



“PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DEL NANOCUERPO KN035 UTILIZANDO
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII COMO ORGANISMO DE EXPRESIÓN”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

NICOLÁS FERNANDO MONTALVA VÁSQUEZ

Director del Seminario de Título: Dr. Tomás Egaña.

Codirector del Seminario de Título: Dr. Fernán Federici.

Patrocinante: Dr. Miguel Allende.

Marzo del 2021

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Nicolás Fernando Montalva Vásquez.

“PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DEL NANOCUERPO KN035 UTILIZANDO *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* COMO ORGANISMO DE EXPRESIÓN”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Director del Seminario de Título:

Dr. José Tomás Egaña

Codirector del Seminario de Título:

Dr. Fernán Federici

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidenta Comisión:

Dra. Jennifer Alcaíno

Evaluador:

Dr. Andrés Marcoleta

Santiago de Chile, marzo del 2021

Biografía



Quien hoy escribe vio la luz de nuestro mundo un jueves 15 de septiembre del 1994. Hijo de dos jóvenes alumnos de esta casa de estudios, pasó sus primeros años, entre visitas a los parques de Santiago, partidos de fútbol sobre el gris asfalto del pasaje de la casa de sus abuelos. -su primer hogar- y tardes viendo los *Power Rangers*, y *X-Men*. Sería desde ese animado programa, donde por primera vez escucharía la palabra ADN, inscribiéndose en su piel un mítico eco sobre la industria de alta tecnología, la posibilidad de modificar lo que ya es, y el misterio que se escondía tras aquella, en ese entonces, inentendible sigla. Los tiempos pasarían, entre juegos y caminos por Ñuñoa, Peñalolén y la Reina, lugares donde asistió a dos escuelas, el colegio Nazareth y el colegio Sagrado Corazón de la Reina. Acérrimo hincha del club de su padre y su futura casa de estudios, Universidad de Chile, viviría inolvidables experiencias familiares en el estadio, alentando desde temprana edad en la galería. Con el tiempo la familia crece, llegando sus dos pequeños hermanos: Benjamín y más tarde Matías. Ante este escenario, la familia decide buscar un nuevo horizonte y encuentra la casa de sus sueños en un campestre condominio en las lomas de Las Vizcachas, Puente Alto. Ahí, enfrentaría un nuevo colegio, el Monte de Asís, donde viviría sus primeros amores, forjaría amistades únicas, descubriría la magia de la música y aquel eco de la niñez volvería a sonar, cuando en una inesperada clase de Biología, el ADN y la ingeniería genética volvieron a latir en el seno de su atención. Desde ahí tomaría la decisión de entrar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, motivado además por compartir el alma mater con sus padres y tíos. Durante el transcurso de su formación, tuvo la oportunidad de expandir sus pasiones, participando del Club de Rugby de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas -los Diablos de Ingeniería- y perfeccionando su amado idioma alemán en la Facultad de Filosofía y Humanidades. A nivel profesional, tendría la oportunidad de hacer una provechosa pasantía en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias, donde por primera vez en

su vida, se enfrentó a la realidad de la rutina del investigador. Más tarde, un azar del destino, lo llevaría a descubrir su verdadero norte y pasión en el mundo de la ciencia, cuando se encargó de la administración y gestión de un proyecto de Biología Sintética, siendo el líder de grupo del equipo iGEM 2017 de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas en conjunto con la Facultad de Ciencias, pudiendo llevar el proyecto a ser expuesto en Boston ante más de 300 equipos de todas partes del mundo. Con su norte fijado y reforzado tras el pequeño ramo de gestión de proyectos, podría afrontar las últimas dificultades que le quedaban por superar en su formación hasta al fin poder egresar el año 2018, año en el que también iniciaría la bella experiencia de pertenecer al Laboratorio de Regeneración e Ingeniería de Tejidos del Instituto de Ingeniería Biológica y Médica UC donde conocería la luz y la sombra del quehacer científico y de la investigación, aprendiendo de todo el equipo diferentes habilidades, técnicas y conocimientos. En el futuro, le gustaría migrar a Europa, donde espera poder perfeccionarse en materia de administración y negocios, extraer conocimiento y formación de alguna gran empresa del área farmacéutica o biomédica, donde la ingeniería genética juegue algún tipo de papel fundamental. Con ello poder volver a Chile, para poder ayudar y poner su granito de arena en el camino por recorrer para poner el nombre de nuestro país en la frontera del desarrollo tecnológico.

*“A Viviana, Cristián, Benjamín y Matías
Pilares de vida...”*

AGRADECIMIENTOS

¿Qué es lo que querías?

Lo que no puedo ver frente a mi ahora...

El día que puse punto final a este escrito, la providencia me asaltó con dicha pregunta que me permitió mirar en retrospectiva estos últimos 8 años de mi vida. Y es que, estos agradecimientos no se limitan a sólo el proceso que culmina hoy sino más bien a la totalidad del viaje, ya que, sin el ayer no habría existido el hoy. La vida me cruzo, el primer día, en los pastos de Juan Gómez Millas con un joven Rodrigo Murillo, quien se convirtió en mi amigo inseparable y compañero de estudios, trabajos y fiestas, a quien agradezco de todo corazón la lealtad y amistad honesta de todos estos años, porque sin aquellos elementos el viaje hubiese sido mucho más difícil, aburrido y solitario. Como en casi cualquier viaje, a veces es necesario un mapa o algo que nos guíe. A ti Andrés Romero, mi completa gratitud por cada uno de los apuntes, guías, pruebas añejas, consejos y material de apoyo, sin duda fueron las cartas de ruta cruciales seguidas durante mis tardes de estudio, creo que no pude haber tenido mejor padrino. Sin embargo, a veces, también es necesario alguien que te ayude con la lectura de dichos mapas, que la mayoría de las veces no podía decodificar solo. Hay muchos nombres que se me vienen a la cabeza: Jorge Cortés, Claudio Valenzuela, Camila Aravena, Camila Améstica, Patricio Figueroa, José Bernales, Sofía Romero, Kevin Chou, Jorge Vielma, Viviana Araya, Isadora Chávez y Alonso Lira. Todos, compañeros de estudios y fiestas, siempre dispuestos a juntarse a estudiar, a solucionar una duda y dar aliento. De todos, el más especial, Juan Pablo Saavedra, amigo, compañero de equipo y maestro, agradezco a la vida haber cruzado

camino con alguien tan inteligente y humilde a la vez, no habría llegado nunca a la parte final sin tu ayuda. Naturalmente hubo momentos en los que no supe que hacer ni para donde tomar rumbo y en particular, cuando debía iniciar el periodo de tesis me encontraba viviendo uno de esos momentos y tuve que ser en el lejano Boston donde Yu-wen Tang me dio el consejo clave, empujándome a desarrollar una tesis en un laboratorio y por el momento alejarme del área de la gestión que tanto me apasiona. Hoy agradezco de todo corazón sus palabras de sabiduría, no pude haber recibido mejor consejo. En los primeros años del viaje, soñé muchas veces terminarlo donde lo terminé, y existen dos personas claves que me ayudaron a llegar a ello, Javier Olivares y Myra Chávez, agradezco al primero por las tardes conversadas, la amistad y por haber sido la llave que desbloqueó la parte final del viaje, abriéndome las puertas del laboratorio donde hoy terminé este proceso. A la segunda por ser una persona clave y guía, dentro del proceso de iGEM como de los cimientos de esta tesis, quien incluso desde lejos compartió su sabiduría y materiales. Llegar al laboratorio de Ingeniería de Tejidos y Regeneración UC, fue como aquella parte de un libro, en la cual el protagonista encuentra un refugio donde poder descansar tras haber vivido el fuego de la batalla. Tuve la suerte, de quizás por última vez, volver a ser un niño y de cada uno de mis compañeros aprender y absorber algo. Primero que todos agradecer a Camila Cárdenas, por ser quien me guió en mis primeros pasos, enseñándome lo básico, así como también algo clave y esencial: la nobleza de las microalgas aquí trabajadas. Cuando estaba sin ideas para este proceso, fue lindo ver como todos trataron de ayudarme. A Sergio González, Miguel Miranda, Valentina Veloso, Rocío Corrales, Francisco Pereira, Carolina Ehrenfeld y Valentina Castillo, por las conversaciones, las cervezas, las risas y por hacer cada día un buen día para venir a tratar

