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

La expresión de las proteínas recombinantes MAP0189 y MAP2100 se llevaron a cabo utilizando la cepa de *E. coli* BL21 Star, como controles positivos de los vectores de expresión., gracias a su fácil y rápido crecimiento en cultivo líquido.

En la Figura 11 se muestra un gel de acrilamida al 12% donde se puede apreciar una sobre expresión de las proteínas recombinantes de entre 36 kDa y 75 kDa. Asimismo, se realizó la extracción de proteínas de *C. reinhardtii* que contenía el vector 2100-p320 tal y como lo muestra la Figura 12.

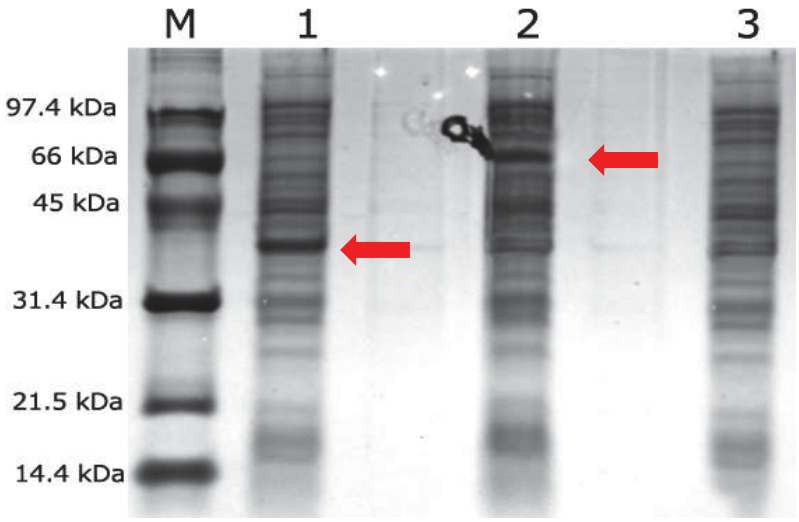

Figura 11 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para la detección de las proteínas recombinantes MAP0189 y MAP2100. M.- SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (BioRad). 1 y 2.- Extracción de las proteínas MAP0189 y MAP2100 de *E. coli* transformadas con el vector pKM3 (20 µg). 3.- Control Negativo (20 µg).

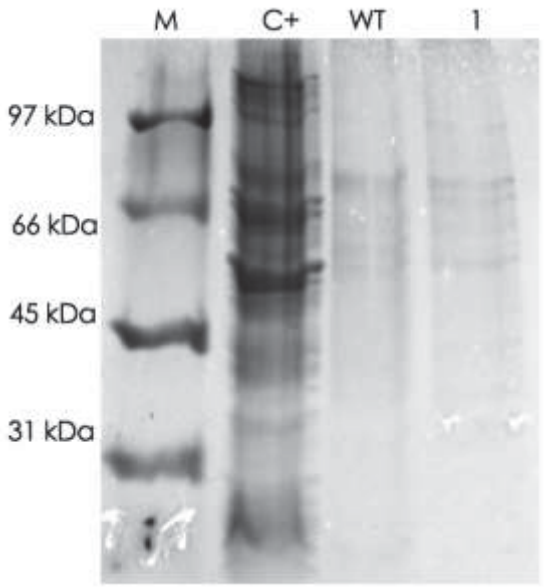

Figura 12 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% para la detección de las proteínas recombinantes MAP2100. M.- SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range (BioRad). C+.- Cepa de *E. coli* sobre expresando el gen *MAP2100*. WT.- Cepa de *C. reinhardtii* sin transformar. 1.- Cepa transformada con el vector 2100-p320.

7.7 Western blot

Se lograron detectar las proteínas recombinantes MAP0189 y MAP2100 sobre expresadas en las cepas de *E. coli* BL21 star, utilizando los anticuerpos Anti-DDDDK. En la Figura 13 se muestra la membrana de PVDF utilizada para la detección de las proteínas MAP0189 y MAP2100 utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-DDDDK. Conjuntamente, se realizó un Western blot para la detección de la proteína MAP2100 en *C. reinhardtii*, cepa que había sido demostrada que contenía el vector 2100-p320. Se obtuvieron resultados negativos ya que en la Figura 14 se muestran solo la detección de las proteínas MAP0189 y MAP2100 en las cepas de *E. coli* con el vector de expresión de estas proteínas.

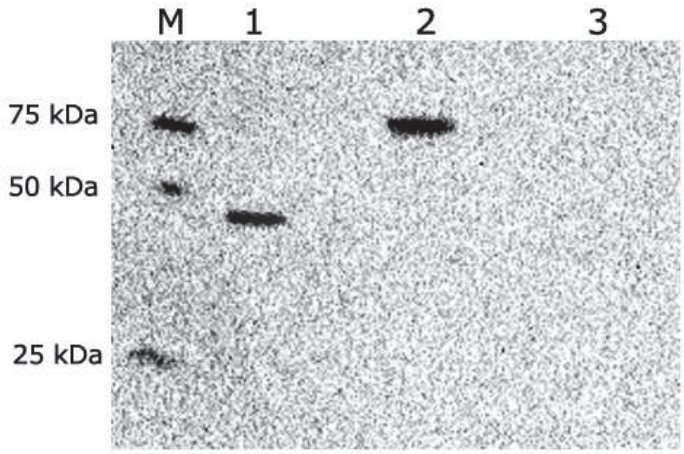

Figura 13 Membrana de PVDF usada para la detección de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* MAP0189 y MAP2100 con el anticuerpo Anti-DDDDK. M.- Precision Plus Protein WesternC Standards (BioRad). 1 y 2.- Proteínas recombinantes MAP0189 y MAP2100. 3.- Control Negativo

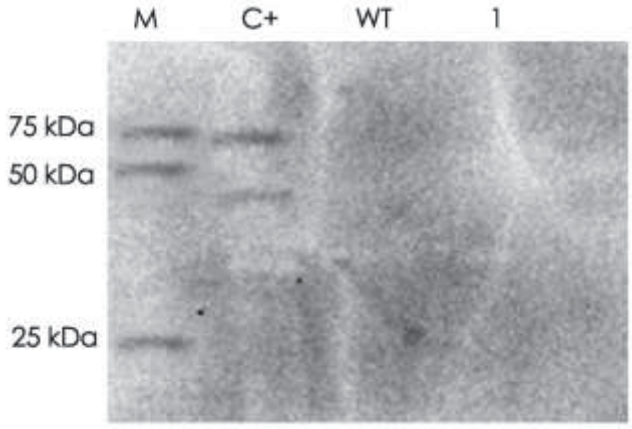

Figura 14 Membrana de PVDF usada para la detección de la proteína recombinante MAP2100 con el anticuerpo Anti-DDDDK. M.- Precision Plus Protein WesternC Standards (BioRad). C+.- Cepa de *E. coli* sobre expresando el gen MAP2100. WT.- Cepa de *C. reinhardtii* sin transformar. 1.- Cepa transformada con el vector 2100-p320.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Unión y promiscuidad al CMH

Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) son glicoproteínas de superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA) que se unen a pequeños fragmentos de péptidos y que son presentados a los linfocitos T, provocando el inicio de una respuesta inmune adaptativa (Parham, 2005). La importancia de esta interacción ha dado paso al incremento de numerosas herramientas bioinformáticas que predicen la unión de péptidos a las moléculas del CMH para el desarrollo de vacunas basadas en péptidos para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Jones *et al*., 2011; Sundaramurthi *et al*., 2012; Gurung *et al*., 2012). La mayoría de los algoritmos de predicción utilizan enfoques bioinformáticos y estadísticos basados en los datos de afinidad experimental para identificar las uniones al CMH. Sin embargo, la precisión de algunas de estas herramientas bioinformáticas ha sido reportada muy variable (Jones *et al*., 2011). ProPed es una herramienta web gráfica para la predicción de regiones de unión al CHM II en secuencias de proteínas antigénicas (Singh y Ragava, 2001) y su servidor es una herramienta útil para la localización de regiones promiscuas que se unen a varios alelos HLA-DR (Wang *et al*., 2009). Vordermeier *et al*. (2003) y Wang *et al*. (2009) demostraron la identificación de epítopos con afinidad de unión al CMH II mediante el servidor ProPed al ser reconocidos por células T de bovinos.