de pensar que hacer. Me gustaría de todo corazón agradecer a Christopher Holmes, por entregarme la idea final que terminó siendo lo que en este documento y camino se trató de abarcar como también a mis tutores Tomás Egaña y Fernán Federici quienes creyeron en mí y me dieron la chance y confianza para unirme a sus equipos y llevar a cabo la tarea aquí propuesta. Se podría decir que fui un afortunado, ya que nunca me pasó lo peor: estar solo. Hubo dos personas claves en que aquello no pasara. La primera Macarena Muñoz, quien por mera buena voluntad y una implacable alma de docente, me enseñó y supervisó todas mis escaramuzas con la pipeta, las bacterias y la Biología Molecular en general. Sin ella la primera parte de este texto, jamás podría haberse escrito. La segunda persona, podría decirse que fue como que si el Arquitecto me haya puesto un ángel guardián quizás cuando más lo necesitaba, en el último momento más oscuro del viaje, ese que te hace querer rendirte, a ti Marianne Brenet mi más profundo cariño, lealtad y agradecimiento, por cada consejo y palabra de aliento, por todo el tiempo dedicado a ayudarme en los experimentos que me hacían creer que no me la podía, por revisar este escrito, por creer en mí, por el cariño y la amistad. Este texto está sin duda listo por todo ello. Agradecimiento también por aquellos consejos, enseñanzas y ayudas siempre tan útiles y bien intencionadas, como lo fueron las que David Necuñir, Rosalba Escamilla y Felipe Carvajal me han entregado, me hace muy feliz haber podido haber aprendido y compartido tanto con personas tan sabias y humildes como ellos. Me gustaría expandir también mi agradecimiento a Javiera Poblete y Scott Kimmins quienes muy amablemente accedieron a corregir mi inglés.

No cabe más que mencionar a las constantes de mi vida: a Cristóbal Montalva por esa absoluta disponibilidad de siempre, y por haber dedicado tiempo a leerme y aconsejarme. A Pablo Jara, Francisco Gómez, Nicolás Salas, Daniela Garay y Constanza Vega, amigos y amigas, hermanos y hermanas de tantos años, quienes siempre han sido un escape y oído para mis palabras. Doy gracias por tenerlos junto a mí, así como también, agradezco a todos y todas, quienes quizás nuestros caminos ya no están juntos, pero que en su momento fueron un punto de apoyo, cariño y aliento. Extiendo mi gratitud a mis familiares, por ser siempre quienes han sido en mi vida, en especial a mi núcleo, Cristián, Viviana, Benjamín y Matías para con quienes mi agradecimiento y amor no podría ser contenido ni domado en estas palabras y papel. Simplemente gracias, por estar ahí cada día de mi vida.

*Descubrí lo que era importante de verdad, antes de encontrar lo que quería
Pero no tengo prisa, disfruto el viaje
Así que si nuestros caminos se cruzan en el futuro
Deberías disfrutar de los pequeños desvíos, disfrútalos mucho
Porque, de ese modo, encontraras aquello que es más importante que lo que querías
Yoshihiro Togashi.*

Hoy agradezco con toda el alma cada uno de esos desvíos...

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	
1. 1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : Modelo de estudio en Biología Molecular para su aplicación en Ingeniería Genética	1
1. 2 Biología Sintética: La nueva era de la Biología Molecular y de la Ingeniería Genética	5
1. 3 <i>Liberación in situ</i> : Alianza estratégica entre <i>C. reinhardtii</i> y moléculas con alcances terapéuticos.	11
1. 4 Nanocuerpos.	12
1. 5 El nanocuerpo KN035: Nueva alternativa para el tratamiento del cáncer	14
2 MATERIALES Y MÉTODOS	
2. 1 Obtención de secuencias y generación de la construcción Ars2-KN035-6xHis	16
2. 2 Diseño in silico de las piezas de DNA y partidores para <i>Gibson Assembly</i>	17
2. 3 Transformación de bacterias quimiocompetentes.	19
2. 4 Extracción de DNA plasmidial desde bacterias transformadas	20
2.4.1 Cuantificación de ácidos nucleicos	21
2. 5 Obtención de piezas L1, L2 y L3 para <i>Gibson Assembly</i>	21
2.5.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	22
2.5.2 Extracción de DNA desde gel de agarosa.....	23
2.6 Ensamblaje del vector Pbc1-KN035	24
2.6.1 Cálculo de las concentraciones equimolares de las piezas para <i>Gibson Assembly</i>	24
2.6.2 <i>Gibson Assembly</i>	26
2.7 PCR.....	27
2.8 Transformación de <i>C. reinhardtii</i> y selección de transformantes	29
2.8.1 Tratamiento <i>Glass Beads</i>	29
2.8.2 Transformación de <i>C. reinhardtii</i> vía <i>Glass Beads</i>	29
2.8.3 Extracción de DNA nuclear de <i>C. reinhardtii</i>	31
2.8.4 Aislamiento y establecimiento de líneas clonales derivadas de transformantes UVM11 y UVM4.	32
2.9 RT-PCR sobre líneas portadoras del casete Ars2-KN035-6xHis.....	33

2.9.1 Extracción de RNA total de <i>C. reinhardtii</i>	33
2.9.2 RT-PCR	34
3 RESULTADOS	
3.1 Diseño <i>in silico</i> y generación de un vector que permita la inserción de un casete de expresión para KN035 en <i>C. reinhardtii</i>	37
3.1.1 Obtención y optimización de las secuencias para la generación del constructo Ars2-KN035-6xHis.....	37
3.1.2 Diseño y simulación <i>in silico</i> de las piezas del vector Pbc1-KN035	49
3.1.3 Generación del vector Pbc1-KN035	
3.1.3.1 Propagación del vector <i>backbone</i> Pbc1-VEGF	54
3.1.3.2 Amplificación de las piezas para <i>Gibson Assembly</i>	55
3.1.3.3 <i>Gibson Assembly</i>	57
3.2 Transformación de <i>C. reinhardtii</i> y selección de transformantes	59
3.2.1 Selección de transformantes en medio líquido	59
3.2.2 Evaluación de la presencia del constructo Ars2-KN035-6xHis en las cepas transformadas mediante PCR	62
3.3 Generación de líneas clonales genéticamente independientes	66
3.4 Análisis de la presencia de transcrito en las cepas portadoras del casete Ars2-KN035-6xHis	71
4 DISCUSIÓN	75
5 CONCLUSIONES	85
6 BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXO I	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores diseñados para la generación de piezas para <i>Gibson Assembly</i>	17
Tabla 2: Piezas de DNA diseñadas con zonas de homología.....	18
Tabla 3: Vectores binarios utilizados para generar distintas variantes de <i>C. reinhardtii</i>	19
Tabla 4: Partidores asociados a la producción de cada pieza de DNA del nuevo vector.....	22
Tabla 5: Volúmenes y concentraciones utilizadas para obtener cantidades equimolares de cada una de las piezas utilizados en la mezcla I de piezas.....	25
Tabla 6: Volúmenes para cantidades equimolares de cada una de las piezas utilizados en la mezcla II de piezas.....	26
Tabla 7: Condiciones particulares para cada reacción de PCR.....	28
Tabla 8: Partidores diseñados para RT-PCR.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida de <i>C. reinhardtii</i>	2
Figura 2: Metodología de <i>cloning</i> utilizada por <i>Gibson Assembly</i>	6
Figura 3: Metodología de <i>cloning</i> utilizada por <i>Golden Gate</i>	8
Figura 4: Comparación gráfica de las estructuras de diferentes anticuerpos.....	12
Figura 5: Relaciones matemáticas que permiten encontrar la cantidad equimolar necesaria para cada una de las piezas a usarse en el ensamblaje del vector Pbc1-KN035.	24
Figura 6: Fórmula para determinar concentraciones en cultivo utilizando placa de Neubauer.	29
Figura 7: Representación gráfica del constructo Ars2-KN035-6xHis.....	38
Figura 8: Secuencia aminoacídica codificante para el nanocuerpo KN035.	38
Figura 9: Secuencia nucleotídica codificante para KN035 obtenidas del algoritmo de transformación.....	39
Figura 10: Optimización de la secuencia nucleotídica para KN035.....	40
Figura 11: Secuencia aminoacídica del péptido señal a secreción de la proteína Ars 2.41	41
Figura 12: Secuencia de nucleótidos codificantes para el péptido señal Ars 2	41
Figura 13: Secuencia codificante para el péptido señal de Ars2 tras la optimización de codones realizada por el algoritmo de IDT	42
Figura 14: Secuencia nucleotídica codificante para 6xHis.....	42
Figura 15: Secuencia nucleotídica de Ars2-KN035-6xHis.....	43
Figura 17: Segunda optimización manual de los codones.....	46
Figura 18: Secuencia final de Ars2-KN035-6xHis.....	47
Figura 19: Secuencia final de síntesis del constructo Ars2-KN035-6xHis	48
Figura 20: Estructura del vector <i>backbone</i> binario Pbc1-VEGF	49
Figura 21: Mapa de las tres piezas generadas para <i>Gibson Assembly</i>	51
Figura 22: Ubicación de cada pieza generada en la estructura del vector Pbc1-VEGF .52	52
Figura 23: Mapa del vector Pbc1-KN035 generado tras el <i>Gibson Assembly</i>	53