La selección de epítopos con una afinidad mayor al 50% de los alelos del CMH se consideran como epítopos promiscuos, ya que cubren gran parte de la población de alelos reportados (Mustafa y Shaban, 2006; Zhao *et al*., 2011; Sundaramurthi *et al*., 2012). En este estudio, se analizaron 100 secuencias nombradas como Otras proteínas de membrana de *MAP* de acuerdo con la clasificación reportada por Li *et al*. (2005), de las cuales la proteína *MAP0164* destaca porque su secuencia VVILGAIAI tuvo una promiscuidad de hasta el 96.97% de unión al CMH. Estas secuencias son clave para ofrecer inmunidad protectora contra los agentes patógenos en distintas poblaciones (Wang *et al*., 2010; Seghrouchni *et al*., 2009).

Bonecchi *et al*. (1998) indican la importancia de la identificación de epítopos de células T universales, con perfiles promiscuos de interacción con las moléculas del CMH de clase II, aumenta la posibilidad de desarrollar vacunas de sub unidades que podrían provocar respuestas inmunes en la poblaciones heterogéneas.

8.2 Localización subcelular

Existen algunos servidores como PSort capaces de predecir con mayor exactitud la localización de organismos tanto eucariotas como procariotas (Flower *et al*., 2013). La localización subcelular de proteínas ha sido un criterio importante en el desarrollo de vacunas de sub unidades, tal como lo fue para el desarrollo de la vacuna contra la meningitis *MenB* (Pizza *et al*., 2000). Los patógenos intracelulares como las micobacterias son resistentes a la destrucción por macrófagos y se multiplican dentro de estos fagocitos utilizando técnicas como la inhibición de la acidificación del fagosoma, la inhibición de la fusión del fagosoma-lisosoma y la utilización de componentes de la pared celular que pueden estar involucrados en estos procesos. Por lo tanto, las proteínas de superficie de membrana y las proteínas secretadas son de interés por su potencial como candidatos de vacunas o como blancos de diagnóstico (Rodríguez-Oretga *et al*., 2006). En este estudio, las 100 proteínas sometidas al análisis de predicción de localización subcelular fueron encontradas en Membrana, al igual que lo reporta Li *et al*., 2005.

8.3 Homología con el huésped

La similitud genética de *MAP* con otras micobacterias es una limitante en el desarrollo de pruebas de diagnóstico específico para la detección tanto de tuberculosis como paratuberculosis, ya que algunos de estos péptidos utilizados causan reacciones cruzadas que interfieren en un diagnóstico correcto (Bannantine *et al*., 2002; Barry *et al*., 2011). La exclusión de proteínas homologas entre micobacterias incrementa la posibilidad de encontrar antígenos específicos para el desarrollo de vacunas contra *MAP*. La proteína *MAP2100* comparte la menor identidad con otras micobacterias dentro de este análisis de homología, sin embargo, solo existen dos proteínas únicas de *MAP* reportadas por Li *et al*. (2005).

8.4 Predicción de la respuesta inmune

La presencia de patógenos estimula el sistema inmune del hospedero, y en el caso de *MAP* se evoca una respuesta específica contra los macrófagos infectados con este patógeno intraceluar (Stabel, 2006; Robinson *et al*., 2008). Esta incluye el rápido desarrollo de células T, principales efectores de la inmunidad mediada por células que son activadas por proteínas de superficie celular conocidas como CMH. En el 2002, Mutwiri *et al*. (2002) demostraron en ratones BALB/c que la protección en contra de *MAP* es dependiente de la inmunidad mediada por células al reconstituir las células de bazo de ratones inmunocomprometidos por la infección con *MAP*.

Las células T activadas producen IL-2, la cual ayuda a la expansión clonal de células cooperadoras T específicas CD4+ (mediada por el CMH II) y células citotóxicas CD8+ (mediada por el CMH I). Tras la activación, las células CD4+ se pueden diferenciar en subpoblaciones Th1 o Th2 basadas en la naturaleza del antígeno presentado (Coussens *et al*., 2010). En nuestro estudio se caracterizó la afinidad y el traslape de epítopos a alelos del CMH I y II, de las cuales, las proteínas *MAP0164*, *MAP0189*, *MAP0434*, *MAP2327* y *MAP2499* se identificaron por tener epítopos que podrían ser candidatos potenciales para inducir respuestas de tipo celular; mientras que *MAP0215* y *MAP0901* fueron identificadas como proteínas candidatas para inducir una respuesta mediada por anticuerpos. Las 3 proteínas restantes (*MAP0065*, *MAP2100* y *MAP2414c*) tuvieron un gran número de epítopos tanto de células B, células citotóxicas y afinidad por los CMH I y II que podrían evaluarse tanto para inducir una respuesta mediada por células como de anticuerpos. Gurung *et al.,* (2012) encontraron resultados similares y asociaron la transposición predicha de péptidos/epítopos con una posible activación de una respuesta tanto de células Th CD4+ como de Tc CD8+ durante la infección por *MAP*, lo que sugiere una posible presentación cruzada de epítopos. Por lo tanto, las proteínas seleccionadas con la transposición de CMH I y II tienen un considerable potencial para ser evaluadas como vacuna de sub unidades.

8.5 Potencial de proteínas de membrana como vacunas de sub unidades

Es bien conocido que los factores de virulencia solos o en combinación con otros componentes bacterianos son constituyentes de muchas de las formulaciones de vacunas actuales. Por esta razón, la búsqueda de factores de virulencia asociados a patógenos bacterianos es considerado un paso importante en el descubrimiento de vacunas. Las proteínas de secreción y las proteínas expuestas en la superficie de membrana externa de los patógenos son a menudo toxinas o factores de virulencia que pudieran despertar una respuesta inmune (Yongqun, 2013).

De acuerdo a los resultados de localización sub celular con el servidor Psort, las proteínas analizadas en este estudio se encuentran en la Membrana y tienen múltiples regiones transmembranales de acuerdo a la Tabla X. A pesar de que las proteínas con regiones transmembranales no son los candidatos ideales, existen reportes en los cuales la proteína MAP4336, una proteína de membrana integral de la familia de proteínas MVIN, a pesar de que no está caracterizada bioquímicamente, posee factores de virulencia en otras bacterias y por lo tanto son importantes en la patogénesis bacteriana (Carsiotis *et al*., 1989; Rudnick *et al.*, 2001).

Las proteínas MAP0189 y MAP2100 no están caracterizadas bioquímicamente. Sin embargo, la función predicha para MAP0189 de acuerdo al análisis de identidad con otras micobacterias es de Probable Proteína de Membrana, y los dominios con los que cuenta dentro de su secuencia de aminoácidos no son del todo conocidos. Por otro lado, MAP2100 tiene una función predicha de Transportador ABC, los cuales son esenciales en la viabilidad de la célula y la patogenicidad (Davidson *et al.,* 2008). Además, los datos presentados en este trabajo muestran una mayor promiscuidad a los MHC I y MHC II comparados con las proteínas del complejo Ag85b, las cuales han sido probadas en múltiples estudios y demuestran que pueden provocar una respuesta por parte del hospedero, asimismo de encontrarse en fase clínica (Bocanegra-García *et al*., 2011).