Figura 24: Productos de PCR de colonias transformadas con Pbc1-VEGF colonias transformadas con Pbc1-VEGF.....	54
Figura 25: Generación de las piezas L1 y L2	55
Figura 26: Generación de la pieza L3	56
Figura 27: Obtención de la pieza	57
Figura 28: Productos de PCR correspondiente a la secuencia Ars2-KN035-6xHis amplificados desde el vector Pbc1-KN035	58
Figura 29: Selección de transformantes de <i>C. reinhardtii</i> en medio líquido con 10 [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$].....	60
Figura 30: Transformantes seleccionados en medio líquido pueden sobrevivir y ser almacenados en el tiempo en medio sólido bajo la misma presión de selección.....	61
Figura 31: Evaluación de la presencia del constructo Ars2-KN035-6xHis en el DNA nuclear de <i>C. reinhardtii</i> UVM11 KN035 y UVM4 KN035	63
Figura 32: PCR en gradiente utilizando como molde DNA nuclear de <i>C. reinhardtii</i> UVM11 KN035 y UVM4 KN035.....	64
Figura 33: Evaluación de la presencia de la construcción Ars2-KN035-6xHis en DNA nuclear de cepas transformadas.....	65
Figura 34: Colonias genéticamente independientes de transformantes de las cepas UVM11 KN035 y UVM4 KN035.....	66
Figura 35: Mantenimiento y expansión de poblaciones clonales de las cepas UVM11 KN035 y UVM4 KN035.....	67
Figura 36: Análisis molecular de la presencia del casete Ars2-KN035-6xHis en las líneas clonales derivadas de la cepa UVM4.....	69
Figura 37: Análisis molecular de la presencia del casete Ars2-KN035-6xHis en las líneas clonales derivadas de la cepa UVM11	70
Figura 38: Posibles amplicones y zonas de anclaje respecto al mensajero de Ars2-KN035-6xHis	71
Figura 39: RT-PCR específico para el mensajero Ars2-KN035-6xHis.....	72
Figura 40: RT-PCR específico para el mensajero Ars2-KN035-6xHis.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

- cDNA:** Ácido desoxirribonucleico complementario.
- EMBL-EBI:** Instituto europeo de Bioinformática.
- GFP:** Proteína fluorescente verde.
- HCAbs:** Antígeno de cadena pesada.
- IDT:** Integrated DNA technologies, Inc.
- mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero.
- NCBI:** Centro Nacional para la Información Biotecnológica de los Estados Unidos.
- ORFs:** Marcos de lectura abiertos.
- PD-1:** Proteína programadora de muerte 1.
- PD-L1:** Ligando 1 de la proteína programadora de muerte 1.
- PD-L2:** Ligando 2 de la proteína programadora de muerte 1.
- PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- psaD:** Centro de reacción subunidad II del fotosistema I.
- psbD:** Proteína D2 del Fotosistema II.
- rbcS2i1:** Primer intrón de la cadena pequeña II de la Ribulosa Bisfosfato Carboxilasa.
- SDF-1 α :** Factor derivado del estroma 1.
- scFv:** Fragmento variable de cadena única.
- UTR:** Región no traducida.
- UV:** Ultravioleta.
- VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular
- Wt:** Silvestre
- YFP:** Proteína fluorescente amarilla.
- 6xHis:** Arreglo de 6 histidinas.

RESUMEN

La microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido utilizada como modelo de estudio clásico en áreas como fotosíntesis, motilidad celular, control ciclo celular, entre otras. En particular, durante el último tiempo se ha ido transformando en un organismo de interés para el área biomédica con diversas aplicaciones. Desde liberación *in situ* de oxígeno para el tratamiento de heridas crónicas en ambientes hipóxicos, promoviendo su regeneración, hasta la producción recombinante de factores de regeneración u otros tipos de metabolitos con alcances terapéuticos. En este último grupo destacan los llamados Nanocuerpos: pequeños fragmentos peptídicos de alrededor de 15 [kDa] que mantienen la misma capacidad de unión a un antígeno que la que tiene un anticuerpo convencional. Hasta el momento existe sólo un antecedente de producción a nivel de cloroplasto de tres distintos tipos de estas moléculas utilizando *C. reinhardtii*, pero diseños que permitan la liberación local de nanocuerpos desde este organismo no han sido publicados. Un nanocuerpo de particular importancia es KN035, asociado a la interrupción específica de la vía checkpoint inmunológica PD1-PD-L1, la cual naturalmente se asocia a fenómenos de auto-tolerancia inmunológica. Sin embargo, en presencia de neoplasias ha mostrado ser una ruta para que células tumorales cancerígenas puedan suprimir la actividad de los linfocitos T circundantes. En el presente trabajo se propuso como objetivo general generar una cepa recombinante de *C. reinhardtii* que permitiese la producción del nanocuerpo KN035 en miras futuras de una posible aplicación para liberación *in situ* de dicha molécula en tumores. Utilizando herramientas bioinformáticas se diseñó un casete de expresión que permitiese la producción y secreción al medio del nanocuerpo KN035. Por medio de *Gibson Assembly* se produjo satisfactoriamente un vector para la transformación de *C. reinhardtii* y la incorporación nuclear de este casete, comprobándose por PCR el éxito de la transformación y la presencia de dicho casete en el DNA genómico en tres poblaciones clonales. Finalmente, mediante ensayos de RT-PCR se corroboró satisfactoriamente que dos de dichas cepas, 11K1 y 11K5 mostraban presencia del transcrito asociado a KN035. Futuros ensayos serán necesarios para poder comprobar la presencia de la proteína tanto en el medio intracelular como extracelular, así como también la funcionalidad del producto recombinante aquí obtenido.

ABSTRACT

The green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* has been used as a model organism in different areas of research, such as photosynthesis, cellular motility and cellular cycle control, among others. Recently, *C. reinhardtii* has become increasingly important in the biomedical field due its many applications, from the *in-situ* delivery of oxygen for the treatment of the hypoxic chronic wounds, to the recombinant production of regenerative factors or numerous other therapeutic metabolites. Nanobodies are metabolites that has shown particular importance, they are short peptide fragments of around 15 [kDa], which demonstrate the same affinity for an antigen as a heavy chain antibody. To date, there is just one report in which *C. reinhardtii* has been used as a cell factory for three nanobodies, using chloroplast transformation, but strategies to allow the *in-situ* delivery remains unpublished. On nanobody, KN035, is of particular interest, as it is associated with the specific interruption of the immunological checkpoint pathway PD1-PD-L1, which is associated to immune autotolerance, which plays a role in the inactivation of T-cells and tumor proliferation. In this work, our major aim was the generation of a recombinant strain of *C. reinhardtii* that produces this KN035 nanobody in such a way that could potentially support the *in-situ* delivery of KN035 in cancer tumors. Using bioinformatic tools we have designed an expression cassette that allows the expression and secretion of KN035 to the extracellular medium. Making use of *Gibson Assembly* we have developed a functional vector that allows the transformation of *C. reinhardtii* and the incorporation of this expression cassette, which was checked by PCR showing a successful transformation and the presence of the cassette in 3 different clonal lines. Lastly, we have subjected these clonal lines to an RT-PCR assay where we have corroborated that two strains, 11K1 and 11K5, produce the KN035 mRNA transcript. Future assays will be necessary to verify the presence of protein in both the extracellular and the intracellular medium, as well as the functionality of the protein produced.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1.- *Chlamydomonas reinhardtii*: Modelo de estudio en biología molecular para su aplicación en ingeniería genética.