8.6 Transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii.*

Las microalgas tienen un potencial importante para la producción de moléculas de interés, tales como biocombustibles, enzimas industriales, proteínas terapéuticas y antígenos vacunales, debido a su habilidad para producir biomasa a gran escala en poco tiempo (Rasala & Mayfield., 2014). Se han logrado rendimientos de 100 µg de proteína purificada por 1 g de biomasa de alga seca (Tran *et al.,* 2009), pero la mayoría de las proteínas recombinantes producidas en *C. reinhardtii* se acumulan entre el 1 al 0.2% de la PTS (Surzycki *et al.,* 2009). Por lo que los niveles de acumulación de proteínas recombinantes en algas aún están por debajo de las alcanzadas por otros sistemas de producción (Surzycki *et al.,* 2009.

En el presente trabajo, se construyeron los vectores de expresión de los genes de *MAP* (*MAP0189* y *MAP2100*) con el fin de expresar las proteínas recombinantes en el cloroplasto de *C. reinhardtii.* A la fecha, no hay registro de la expresión de genes del complejo *Mycobacterium* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, lo cual representa una ventaja para la propuesta de producción de antígenos contra *MAP* en este modelo. Se obtuvieron varias líneas con los vectores de expresión de estos genes ya que la transformación del cloroplasto ocurre por recombinación homóloga, insertándolos de manera permanente en el cloroplasto de *C. reinhardtii*.

La expresión genética del cloroplasto es un proceso complejo que puede estar influenciado por la transcripción, procesamiento de mRNAs, splicing de mRNA, estabilidad del mRNA, y la iniciación de la traducción (Del Campo, 2009). Además de que los niveles de expresión son altamente variables en el genoma de cloroplasto de *C. reinhardtii* para cada proteína recombinante (Rasala y Mayfield, 2014).

Gimpel y Mayfield en 2013 demostraron que la mejor manera de lograr una expresión segura de los transgenes en los cloroplastos de las algas es el uso de regiones regulatorias endógenas. Dentro de las regiones regulatorias 5’ de *psbA* conservadas de diferentes especies de algas y plantas identificaron las potenciales cajas -10 y -35 dentro de los promotores del gen *psbA*. Dado que los plastidos poseen una maquinaría de traducción tipo

procariota (Surzycki *et al.,* 2009), los elementos de expresión residen típicamente inmediatamente río arriba y río debajo de la región codificante y comprenden al promotor, la región no traducida 5' (5' UTR) y la región no traducida 3' (3' UTR). El promotor determina la tasa de transcripción, el 5' UTR se encarga de las señales de inicio de la traducción (y por lo tanto determina la tasa de traducción del mRNA), y el 3' UTR es responsable para determinar la estabilidad del mRNA. A la fecha, el promotor y la región 5' UTR del gen *psbA* han mostrado los niveles más altos de acumulación de proteína heteróloga no fusionada (Manuell *et al.,* 2007a; Surzycki *et al.,* 2009; Rasala *et al*., 2010). Sin embargo, aunque en este estudio se confirmó la inserción del gen MAP2100 en el genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii*, no se logró la detección de la proteína MAP2100. Sin embargo, la construcción con el promotor psbA y el terminador rbcL endógenos de *C. reinhardtii* resultó funcional en *E. coli* ya que el promotor *psbA* ya había sido utilizado en la expresión de genes foráneos en *E. coli* obteniendo un rendimiento del 18.5 veces más que con el promotor T7 en este sistema bacteriano (Brixey y Daniell, 1997).

Existen varias razones por las cuales la proteína MAP2100 no pudo ser detectada. Una de ellas es que para obtener mejores rendimientos de proteínas recombinantes es necesario hacer mejoras en la optimización de codones (Franklin et al., 2002; Surczyki *et al.,* 2009). Está bien establecido que los genomas de diferentes organismos emplean la preferencia de codones para optimizar y regular la expresión de proteínas (Gustafsson *et al*., 2004). En genomas procariotas, tales como los cloroplastos de microalgas, el uso de codones es el determinante más importante de la expresión de proteínas ((Lithwick and Margalit, 2003; Surzycki *et a*l., 2009), y el ajuste de transgenes es necesario para un alto nivel de expresión (Franklin *et al*., 2002; Mayfield *et al*., 2003; Mayfield and Schultz, 2004).

MAP quien forma parte del complejo de *Mycobacterium*, es un miembro de las bacterias Gram + con un alto contenido de G+C del 69.30%. Esta riqueza en guaninas y citosinas se ve reflejada en una preferencia fuerte por el uso de estos nucleótidos hacia el final de los codones para cada aminoácido. Sin embargo, hay una variación significante en el patrón de uso de codones entre genes, el cual parece estar asociado con los niveles de expresión (Andersson y Sharp, 1996). Eichler-Stahlberg y colaboradores en 2009 incrementaron los

niveles de expresión del gen RBCS2 de cloroplasto de *C. reinhardtii* en recombinantes de luciferasa y eritropoietina arriba del 400% comparado con los niveles básicos. Otro ejemplo de ello fueron los altos niveles de expresión conseguidos en el cloroplasto de *C. reinhardti*i al optimizar los codones de los genes reporteros *GFP* y *luxCt* (Franklin et al., 2002, Mayfield and Schultz 2004).

El gen *MAP2100* que fue seleccionado en este estudio para insertarse en el genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* y que codifica para un transportador ABC tiene un contenido de G+C del 70.80%. Esto sugiere que los tRNAs del cloroplasto de *C. reinhardtii* se encuentran limitados a reconocer los tripletes de codones de MAP, debido a que el cloroplasto de *C. reinhardtii* tiene una preferencia por Adeninas y Timinas (Morton, 1996).

Otra posible explicación por la cual la proteína recombinante no fue detectada es que un número de productos génicos del cloroplasto de *C. reinhardtii* regulan la traducción de su propio mRNA a través de la inhibición por retroalimentación (Wostrikoff *et al*., 2004; Minai *et al.,* 2006). *psbA* codifica a la proteína D1 del Centro de Reacción del Fotosistema II, una de las proteínas mayormente expresadas en el plastido. La presencia de la proteína D1 sugiere que regula negativamente la expresión de los elementos regulatorios de *psbA*, un proceso que se ha referido como un control por epistasia de síntesis (Choquet & Wolllman, 2002). Rasala y colaboradores en 2011 lograron los niveles más altos de acumulación de proteína heteróloga utilizando la región no traducida 5' (UTR) y el promotor de *psbA* en cepas con un fondo genético deficientes de *psbA*, debido a la auto atenuación dependiente de *psbA*/D1. Para lograr esto, es necesario, reemplazar *psbA* por recombinación homóloga al introducir el nuevo vector, dejando que la cepa de *C. reinhardtii* sea incapaz de crecer realizando fotosíntesis. Una vez que la cepa produzca la proteína heteróloga, es necesaria la reintroducción de la secuencia codificante de *psbA* bajo el control de un promotor menos robusto como *psbD* y la región no traducida 5' UTR (psbD-psbA) para que lleve a niveles reducidos a la proteína D1, pero aun así permita el crecimiento fotosintético y la acumulación de transgenes en altos niveles (Manuell et al., 2007).

Por otro lado, Barnes y colaboradores en 2005 observaron grandes diferencias en la acumulación de transcritos (3-5 veces más) para las construcciones con el gen reportero *GFP* utilizando distintos 3' UTRs de Chlamydomonas, entre ellos *atpA, psbA* y *rbcL*. Sin embargo, no hay una correlación estricta entre la acumulación de mRNA y proteína en los cloroplastos de *C. reinhardtii* ((Eberhard *et al.,* 2002; Kato *et al.,* 2006; Rasala *et al.,* 2011). Esta falta de correlación entre la transcripción y la traducción ha sido explicada por la prevalencia de mecanismos regulatorios transcripcionales y traduccionales que son generalmente específicos para cada gen por lo que se desconoce cuáles son para el gen *MAP2100*.