Durante mucho tiempo, la microalga verde *Chlamydomonas reinhardtii* ha sido considerada un organismo modelo para el estudio de motilidad celular, fotosíntesis, control de ciclo celular y biología del cloroplasto, entre otros (Salomé & Merchant, 2019). La razón de su éxito se debe; por un lado, a sus requerimientos de cultivo y al medio en el que se propagan, los cuales son comparativamente simples, definidos y rentables. Además, su versatilidad respecto a la forma de cultivo permite una sencilla escalabilidad (Jarquín- Cordero y col, 2019). Esto se debe a diversas características, dentro de las cuales destacan; el hecho de ser un organismo fotoautótrofo facultativo, lo que le permite sobrevivir sin realizar fotosíntesis si es provisto de una fuente de carbono reducido, como acetato, y, además, permanecer verde en la oscuridad (Levine, 1960).

C. reinhardtii se caracteriza por tener dos tipos de ciclos reproductivos (Figura 1); uno sexual, que aparece frente a condiciones nutricionales adversas; y uno asexual, por división mitótica, cuando las condiciones nutricionales no son limitantes, donde cada una de las células hijas tendrá información genética nuclear, mitocondrial y cloroplástica idéntica a la célula madre (Salomé & Merchant 2019). Este último tipo de ciclo reproductivo, sumado con su genoma haploide, le permite, en contraste a un organismo diploide, la expresión inmediata de mutaciones, lo cual facilita su observación en el caso de que estas mutaciones llegasen a tener efecto en su fenotipo (Salomé & Merchant 2019).

Estas características hacen de *C. reinhardtii* un modelo idóneo para estudios genéticos clásicos, así como también, un organismo atractivo para ser utilizado en ingeniería genética y producción heteróloga de proteínas.

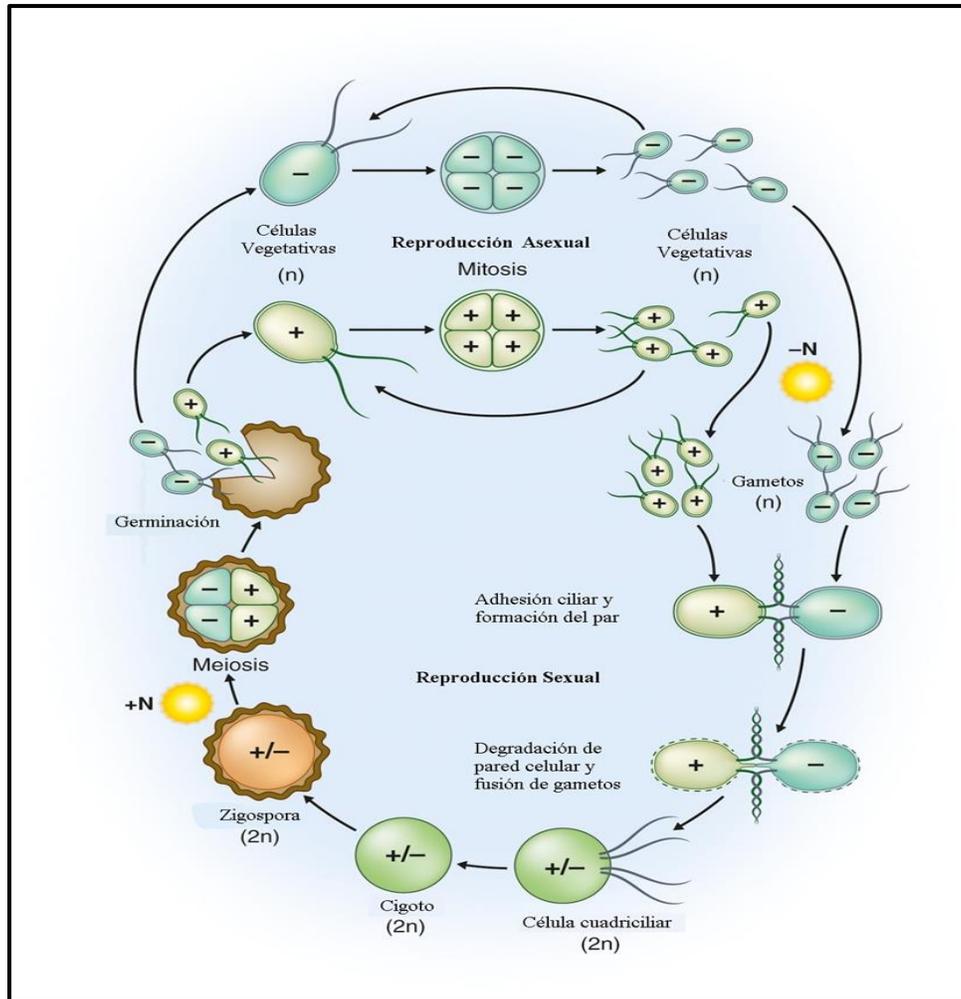


Figura 1: Ciclo de vida de *C. reinhardtii*. Se caracteriza por poseer dos ciclos, uno sexual y otro asexual. El primero se manifiesta en las células vegetativas haploides que se reproducen por mitosis, existiendo dos tipos de *mating* entre ellas: mt+ y mt-. En condiciones de luz y déficit de nitrógeno (N en la figura) se induce la fase de Reproducción Sexual, a partir de la fusión de dos células gametos de *mating* distinto formando finalmente un único cigoto diploide no motil. Con el paso de los días, este cigoto se transformará en una zigospora dormante altamente resistente. Al exponer esta zigospora a condiciones favorables de nitrógeno y luz, se inducirá el proceso de meiosis generando nuevos gametos haploides. (Modificado de Sasso y col, 2018)

Desde el año 1988, cuando se realizaron las primeras transformaciones nucleares y cloroplásticas (Boynton y col, 1988; Blowers y col, 1989; Kindle y col, 1989), se han desarrollado diversos avances que han perfilado a *C. reinhardtii* como un modelo altamente utilizado en ingeniería genética, biología sintética y producción heteróloga de proteínas (Scaife y col, 2015). Ejemplo de esto es el desarrollo mediante mutagénesis inducida por luz ultravioleta (UV) de dos cepas, UVM4 y UVM11, que muestran un nivel de producción de reporteros YFP y GFP recombinantes altamente superior a la cepa silvestre al ser transformadas para expresar dichos reporteros, independiente del sitio de inserción del transgen. Este avance, marca un gran paso a la hora de sortear las bajas tasas de producción de proteínas recombinantes obtenidas a partir de transformaciones nucleares de este microorganismo, asociado, en parte, a mecanismos de silenciamiento epigenéticos, los cuales en estas dos cepas se encuentran aparentemente afectados, especulándose que el gen *knock out* por UV jugaría un rol en la modulación de la cromatina y codificando, probablemente, un regulador clave de la heterocromatización (Neupert y col, 2009).