En el caso de una posible extracción pobre de proteínas de los cultivos de *C. reinhardtii* existen algunos métodos que se pudieran aplicar para superar esto. En *C. reinhardtii* la degradación proteolítica es uno de los factores principales que afectan el rendimiento de proteínas recombinantes (Surzycki *et al.,* 2009). Hay diferentes estrategias que se siguen para evitar este problema. Una de ellas es dirigir la proteína al Retículo endoplásmico, ya que ahí hay muy pocas proteasas (Conrad y Fiedler, 1998), la segunda trata sobre la co expresión de inhibidores de proteasas usando secuencias KDEL o HDEL como se utilizan en plantas (Van der Vyver *et al.,* 2003). O bien el uso de inhibidores de proteasas y el procesamiento de la biomasa a 4°C para la extracción de las proteínas.

A pesar que se ha demostrado que el promotor psbA y el terminador rbcL han mostrado buenos niveles de expresión, no se garantiza que en el cloroplasto de *C. reinhardtii* tenga los mismos niveles de acumulación, como ha pasado con otros promotores de genes endógenos de alta expresión (Wang *et. al.,* 2008). Es necesario comprobar que el mRNA tiene estabilidad en el cloroplasto y que no exista una autoregulación de los mRNAs del gen de interés. Esto es posible generando una cepa deficiente de *psbA* la cual permitirá la producción de proteína recombinante en altas cantidades. Al mismo tiempo, la fusión de proteínas expresadas pobremente a proteínas expresadas estables ha demostrado un incremento en la acumulación en las primeras en sistemas de expresión como el cloroplasto (Muto *et al.,* 2009).

IX. CONCLUSIONES

El uso de herramientas inmuno informáticas para la detección de genes con potencial para evaluarse como vacunas contra *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, permitió la selección de los genes *MAP0164*, *MAP0189* y *MAP2100*. A partir de esta selección, se construyeron los vectores de transformación para realizar la inserción genética del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* con los genes *MAP0189* y *MAP2100* en el vector p320. Posteriormente, se logró determinar la presencia del gen de interés *MAP2100* en el cloroplasto de *C. reinhardtii* pero no así la presencia de la proteína.

X. PERSPECTIVAS

Determinar la presencia del ARN mensajero de los genes seleccionados.

Sintetizar los genes con potencial a evaluarse utilizando la preferencia de codones del cloroplasto de *C. reinhardtii*.

Introducir otros elementos de regulación para su comparación con los descritos en este estudio. Esto generaría conocimiento sobre la estandarización de otras regiones 5'UTR y/o 3' UTR en el cloroplasto del *C. reinhardtii.*

Generar cepas deficientes de *psbA*

Evaluar otros métodos de extracción de proteínas utilizando inhibidores de proteasas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Awale M. M., S. K. Mody, G. B. Dudhatra, Avinash Kumar & H. B. Patel. 2012. Transgenic Plant Vaccine: A Breakthrough in Immunopharmacotherapeutics. J Vaccines Vaccin 3:147.

Bagnoli F., M. Moschioni, C. Donati, V. Dimitrovska, I. Ferlenghi, C. Facciotti, A. Muzzi, F. Giusti, C. Emolo, A. Sinisi, M. Hilleringmann, W. Pansegrau, S. Censini, R. Rappuoli, A. Covacci, V. Masignani & M. A. Barocchi. 2008. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. J. Bacteriol. 190: 5480–5492.

Bannantine J. P., E. Baechler, Q. Zhang, L. Li & V. Kapur. 2002. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. Journal of Clinical Microbiology 40, 1303–1310.

Barry C., D. Corbett, D. Bakker, P. Andersen, J. McNair & S. Strain. 2011. The Effect of *Mycobacterium avium* Complex Infections on Routine *Mycobacterium bovis* Diagnostic Tests. Vet Med Int 145092

Bartram J., G. Rees, A. Dufor, J. A. Contruvo (eds.). World Health Organization. *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*. IWA Publishing, London UK, pp: 74- 94. http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/pathmycobact/en/ (Accesado 07 de Agosto de 2014, hora 4:20).

Behr M. A., D. M. Collins (Eds.) Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. 1st. CABI, Wallingford, UK; 2010: 10–21.

Bocanegra-García, V., J. Valencia-Delgadillo, W. Cruz-Pulido, R. Cantú-Ramírez, G. Rivera-Sánchez, J. P. Palma-Nicolás. 2011. De la genética a la genómica en el diseño de nuevas vacunas contra la tuberculosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica **29**(08): 609-614.

Bonecchi R., G. Bianchi, P. P. Bordignon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P. A. Gray, A. Mantovani & F. Sinigaglia. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. J. Exp. Med.187**:**129-134.

Boynton J. E., N. W. Gillham, E. H. Harris, J. P. Hosler, A. M. Johnson, A. R. Jones, B. L. Randolph-Anderson, D. Robertson, T. M. Klein & K. B. Shark. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. Science 240(4858): 1534-1538.

Buergelt C. D., C. Hall., K. Mcentee., & J. R. Duncan. 1978. Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. Veterinary Pathology, v.15, pp. 196-207.

Carsiotis, M., B. A. Stocker, D. L. Weinstein, and A. D. O'Brien. 1989. A *Salmonella typhimurium* virulence gene linked to *flg*. Infect. Immun. 57:3276–3280.

Chapman J. 1977. The atypical mycobacteria and human mycobacteriosis. Plenum Publishing Corp 1st ed., New York. 200p.

Chávez G. G., F. J. Trigo Tavera, P. Svastova & I. Pavlik. 2004. Identificación del polimorfismo genético de aislamientos de Mycobacterium avium subespecie paratuberculosis de caprinos del centro de México. Veterinaria México, num. enero-marzo, pp. 1-7.

CONASA. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. 2010. Plan estratégico del programa para la atención de la Paratuberculosis en ganado bovino, ovino y caprino en México. Coyoacán, D.F. Disponible en: http://www.conasamexico.org.mx/conasa/pdf/20101007-Programas%20especiales%20a%20solicitud%20de%20la%20SAGARPA.-%20Avance.pdf (Accesado 08 Abril 2013).

Coussens P., E. A. Lamont, E. Kabara & S. Sreevatsan. 2010. Host-Pathogen Interactions and Intracellular Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. Behr, M. A.,

Collins, D. M. (eds). Paratuberculosis organism, control, disease. CABI, Wallingford, UK. 17, pp.

Davies M. N. & D. R. Flower. 2007. Harnessing bioinformatics to discover new vaccine. Drug Discov Today 12:389–95.

Davidson, A. L., Ellie D., Cedric O. & Jue C. 2008. Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette System. Microbiology and Molecular Biology Reviews 72-2:317-364.

Del Campo, E. M. 2009. Post-Transcriptional Control of Chloroplast Gene Expression. Gene Regulation and Systems Biology, *3*, 31–47.

Demurtas O. C., S. Massa, P. Ferrante, A. Venuti, R. Franconi & G. Giuliano. 2013. A *Chlamydomonas*-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection. PLoS ONE 8(4): e61473.

Estévez D. I., R. C. Hernández, A. M. Trujillo, G. Chávez. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in goat and sheep flocks in Mexico. Small Ruminant Research 72:209–213.

Falkinham J.O. 3rd. 2002. *Nontuberculous mycobacteria* in the environment. Clinics in Chest Medicine. 23(3), 529–551.

Fleischmann R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty & J. M. Merrick. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269(5223): 496-512.