Además de los mecanismos de silenciamiento génico asociados a factores epigenéticos, se ha observado que parte importante de la maquinaria de expresión de *C. reinhardtii* estaría asociada a un intenso procesamiento de su mRNA, el cual se cree que podría ser utilizado como sistema inmune contra infecciones virales y elementos móviles. De este modo, como las secuencias para expresión heteróloga corresponden en su mayoría a cDNA, que son incluso más largas que el exón promedio de este organismo, existirían dificultades para realizar el reconocimiento por parte de las estructuras regulatorias de

splicing, induciendo al silenciamiento del transgen (Weiner y col, 2018; Baier y col, 2018). Esta dificultad ha sido abordada con diferentes aproximaciones experimentales; recientemente se ha elaborado una estrategia en el diseño *in silico* del transgén, en el cual se inserta la secuencia del intrón rbcS2i1 (primer intrón de la cadena pequeña II de la ribulosa bisfosfato carboxilasa) en zonas propicias de *splicing* (NG/GN.), que puedan encontrarse a lo largo de la secuencia de interés, de manera que éste quede dividido en exones de largos cercanos a 500 [pb] (Baier y col, 2018). Sin embargo, existen estrategias experimentales más sencillas cuando se trata de genes de interés con un largo inferior o cercano a los 500 [pb], basadas en el uso de zonas regulatorias de genes endógenos que no contienen intrones dentro de ellas, como el caso del gen *psaD* (Centro de reacción subunidad II del fotosistema I). Este gen, posee toda su maquinaria regulatoria en el promotor, en el 5'UTR y en el 3'UTR, permitiendo una alta y correcta producción de proteínas heterólogas, incluso con marcaje para secreción al medio extracelular y para la acumulación en el cloroplasto (Fischer & Rochaix, 2001; Chávez y col, 2015).

Por otro lado, sobre *C. reinhardtii* se han desarrollado estrategias para enfrentar, el último problema común que este microorganismo podría oponer a la hora de ser utilizado como plataforma productora de moléculas recombinantes. Su altísimo contenido de guanina y citosina en su genoma, alcanzando el 62% de este (Fischer & Rochaix, 2001). Esto conlleva a una preferencia de codones diferentes al canon para *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*, modelos altamente utilizados en ingeniería genética, por lo tanto, es necesario ajustar los transgenes, sometiéndolos a un ajuste de codones específico para este microorganismo. Este proceso se ha vuelto común a la hora de realizar cualquier

tipo de trabajo asociado a producción de proteína recombinante existiendo varios ejemplos en la literatura (Barahimipour y col 2015; Chávez y col, 2015; Weiner y col, 2018; Jarquín-Cordero 2019).

1.2.- Biología Sintética: la nueva era de la biología molecular y de la Ingeniería Genética.

A principios de la década anterior, emerge en el seno de la biología molecular y la ingeniería genética una nueva disciplina llamada biología sintética. Esta disciplina, aplica los paradigmas de la ingeniería de forma racional y sistemática para producir sistemas biomoleculares artificiales que posean funciones predecibles y reproducibles permitiendo incluso montar versiones mínimas de sistemas naturales sintéticos para estudiarlos en condiciones más controladas. Esta disciplina, posee la característica de simplificar la expresión génica, al tomar las redes genéticas como subconjuntos de partes más simples llamadas “módulos”. Estos módulos pueden considerarse como partes individuales de expresión que pueden ser caracterizadas de forma independiente y ser utilizadas para la construcción de circuitos genéticos (Dean y col, 2016). En relación con lo anterior, las técnicas de trabajo ligadas a la manipulación genética también han tenido un importante desarrollo, especialmente aquellas asociadas a ensamblaje de secuencias y al clonamiento, destacándose dos técnicas en particular: *Gibson Assembly* y *Golden Gate*.

Gibson Assembly corresponde a un sistema de recombinación *in vitro* que posee la capacidad de ensamblar y reparar moléculas de DNA que se sobreponen en un único paso isotérmico utilizando un cóctel enzimático basado en una T5 exonucleasa, una DNA

polimerasa de alta fidelidad y una *Taq* DNA ligasa (Gibson y col, 2009). Las ventajas de esta técnica por sobre el clonamiento tradicional son que ésta incluye menos etapas y reactantes, obteniendo un producto final libre de secuencias cicatrices. Utilizando esta técnica se han podido producir satisfactoriamente librerías genómicas completas (Thomas y col, 2015). Además, *Gibson Assembly* remueve diversos obstáculos como la incompatibilidad con enzimas de restricción entre las piezas, la necesidad de pasos de ligación intermedios, y el limitado tamaño de los segmentos objetivos (McAllaster y col, 2016). Otra ventaja importante que esta técnica posee es que, al unir covalentemente cada una de las piezas, los fragmentos formados pueden rápidamente amplificarse mediante PCR, en contraste con la clonación en un organismo hospedero para producir más del fragmento ensamblado, donde se estaría forzando a confiar en su maquinaria de clonación (Gibson, 2014). La metodología de *cloning* se resume a continuación:

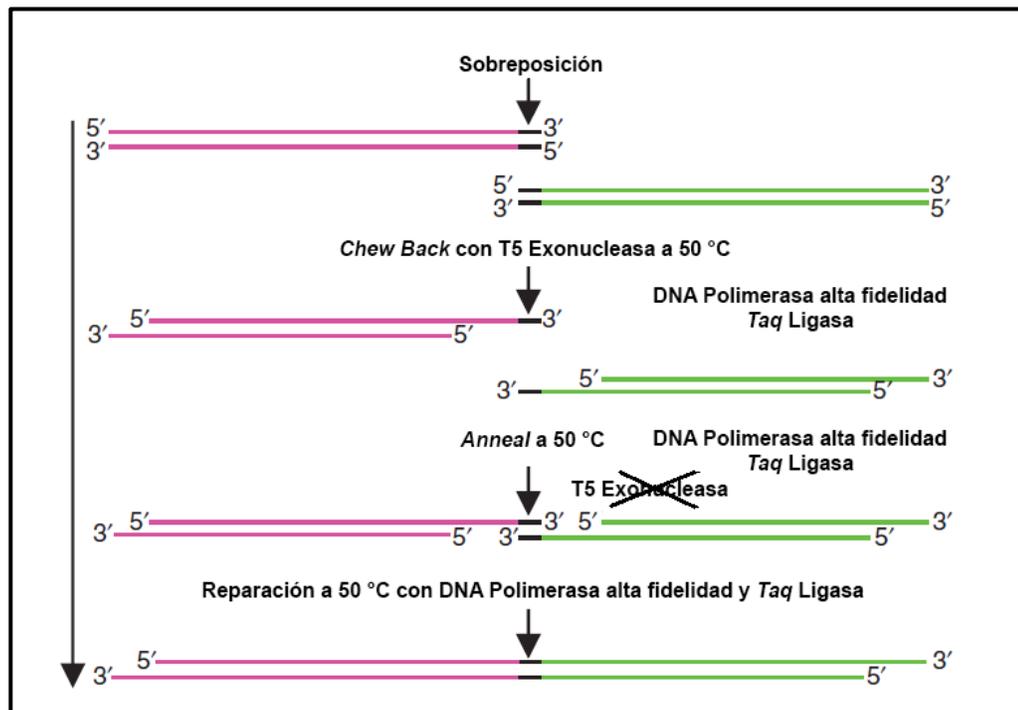


Figura 2: Metodología de *cloning* utilizada por *Gibson Assembly*. Dos piezas de DNA pueden ser ligadas en una etapa isotérmica, debido a la presencia de zonas de homología, de alrededor de 20 a 40 [pb] en sus bordes permitiendo su superposición, dando paso a la acción de la enzima T5 exonucleasa la cual remueve nucleótidos en sentido $5' \rightarrow 3'$. Los extremos homólogos expuestos hibridan a esa temperatura mientras que la enzima, inestable a esa temperatura termina perdiendo su actividad. Finalmente, la polimerasa rellena los espacios dejados y la ligasa repara los cortes. (Figura modificada de Gibson y col, 2009)

En el caso de *Golden Gate*, corresponde a un método de *cloning* basado en la actividad de las enzimas restricción tipo II's. Este tipo de enzimas de restricción permiten cortar el DNA fuera del sitio de reconocimiento, formando *overhangs* de 4 nucleótidos en el 3' o 5' que pueden consistir en cualquier secuencia definida. Esto permite, que, con el debido diseño de los sitios de corte, los fragmentos digeridos puedan ser ligados para generar un producto que no posea los sitios originales de restricción (Engler y col, 2008). Para minimizar errores de ensamblaje, las piezas básicas a ensamblar son normalmente puestas en “vectores de entrada”, para luego ser digeridos y ligados a “vectores de destino”. De este modo, cuando se desea utilizar este método para ensamblaje jerárquico, se adopta un ensamblaje escalonado: en un primer nivel los genes son ensamblados desde sus partes básicas, es decir, promotores, ORFs (abreviación inglesa para marcos de lectura abiertos) y terminadores, mientras que, en un segundo nivel, estos genes son combinados para formar sistemas multigénicos (Casini y col, 2015). La idea de que las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción tipo II's se encuentren en el exterior del fragmento de interés respecto al sitio de corte, permite generar una estrategia general de *cloning* que no depende de la secuencia del fragmento de interés. Lo que conlleva a múltiples ventajas: (1) el sitio de reconocimiento es independiente de la secuencia del

módulo de interés y será eliminado después del clonamiento, (2) permite que el corte por las enzimas de restricción y la ligación sean realizadas en un mismo paso, (3) los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción tipo II's, pueden ser diseñados, de forma que permitan tener diferentes sitios de corte, permitiendo un clonamiento dirigido e impidiendo la religación del vector, (4) los *overhangs* se pueden diseñar para que no sean palindrómicos, de manera de impedir que los fragmentos puedan ligarse a una copia de ellos mismos, aumentando así, la eficiencia del clonamiento y, (5) se evitan, además, los problemas asociados a la incompatibilidad del *buffer* de la enzima, ya que en ambos cortes se realizan con la misma enzima de restricción (Engler y col, 2008). La metodología de *Golden Gate* se describe a continuación:

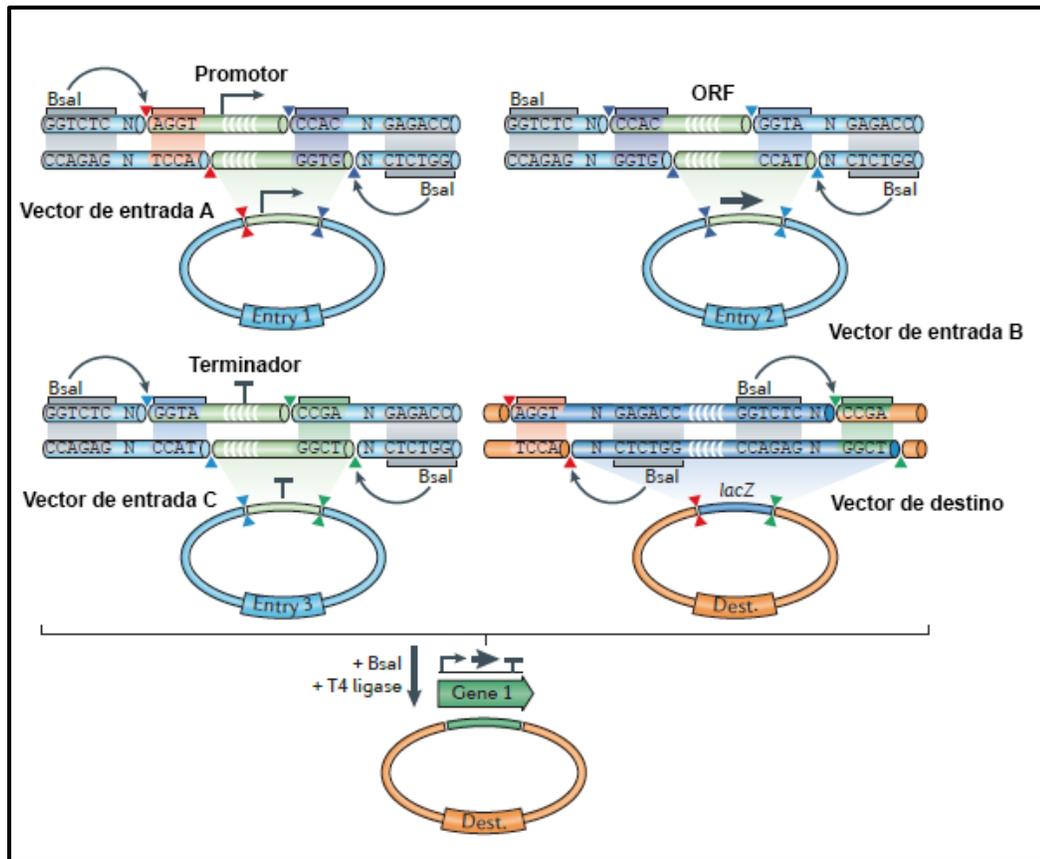


Figura 3: Metodología de *cloning* utilizada por *Golden Gate*. Para la generación de un fragmento de expresión funcional, tres módulos distintos, un promotor, un ORF y un terminador son ligados a vectores de entrada para posteriormente ensamblarse como modulo funcional en un vector destino. Cada uno de estos módulos es flanqueado por la secuencia de corte de una enzima de restricción tipo II's como *BsaI*, y su sitio de reconocimiento en el extremo. Los *overhangs* generados, tendrán complementariedad dirigida de modo que puedan hibridar y ensamblar por acción de una ligasa en un orden definido y deseado para formar la unidad funcional. A su vez, hay complementariedad entre los *overhangs* de los módulos que queden al extremo con los del vector destino, pudiendo de esa forma ser ligado a él toda la construcción. (Figura modificada de Casini y col, 2015).

Ambas estrategias han tenido gran impacto en *C. reinhardtii*: Para el caso de *Gibson Assembly*, esta técnica de manera satisfactoria ha permitido el ensamblaje de vectores de expresión genética para diversas aplicaciones, como la producción de proteínas recombinantes (Dejtisakdi & Miller, 2016; Ramos-Martinez y col, 2017) y la edición genómica en conjunto con técnicas como CRISPR/Cas 9 (Shin y col, 2016). Por su parte con *Golden Gate* se han desarrollado *tool kits* con diversos módulos estandarizados según *Mocloning*, una submetodología estándar basada en *Golden Gate* (Crozet y col, 2018). Este enfoque ha conducido al desarrollo de diversos componentes genéticos estandarizados y compatibles entre sí para diferentes organismos, facilitando y reduciendo los pasos de clonamiento al reutilizarse piezas ya existentes, formando repositorios completos de alto impacto. Así mismo, se han diseñado sistemas de expresión a nivel de cloroplastos utilizando *Golden Gate* como metodología central (Bertalan y col, 2015).

1.3.- Liberación *in situ*: Alianza estratégica entre *C. reinhardtii* y moléculas con alcances terapéuticos.

La combinación de las estrategias ya expuestas para *C. reinhardtii*, en conjunto con los avances en técnicas de biología sintética como *Gibson Assembly* o *Golden Gate*, han permitido abrir puertas para el uso de *C. reinhardtii* como plataforma productora de proteínas recombinantes, en especial aquellas con uso terapéutico para liberación *in situ*, ya sea desde una cápsula, un biomaterial o directamente sobre un tejido. Proteínas como VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular) han logrado ser sintetizadas de manera recombinante en estas microalgas. Además, se ha logrado esta producción en cultivos de microalgas sobre andamios de colágeno biocompatibles. De esta manera, se han generado biomateriales fotosintéticos que, por un lado, secreten estas proteínas y por otro sean fuente de oxígeno, siendo destinados al tratamiento de heridas en condiciones hipóxicas (Chávez y col, 2015). Siguiendo la misma línea, estas microalgas se han utilizado en suturas de heridas, liberando altas concentraciones de oxígeno, de origen fotosintético, y que además secretan no solo VEGF, sino que también proteínas como PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) y SDF-1 α (Factor derivado del estroma 1), la cuales también poseen aplicaciones terapéuticas (Centeno-Cerdas y col 2018).

1.4.- Nanocuerpos.