Florou M., L. Leontides, P. Kostoulas, C. Billinis, M. Sofia, I. Kyriazakis, & F. Lykotrafitis. 2008. Isolation of M*ycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from non-ruminant wildlife living in the sheds and on the pastures of Greek sheep and goats. Epidemiology and Infection 136, 644–652.

Flower D. R. & Y. Perrie. 2013. Identification of Candidate Vaccine Antigens *In Silico*. Immunomic Discovery of Adjuvants and Candidate Subunit Vaccines. Springer New York. 5: 39-71.

Giuliani M. M., J. Adu-Bobie, M. Comanducci, B. Arico, S. Savino, L. Santini, B. Brunelli, S. Bambini, A. Biolchi, B. Capecchi, E. Cartocci, L. Ciucchi, F. Di Marcello, F. Ferlicca, B. Galli, E. Luzzi, V. Masignani, D. Serruto, D. Veggi, M. Contorni, M. Morandi, A. Bartalesi, V. Cinotti, D. Mannucci, F. Titta, E. Ovidi, J. Anne Welsch, D. Granoff, R. Rappuoli & M. Pizza. 2006. A universal vaccine for serogroup B *meningococcus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(29):10834–10839.

Goodfellow M. & T. Cross. 1984. Classification. In Goodfellow, Mordarsky and Williams (editors). The Biology of the Actinomycetes. Academic Press, London pp 7-164.

Gozar M. M., V. L. Price & D. C. Kaslow. 1998. *Saccharomyces cerevisiae*-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies in mice. Infect Immun 66: 59–64.

Grant I. R., A. G. Williams, M. T. Rowe & D. D. Muir. 2005. Efficacy of various pasteurization time–temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Applied and Environmental Microbiology. 71, 2853–2861.

Gregory J. A., F. Li., L. M. Tomosada, C. J. Cox, A. B. Topol, J. M. Vinetz & S. Mayfield. 2012. Algae-produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. PLoS One. 7(5): 37179.

Grimm S. K. & M. E. Ackerman. 2013. Vaccine design: emerging concepts and renewed optimism. Curr Opin Biotechnol.

Guan Z., B. Guo, Y. Huo, Z. Guan, J. Dai, & Y. Wei. 2013. Recent advances and safety issues of transgenic plant-derived vaccines. Applied Microbiology and Biotechnology, 97(7), 2817–40.

Gurung R. B., A. C. Purdie, D. J. Begg, & R. J. Whittington. 2012. *In silico* identification of epitopes in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proteins that were upregulated under stress conditions. Clin Vaccine Immunol, *19*(6), 855–864.

Hall L. M., K. B. Taylor & D. D. Jones. 1993. Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Gene 124:75–81.

Hermon-Taylor J. & F. A. K. El-Zaatari. 2004. The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease. World Health Organization. *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*. IWA Publishing, London UK, pp: 74-94. http://who.int/water_sanitation_health/emerging/en/patmycrobact6.pdf (Accesado 07 de Agosto de 2014, hora 4:20).

Horsburgh C. R. Jr., D. P. Chin, D. M. Yajko, P. C. Hopewell, P. S. Nassos, E. P. Elkin, W. K. Hadley, E. N. Stone & P. Gonzalez. 1994. Environmental risk factors for acquisition of *Mycobacterium avium* complex in persons with human immunodeficiency virus infection. J. Infect. Dis. 170, 362-367.

Jaimes N., M. A. Santillán, O. A. Hernández, D. Córdova, C. C. Guzmán, B. Arellano, E. Díaz, V. R. Tenorio & A. Cuéllar. 2008. Detección de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis,* por medio de PCR-anidada a partir de muestras de heces de ovinos. Veterinaria México*. 39(4):377-386.*

Jones G. J., F. Bagaini, R. G. Hewinson & H. M. Vordermeier. 2011. The use of binding-prediction models to identify *M. bovis*-specific antigenic peptides for screening assays in bovine tuberculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology. 141: 239–45.

Kaslow D. C., I. C. Bathurst, S. N. Isaacs, D. B. Keister, B. Moss & P. J. Barr. 1992. Induction of *Plasmodium falciparum* transmission-blocking antibodies by recombinant Pfs25. Mem Inst Oswaldo Cruz 87 Suppl 3: 175–177.

Kawamura Y., Y. Li., H. Liu., X. Huang., Z. Li. & T. Ezaki. 2001. Bacterial population in Russian space station 'Mir'. Microbiology and Immunology. 45, 819–828.

Kim D. H., Y. T. Kim, J. J. Cho, J. H. Bae, S. B. Hur, I. Hwang & T. J. Choi. 2002. Stable integration and functional expression of Xounder growth hormone gene in transformed microalge, *Chlorella ellipsoidea*. Mar Biotechnol. 4:63–73.

Koop H-U., H. Stefan, G. Timothy J & N. Jorg. 2007. The genetic transformation of plastids. Topics in current genetics, vol 19: cell and molecular biology of plastids. Berlin/Heidelberg: Springer. pp. 457–510.

Kuehnel M. P., R. Goethe, A. Habermann, E. Mueller, M. Rohde, G. Griffiths & P. Valentin-Weigand. 2001. Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. Cellular Microbiology.3, 551–566.

Kyte J. & R. F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol. May 5;157(1):105-32.

Lambrecht R. S., J. F. Carriere & M. T. Collins. 1988. A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. Applied and Environmental Microbiology.54, 910–916.

Lambretch R. S. & M. T. Collins. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* factors that influence mycobactin dependence. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Vol 15(3): 239-246.

Li L., J. P. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. J. May, D. Alt, N. Banerji, S. Kanjilal & V. Kapur. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 102 (35): 12344–9.

Mackintosh C. G. & J. F. Griffin, 2010. Paratuberculosis in Deer, Camelids and Other Rumiants. Behr, M. A. y Collins, D. M. (eds). Paratuberculosis organism, control, disease. CABI, Wallingford, UK. 9, pp.

Manning E. J. B., M. & T. Collins, 2010. Epidemiology of Paratuberculosis. Behr, M. A. y Collins, D. M. (eds). Paratuberculosis organism, control, disease. CABI, Wallingford, UK. 7, pp.

Manuell A. L., M. V. Beligni, J. H. Elder, D. T. Siefker, M. Tran, A. Weber, T. L. McDonald & S. P. MayWeld. 2007. Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. J Plant Biotechnol.5:402–412.

Matlova L., L. Dvorska, W. Y. Ayele, M. Bartos, T. Amemori & I. Pavlik. 2005. Distribution of *Mycobacterium avium* complex isolates in tissue samples of pigs fed peat naturally contaminated with mycobacteria as a supplement. Journal of Clinical Microbiology. 43, 1261–1268.

Morón C. F .J., R. C. Cortez, S. J. Gallegos, S. B. Figueroa, P. G. Aquino, O. A. Amante 2013. Prevalencia de la infección por *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* en rebaños de ovinos de dos municipios de San Luis Potosí, México. Revista Científica FCV-LUZ. 23(4):293:299.

Mustafa A. S. & F. A. Shaban. 2006. ProPred analysis and experimental evaluation of promiscuous T-cell epitopes of three major secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) 86(2):115–124.

Muto M., R. E. Henry & S. P. Mayfield. 2009. Accumulation and processing of a recombinant protein design as a cleavable fusion to the endogenous Rubisco LSU protein in Chlamydomonas chloroplast. BMC Biotechnol, 9. 26.

Mutwiri G. K., S. Rosendal, U. Kosecka, J.A. Yager, M. Perdue, D. Snider & D. G. Butler. 2002. Adoptive transfer of BALb/c mouse splenocytes reduces lesion severity and induces

intestinal pathophysiologic changes in the *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* beige/scid mouse model. Comp Med. Aug; 52(4):332-41.

Nabel G. J. 2013. Designing Tomorrow's Vaccines. New England Journal of Medicine 368(6): 551-560.

Nielsen S. S. & N. Toft. 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. Preventive Veterinary Medicine. 88, 1–14.

Okura H., S. S. Nielsen & N. Toft, 2010. Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in adult Danish non-dairy cattle sampled at slaughter. Preventive Veterinary Medicine. 94, (3-4) pp. 185-190.

Palomares L. A., S. Estrada-Mondaca & O. T. Ramirez. 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. Methods Mol Biol 267: 15-52.

Parham P. 2005. Inmunología. Editorial Médica Panamericana 2a ed.

Pratheesh P. T. & G. Muraleedhara Kurup. 2013. Molecular cloning and expression of TB antigen protein in microalga *Chlamydomonas reinhardtii.* Indian Journal of Biotechnology Vol 12, pp 350-355.

Payeur J. B. 2005. 8ICP. Current culture methods for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Disponible en: http://www.paratuberculosis.info/web/images/stories/pdfs/173 (08 Abril 2013).

Pizza M., V. Scarlato, V. Masignani, M. M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G.T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, C. L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broeker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D. W. Hood, A. C. Jeffries, N. J. Saunders, D. M. Granoff, J. C. Venter, E. R. Moxon, G. Grandi & R. Rappuoli. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. Science 287(5459):1816–1820.

Rasala B. A. & S. P. Mayfield. 2011. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii* as a platform for the production of human protein therapeutics. Bioeng Bugs. 2(1): 50-54.

Rasala B. A., M. Muto, J. Sullivan & S. P. Mayfield 2011. Improved heterologous protein expression in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii through promoter and 5' untranslated region optimization. Plant Biotechnol J. 9(6):674-83

Rasala, B. A. & S. P. Mayfield. 2014. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. Photosynth Res (3):227-39.

Richter E., J. Wessling, N. Lügering, W. Domschke & S. Rüsch-Gerdes. 2002. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Infection in a Patient with HIV, Germany. Emerg Infect Dis *8*(7), 729–731.

Robinson M., R. O'Brien, C. Mackintosh & F. Griffink. 2008. Differential Immune Responses of Red Deer (*Cervus elaphus*) following Experimental Challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Clin. Vaccine Immunol*.,* 15(6): 963.

Rodríguez-Ortega M. J., N. Norais, G. Bensi, S. Liberatori, S. Capo, M. Mora, M. Scarselli, F. Doro, G. Ferrari, I. Garaguso, T. Maggi, A. Neumann, A. Covre, J. L. Telford, & G. Grandi. 2006. Characterization and identification of vaccine candidate proteins through analysis of the group A Streptococcus surface proteome. Nat Biotechnol, 24(2): 191-7.

Rudnick, P. A., T. Arcondeguy, C. K. Kennedy, and D. Kahn. 2001. *glnD* and *mviN* are genes of an essential operon in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 183:2682–2685.

Sambrook J., Cloning and sequencing. 2001. Sambrook J., Russell D.W. (Eds.), Molecular cloning - a laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sanford J. C., F. D. Smith & J. A. Russell. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications, Methods Enzymol 217, 483-509.

Santema, W. J., J. Poot, R. P. Segers, D. J. Van den Hoff, V. P. Rutten, & A. P. Koets. 2012. Early infection dynamics after experimental challenge with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in calves reveal limited calf-to-calf transmission and no impact of Hsp70 vaccination. Vaccine, *30*(49), 7032–7039.

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Laboratorios autorizados para el diagnóstico de la paratuberculosis. Disponible en: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:kVXuCm5GRqAJ:www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp%3FIdDocumento%3D16005%26IdUrl%3D53220+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx (accesado 08 Abril 2013).

Seghrouchni F, S. Contini, R. Markova, R. Drenska, K. Sadki, L. Baassi, Y. Todorova, V. Terzieva, M. Bocchino, G. Cappelli, A. M. Altieri, M. G. Alma, A. Benjouad, F. Mariani, B. Petrunov, V. Colizzi, R. El Aouad, C. Saltini & M Amicosante. 2009. Design of immunogenic peptides from M*ycobacterium tuberculosis* genes expressed during macrophage infection. Tuberculosis 89: 210–7.

Singh H. & G. P. Raghava. 2001. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. Bioinformatics 17(12): 1236-1237.

Singh S. V., A. V. Singh, P. K. Singh, A. Kumary & B. Singh. 2011. Molecular identification and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free living non-human primate (*Rhesus macaques*) from North India. Comparative Immunology, Microbiology and Infection Diseases. *Diseases*. 34, 267-271.

Stabel J. R. 2006. Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim Health Res Rev*. Jun-Dec; 7 (1-2):61-70.

Sun M., K. X. Qian, N. Su, H. Y. Chang, J. X. Liu, & G. F. Chen. 2003. Foot- and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol. Lett.* 25, 1087–1092.

Sundaramurthi J.C., S. Brindha, S. R. Shobitha, A. Swathi, P. Ramanandan & L. E. Hanna .2012. *In silico* identification of potential antigenic proteins and promiscuous CTL epitopes in Mycobacterium tuberculosis. Infection, Genetics and Evolution.12: 1312–18.

Surzycki R., K. Greenham, K. Kitayama, F. Dibal, R. Wagner, J-D. Rochaix, T. Ajam, & S. Surzycki. 2009. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. Biologicals 37:133–138

Sturniolo T., E. Bono, J. Ding, L. Raddrizzani, O. Tuereci, U. Sahin, M. Braxenthaler, F. Gallazi, M. P. Protti, F. Sinigaglia & J. Hammer. 1999. Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. Nat Biotechnol 17(6): 555-561.

Thorel M. F., P. Pardon, K. Irgens, J. Marlyy & P. Lechopier. 1984. Paratuberculos eexpérimentale: pouvoir pathogènechez le veau de souches de Mycobactéries mycobactine dépendantes. *Annales Recherche Vétérinaire.* 15, 365–374.

Tran M., B. Zhou, P. L. Pettersson, M. J. Gonzalez & S. P. Mayfield. 2009. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. Biotechnol Bioeng 104:663–673.

Turenne C. Y. & D. C. Alexander. 2010. *Mycobacterium avium* complex. Behr, M. A., Collins, D. M. (eds). Paratuberculosis organism, control, disease. CABI, Wallingford, UK. 11, p.p.

USDA. United States Department of Agriculture. 2008. Disponible en: http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/0230325-bovine-immunity-to-m-paratuberculosis-infection-the-role-of-regulatory-t-cells.html (accesado 08 Abril 2013).

Uzonna J. E., P. Chilton, R. H. Whitlock, P. L. Habecker, P. Scott & R. W. Sweeney. 2003. Efficacy of commercial and field-strain *Mycobacterium paratuberculosis* vaccinations with recombinant IL-12 in a bovine experimental infection model. *Vaccine*. 21 (23). pp. 3101-9.

Verma D. & H. Daniell. 2007. Chloroplast vector systems for biotechnology applications. Plant Physiol. 145(4): 1129-1143.

Vordermeier M, A., O. Whelan & R. G. Hewinson. 2003. Recognition of mycobacterial epitopes by T cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. Infect Immun 71:1980.

Walker T. L., S. Purton, D. K. Becker & C. Collet. 2005. Microalgae as bioreactors. Plant Cell Reports, *24*(11), 629–41.

Wang C., Y. Wang, Q. Su & X Ga. 2007. Transient Expression of the GUS Gene in a Unicellular Marine Green Alga, Chlorella sp. MACC/C95, via Electroporation. Biotechnology and Bioprocess Engineering 12(2): 180-183.