Una de las proteínas con enfoque terapéutico que más repercusión ha tenido en este último tiempo son los nanocuerpos. Estos corresponden al fragmento de unión antigénica disponible más pequeño de un anticuerpo, el cual puede mantener igual capacidad de unión a un antígeno que un anticuerpo de cadena pesada (HCAs). Estos nanocuerpos han evolucionado para ser completamente funcionales en ausencia de cadena ligera (Revets y col, 2005). En la Figura 4, se muestra, de manera gráfica, la estructura de los anticuerpos y nanocuerpos:

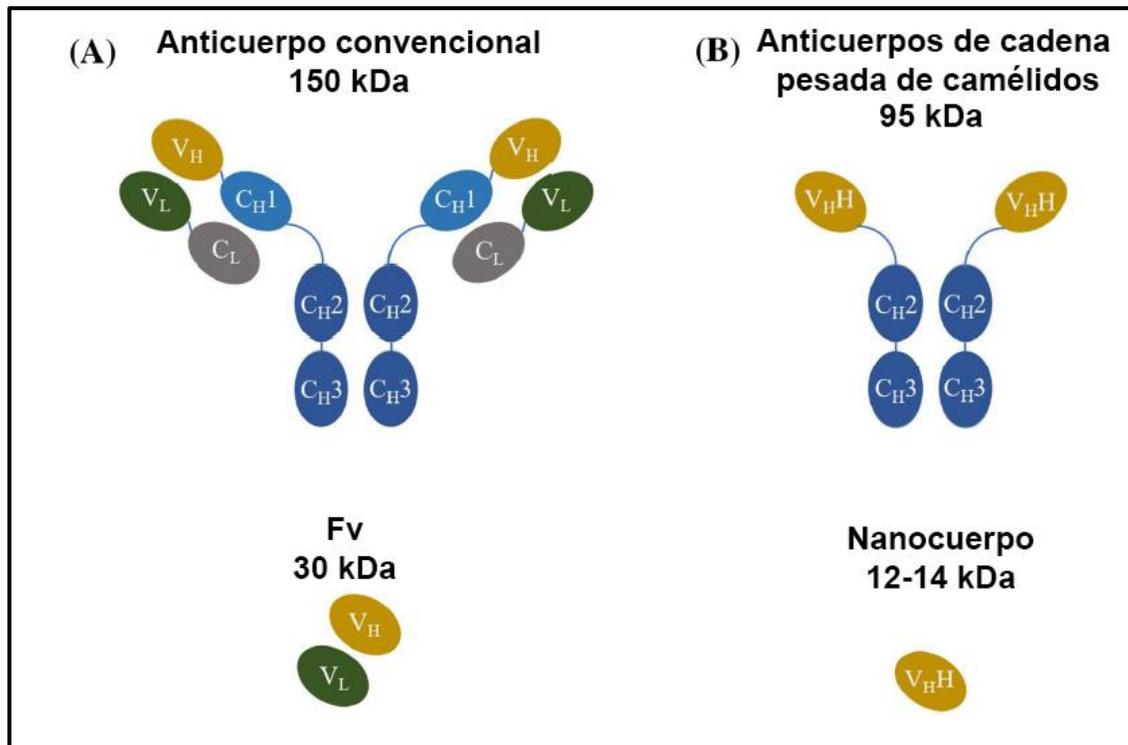


Figura 4: Comparación gráfica de las diferentes estructuras de los anticuerpos. En (A) se observa la estructura de anticuerpos tradicionales, los cuales están formados por dos cadenas pesadas idénticas (compuestas por la región variable, V_H y tres dominios constantes CH 1/2/3) y dos cadenas livianas (compuestas por la región variable V_L, y la región constante C_L) unidas por un enlace disulfuro. Abajo, en F_v se muestra la región de unión a antígeno, compuesta por V_H y V_L unidos por un *linker* peptídico. En (B), se observa la estructura de los anticuerpos de cadena pesada provenientes de camélidos, que consisten en

dos cadenas pesadas idénticas compuestas por la región variable ($V_{\text{H}}\text{H}$) y dos regiones constantes, (CH 2/3). Abajo, se muestra la región de unión al antígeno compuesta por un dominio variable único ($V_{\text{H}}\text{H}$) o nanocuerpo (Figura modificada de Jovčevska & Muyldermans, 2019).

Estos nanocuerpos muestran grandes ventajas comparativas respecto a los anticuerpos tradicionales, entre las cuales se encuentra su prolongada vida media, en un rango entre -20 [°C] a 4[°C], mayor tolerancia a incrementos de temperatura (rangos entre 60[°C] a 80[°C] y varias semanas a 37[°C]). Además, de singular resistencia a degradación proteolítica, denaturantes químicos, presiones elevadas, pH no fisiológico (Jovčevska & Muyldermans, 2019) y facilidad de producción recombinante. Por otro lado, se han obtenido niveles de hasta 10 [mg·L⁻¹] utilizando *E. coli* en matraces de Erlenmayer, y niveles incluso mayores a 100 [mg·L⁻¹] en cultivos de *S. cerevisiae* (Revetz y col, 2005). Las aplicaciones en medicina de estos nanocuerpos son variadas, se han utilizado para diagnóstico y terapia inmunogénica contra el cáncer, imaginería médica, tratamiento de enfermedades intestinales, enfermedades inflamatorias inmunomediadas y patologías asociadas al sistema nervioso central, entre otras (Singh y col 2019; Salvador y col 2019).

Como se mencionó anteriormente, estos nanocuerpos se han producido exitosamente en sistemas tradicionales como *E. coli* y *S. cerevisiae*. En el caso de *C. reinhardtii*, se tiene el antecedente de producción de tres distintos nanocuerpos asociados a la actividad antitoxina contra la neurotoxina botulínica, la cual se ha desarrollado a nivel de cloroplasto (Barrera y col, 2015). Sin embargo, desde la perspectiva de transformación nuclear, la cual permite que posteriormente la proteína transgénica pueda ser secretada al medio, no hay evidencia de producción de nanocuerpos. En dicho marco *C. reinhardtii* puede tomar especial interés, debido a la escasa inmunogenicidad que han presentado al ser aplicada *in*

vivo en modelos murinos (Chávez y col, 2015), transformando a este microorganismo, en la biofábrica ideal para liberación local de estas moléculas.

1.5.- El nanocuerpo KN035: Nueva alternativa para el tratamiento del cáncer.

Dentro de los nanocuerpos asociados a patologías cancerígenas destaca el nanocuerpo KN035. Este nanocuerpo, de 127 aminoácidos con un peso de 13,5 [kDa], ha sido descrito como un competidor de PD-1 en términos de afinidad por PD-L1. La molécula PD-1 es un receptor de transmembrana tipo I, que es expresado en la superficie de las células T, y que naturalmente posee afinidad por PD-L1 la cual, es expresada en Linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas (Okazaki & Honjo, 2006; Zhang y col, 2017). KN035 tiene la capacidad de unirse a la misma superficie de PD-L1 en cual PD-1 se une, interrumpiendo así la interacción PD-1//PD-L1, la cual a su vez está asociada a una limitación de la actividad de células T, células B, macrófagos y células dendríticas. La reciente interacción mencionada, corresponde a un grupo de interacciones conocidas como vías *checkpoint* del sistema inmune que se encargan de mantener la autotolerancia y prevenir la autoinmunidad (Okazaki y col, 2001; Okazaki & Honj, 2006; Zhang y col, 2017). Sin embargo, estas vías *checkpoint*, incluyendo la que media la interacción PD-1//PD-L1, pueden ser usurpadas por células tumorales para generar inmunosupresiones locales y atenuar la respuesta antitumoral endógena. Este fenómeno se ha observado en cáncer de intestino, mama, leucemia y melanomas (Akbay y col 2013; Shi y col, 2013; Zhang y col, 2017). Es así como, se torna atractiva la posibilidad de interrumpir la interacción PD1//PD-L1, con el objetivo de revertir los efectos que ésta conlleva cuando

es ejecutada por células tumorales. En este plano, el nanocuerpo KN035 toma fuerza como alternativa terapéutica debido a su fuerte afinidad con PD-L1.

Considerando las estrategias de ingeniería genética desarrolladas para *C. reinhardtii* en materias de producción heteróloga de proteínas, junto con los avances en biología molecular y biología sintética para el diseño tanto *in silico* como molecular de vectores y construcciones genéticas, se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

***C. reinhardtii* puede ser utilizada como plataforma para la producción del nanocuerpo recombinante KN035.**

Para comprobar aquello, se propone como objetivo general:

Generar una cepa genéticamente modificada de *C. reinhardtii* que produzca el nanocuerpo recombinante KN035.

Del objetivo general, se desprenden los siguientes objetivos específicos:

O.E 1: Diseñar y generar un vector que permita la inserción de un casete de expresión para KN035 en *C. reinhardtii*.