Wang X., M. Brandsma, R. Tremblay, D. Maxwell, A. M. Jevnikar, N. Huner & S. Ma. 2008. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). BMC Biotechnol 8: 87.

Wang H. H., W. B. Yin & Z. M. Hu. 2009. Advances in chloroplast engineering. J. Genet. Genomics. 36 387−398.

Wang L. X., T. Nagata, K. Tsujimura, M. Uchijima, S. Seto & Y. Koide. 2010. Identification of HLA-DR4-restricted T-cell epitope on MPT51 protein, a major secreted protein derived from Mycobacterium tuberculosis using MPT51 overlapping peptides screening and DNA vaccination. Vaccine 28:2026–31.

Wayne L. G. & G. P. Kubica, 1986. The mycobacteria. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds). Baltimore: Williams & Williams. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2, pp. 1435-1457.

Whan L., I. Grant & M. Rowe. 2006. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and environmental protozoa. BMC Microbiology. 6, 63.

Whittington R. J. 2010. Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *In* M. A. Behr and D. M y Collins (ed.), Paratuberculosis. Organism, disease, control. CABI, Wallingford, UK pp. 244–266.

WAHID. World Animal Health Information Database. 2012. Disponible en: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap (accesado 08 Abril 2013).

Wigdorovitz A., C. Carrillo, M. J. Dus Santos, K. Trono, A. Peralta & M. C. Gómez, M. C. 1999. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. Virology 255, 347–353.

Yamasaki T., S. Kurokawa, K. I. Watanabe, K. Ikuta & T. Ohama. 2005. Shared molecular characteristics of successfully transformed mitochondrial genomes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol Biol. 58(4): 515-527.

Yongqun, He. 2013. Genome Based Computational Vaccine Discovery by Reverse Vaccinology. Darren R, Flower, Yvonne Perrie (eds). Immunomic Discovery of Adjuvants and Candidate Subunit Vaccines. Springerlink, Birmingham, UK. 91, pp.

Zhao B.P., L. Chen, Y. L. Zhang, J. M. Yang, K. Jia, C. Y. Sui, C. X. Yuan, J. J. Lin & X. G. Feng. 2011. *In silico* prediction of binding of promiscuous peptides to multiple MHC class-II molecules identifies the Th1 cell epitopes from secreted and transmembrane proteins of *Schistosoma japonicum* in BALB/c mice. Microbes Infect 13(7): 709-19.

XII. ANEXOS

11.1 Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados mediante autoclave a 15 lb de presión durante 20 min.

Medio Middlebrook 7H9.

De acuerdo al volumen de cultivo de la bacteria se adicionó Medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ), complementado con 10% de albúmina-dextrosa-catalasa (ADC) enriquecido (Becton Dickinson) y micobactina J (Allied Monitor, Inc., Fayette, MO).

Medio Luria-Bertani (LB).

Se empleó para el crecimiento de *E. coli Top10F.*

Triptona de caseína	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	5 g/L

El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 1N. En el caso de requerirse sólido se añadieron 8 g/L de agar bacteriológico.

Medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato)

Se empleó para el crecimiento de *C. reinhardtii*.

Tris	2.42 g/L
Solución de Sales	25 mL
Solución de Fosfatos	374 µL
Elementos traza de Hunter´s	1 mL
Ácido acético glacial	1 mL

Solución de Sales

NH_4Cl	15 g/L
$MgSO_4\ _7H_2O$	4 g/L
$CaCl_2\ _2H_2O$	2 g/L

Solución de Fosfatos

K_2HPO_4	28.8 g/L
KH_2PO_4	14.4 g/L

Elementos traza de Hunter´s

Componente	Cantidad (Gramos)	Volumen de Agua (Mililitros)
EDTA	50	250
$ZnSO_4\ 7H_2O$	22	100
H_3BO_3	11.4	200
$MnCl_2\ 4H_2O$	5.06	50
$CaCl_2\ 6H_2O$	1.61	50
$CuSO_4\ 5H2O$	1.57	50
$(NH_4)\ 6Mo7O_{24}\ 4\ H_2O$	1.10	50
$FeSO_4\ 7H_2O$	4.99	50

11.2 Antibióticos

Para evitar la pérdida de plásmidos introducidos en los microorganismos, fue necesario mantenerlos bajo presión selectiva adicionando en el medio de cultivo los antibióticos correspondientes a la resistencia del plásmido contenido. Además se utilizaron para la selección de células que fueron transformadas. Fueron esterilizados por filtración con una membrana de nylon (tamaño de poro 0.2 μm) y fueron almacenados a -20°C.

Ampicilina

Para un stock de 100 mg/mL, se disolvieron 100 mg de *ampicilina* en 1 mL de agua miliQ

Kanamicina

Para un stock de 50 mg/mL, se disolvieron 50 mg de *Kanamicina* en 1 mL de agua miliQ.

11.3 Mantenimiento y conservación de cepas

Las cepas de *E. coli* transformadas con todas las construcciones fueron almacenadas en glicerol al 40% v/v a una temperatura de -20°C.

C. reinhardtii se mantuvo mediante recambios de medio TAP cada 15 días.

11.4 Vectores plasmídicos

- pBluescript II SK (+)

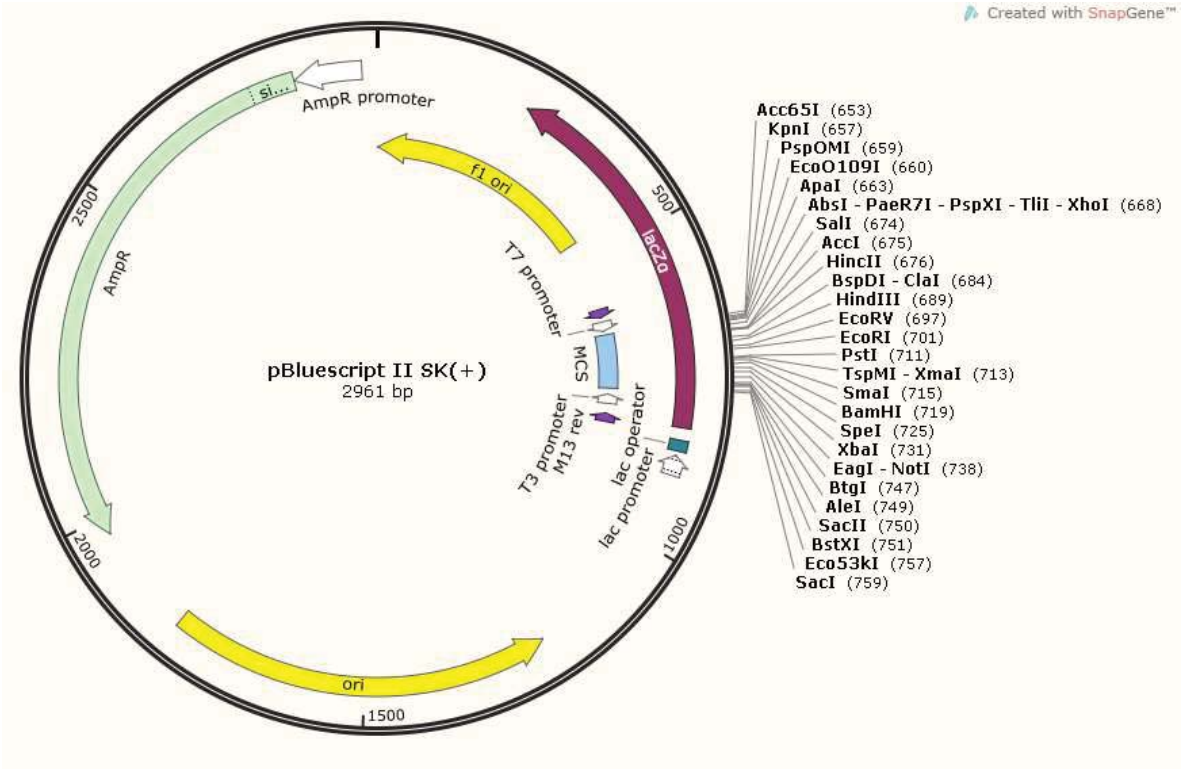

Figura 15 Mapa de restricción del plásmido comercial pBluescript II SK (+).

pBluescript II SK (+) es un vector comercial estándar diseñado para simplificar los procedimientos de clonación y secuenciación de uso común, tiene un origen de replicación de cadena sencilla de ADN, un gen de resistencia a *ampicilina* para la selección por antibióticos, un sitio múltiple de clonación con los promotores T3 y T7 rodeando esta región y la región del gen *lacZ* que provee la complementación alfa para la selección de colonias blancas/azules.

Este vector fue utilizado para la clonación de los genes de interés con promotor y terminador flanqueados por la enzima *Pac I.*

- pKM3

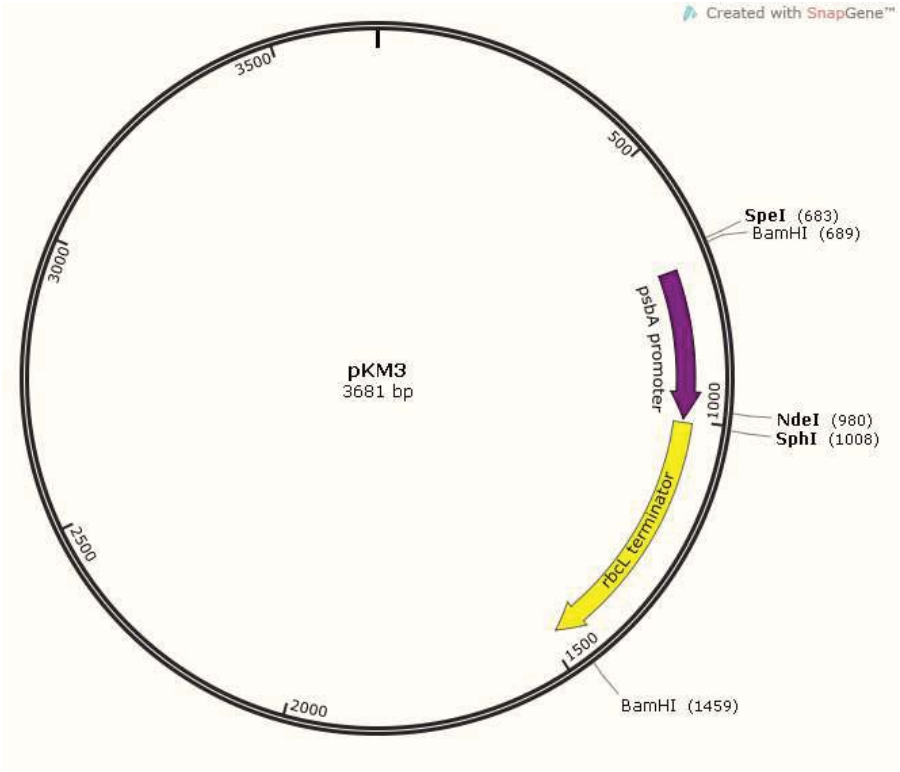

Figura 16 Mapa de restricción del plásmido pKM3

Vector diseñado a partir del esqueleto del vector comercial pBluescript II SK (+). Contiene la secuencia del promotor *psbA* y el terminador *rbcL* de *C. reinhardtii* unidos por los sitios de restricción de *Nde I* y *Sph I*.

Este vector fue diseñado por la M. en C. Karla Macedo y se utilizó para la inserción de los promotores y terminadores endógenos de *C. reinhardtii* a los genes de interés, flanqueados por la enzima *Pac I*.

- p320

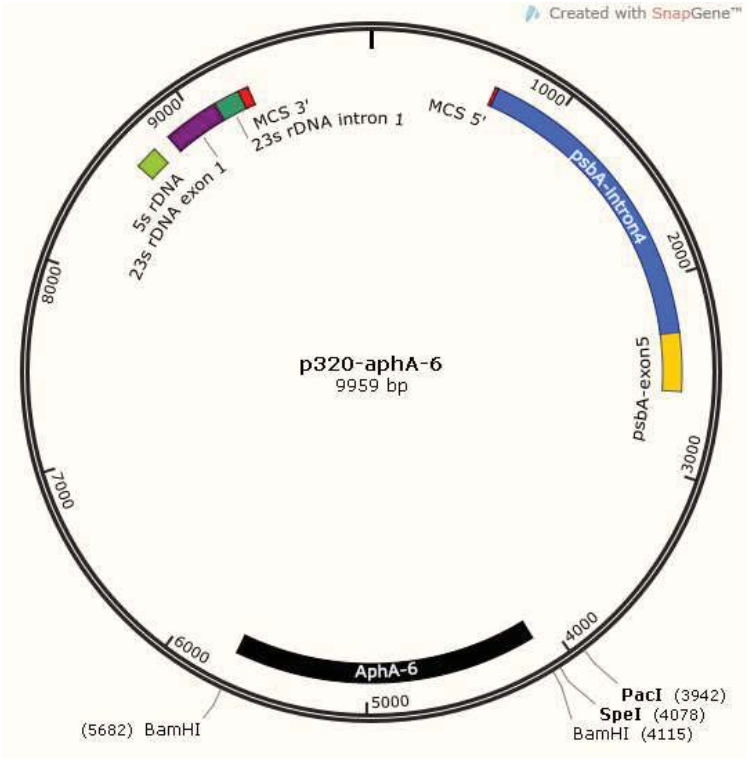

Figura 17 Mapa de restricción del casete de recombinación homóloga p320

El plásmido p320, realizado por el grupo de trabajo del laboratorio de Biotecnología Molecular, es una modificación del plásmido p322, el cual es parte de una librería genómica del cloroplasto de *C. reinhardtii* (Chlamydomonas Center, Duke University, Durham, NC, USA). Este plásmido cuenta con las secuencias *psbA*-intron4 y *psbA*-exon5 que son los sitios de recombinación que se encuentran en el genoma de cloroplasto de *C. reinhardtii*. Además contiene los sitios únicos *Spe I* y *Pac I* para la inserción de genes. En el sitio *Bam HI* se encuentra el gen *aphA-6*, el cual es utilizado para la selección por resistencia al antibiótico Kanamicina.

Este vector fue utilizado para la inserción de genes en el cloroplasto de *C. reinhardtii.*

11.5 Geles de electroforesis de proteínas.

Gel de Resolución (12%)

Agua	1.4 mL
AX2*	7.5 mL
Solución de acrilamida 30%**	6.0 mL
PSA 10%	75 µL
TEMED	10 µL

*AX2 (18.17 g Tris base y 4.0 mL de SDS al 10%, Con un pH de 8.8 diluido en 100 mL).

**Solución de acrilamida 30% (30 g acrilamida y 0.8 g de N'N'-bis-methylene-acrylamide diluido en 100 mL).

Gel Empacador (5%)

Agua	1.64 mL
BX2*	2.5 mL
Solución de acrilamida 30%	825 µL
PSA 10%	30 µL
TEMED	5 µL

*BX2 (6.06 g Tris base y 4.0 mL de SDS al 10%, Con un pH de 6.8 diluido en 100 mL).

Buffer de extracción de proteínas

25 mM de Hepes	100 mM de NaCl
5 mM de $MgSO_4$-$_7H_20$	10% Glicerol

*Ajustar pH a 7.5 con KOH y llevar a 200 ml.