O.E 2: Generar líneas genéticamente independientes que presenten en su genoma el casete de expresión para KN035.

O. E 3: Corroborar la expresión de la construcción codificante para KN035 en *C. reinhardtii* a nivel de transcrito

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Obtención de secuencias y generación de la construcción **Ars2-KN035-6xHis**.

A partir de la literatura (Zhang y col, 2017) se obtuvo la secuencia aminoacídica codificante para KN035 la cual posteriormente fue llevada a secuencia de bases nitrogenadas utilizando la herramienta de conversión de secuencias ofrecida por el *European Bioinformatic Institut* (EMBL-EBI), seleccionando específicamente la tabla propuesta para *C. reinhardtii*. Tras esto, se introdujo la secuencia obtenida en el optimizador de codones de IDT configurándolo para que realice la optimización específica para *C. reinhardtii*. En una lógica similar, la secuencia codificante para el péptido señal de la proteína Arilsulfatasa II (Ars2) fue obtenido desde la base de datos *Uniprot*, los primeros 21 aminoácidos de su secuencia de acuerdo con la literatura (Chávez y col, 2015). Esta secuencia fue transformada utilizando las mismas herramientas y siguiendo el mismo protocolo ya mencionado para finalmente, ser anexada en el 5' de la construcción para KN035.

Respecto al marcaje de histidina, éste se diseñó utilizando los tripletes CAT y CAC en repeticiones de forma que no existiera posibilidad de auto hibridación, para luego agregar un codón de término (TAA) tras el arreglo. Posteriormente, se anexó al 3' de la secuencia para KN035 de forma que se generara una proteína quimera Ars2-KN035-6xHis. Finalmente, al extremo 5' de la construcción se le anexaron 20 [pb] homólogos al extremo 3' del promotor *psaD* presente en el vector Pbc1-VEGF y al extremo 3' de la construcción

se le agregaron 20 [pb] homólogos al extremo 5' del terminador *psaD* del vector Pbc1-VEGF (Tabla 3).

La síntesis artificial de la construcción se realizó utilizando la tecnología *g-block* (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) para lo cual, la secuencia fue sometida a los algoritmos de prueba de síntesis, modificándose según los requerimientos del fabricante y la tecnología, detallado en la sección de resultados. Para referenciar a dicha construcción dentro de las siguientes secciones se utilizará el término Lg. Finalmente, se diseñó un par de partidores que pudiese amplificar en su totalidad dicha construcción anclándose en la zona de homología antes descrita. Estos partidores corresponden a R gblock y F gblock (Tabla 1)

2.2.- Diseño *in silico* de las piezas de DNA y partidores para *Gibson Assembly*.

Con la moción de ensamblar un vector capaz de permitir la transformación de las algas y, que además asegure la posibilidad de que la construcción diseñada anteriormente sea expresado, se decidió que la metodología utilizada para obtener dicho vector sería *Gibson Assembly*. Para diseñar las piezas de DNA que conformarían el vector se utilizó el *software Snap Gene* (Insightful Science, San Diego, USA), el vector Pbc1-VEGF fue designado como molde para generar las piezas de DNA del nuevo vector. De esta manera se diseñaron 6 partidores, notados F por *Forward* y R, por *Reverse* los cuales traerían como resultado 3 de las piezas esenciales, amplificando 3 regiones distintas de este vector. Los partidores utilizados se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1: Partidores diseñados para la generación de piezas para Gibson Assembly. El último corresponde a un par de partidores que amplifican una región de un gen endógeno de *C. reinhardtii* sirviendo por ende como control positivo de las reacciones posteriores.

Nombre	Largo [pb]	Tm [°C]	Molde	Amplición esperado [pb]	Secuencia
R gblock	21	57	Ars2-KN035-6xHis	505	TGCTACTCACAACAAGCCCAA
F gblock	21	60	Ars2-KN035-6xHis	505	TCCAGCTGCTGCCAGAATTCT
F1	45	75	Pbc1-VEGF	2099	AACACGGCGAGAGCACCCATTGGGCTTGTGTGAGTAGCAGTGGG
R4	21	60	Pbc1-VEGF	2099	GTTAGCTCCTTCGGTCTCTCCG
F4	26	61	Pbc1-VEGF	2051	CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATC
R3	20	62	Pbc1-VEGF	2051	ATGGGGCGGTATCGGAGGAA
F3	22	63	Pbc1-VEGF	2161	CAGCCGGTAAAACGCCAGCTTT
R2	42	70	Pbc1-VEGF	2161	ACCACCATCACCATCATTAAAGAATTCTGGCAGCAGCTGGACC
psbD F	19	54	psbD	413	GTTGGTGTCAACTTGGTGG
psbD R	16	50	psbD	413	GCCGTAGGGTTGAATG

Las secuencias notadas, L1, L2 y L3 tienen igual secuencia al molde Pbc1-VEGF, donde cada una tiene homología en los extremos 5' y 3' con aquella que es contigua debido al propio diseño de los partidores. Las homologías prediseñadas entre cada pieza de DNA se detallan a continuación incluyendo también la construcción Lg.

Tabla 2: Piezas de DNA diseñadas con zonas de homología. Se detalla el largo de los brazos de homología presente entre cada una de las piezas.

Pieza	Pieza	Largo zona homología [pb]
L2	L3	46
L3	L1	20
L1	Lg	20

Lg	L2	20
----	----	----

Cada uno de los PCR se simuló en el *software Snap Gene* (Insightful Science, San Diego, USA), utilizando la herramienta PCR para luego con la herramienta “*Gibson Assembly*” seleccionar cada una de estas piezas y ensamblarlos, obteniendo un vector titulado Pbc1-KN035 de un tamaño esperado de 6649 [pb] (Tabla 3).

Tabla 3: Vectores binarios utilizados para generar distintas variantes de *C. reinhardtii*.

Nombre	Tamaño [pb]	Descripción	Referencia
Pbc1-VEGF	6755	Binario. Permite expresión y secreción de VEGF en <i>C. reinhardtii</i>	Chavez y col, 2015.
Pbc1-KN035	6649	Binario. Permite expresión y secreción de nanocuerpo KN035 en <i>C. reinhardtii</i>	Este trabajo

2.3.- Transformación de bacterias quimiocompetentes.

Una alícuota de bacterias *E. coli* TOP 10 quimiocompetentes previamente fue descongelada por 17 [min] en hielo para luego añadir un [μg] de vector agitando suavemente con micropipeta. Tras ello, se incubó por 20 [min] en hielo para luego ser sometidas a un *heat shock* a 42 [°C] por un [min]. De inmediato fueron traspasadas a hielo y se incubaron por 5 [min]. Posteriormente, en presencia de un mechero bunsen se traspasaron 250 [μL] de medio LB estéril al tubo con las bacterias y se incubó a 37 [°C]

por 1 [h], en agitación constante para luego sembrar 100 [μL] en placas de LB agar con ampicilina 100 [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]. Finalmente, se incubó a 37 [$^{\circ}\text{C}$] por una noche.

2.4.- Extracción de DNA plasmidial desde bacterias transformadas.

Se inóculo tubos para crecimiento bacteriano con colonias de *E. coli* TOP 10 transformados que contenían 10 [mL] de medio LB líquido con 100 [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] de ampicilina. Estas se dejaron creciendo a 37 [$^{\circ}\text{C}$] con agitación constante por una noche. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 3.000 [rpm] por 10 [min]. La extracción del DNA plasmidial se realizó utilizando el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Los pellets fueron resuspendidos en 250 [μL] de solución de resuspensión y traspasados a un tubo de 1,5 [mL] donde se les añadió 250 [μL] de solución de lisis, se mezcló por inversión del tubo. Posteriormente, se añadió 10 [μL] de proteasa alcalina y se mezcló por inversión, se dejó incubar por 5 [min] a temperatura ambiente. Luego se agregó 350 [μL] de solución neutralizadora y se mezcló por inversión. Finalmente, los tubos fueron centrifugados a 13.000 [rpm] por 15 [min]. Paralelamente, se prepararon las columnas proporcionadas por el kit, montando estas en los tubos colectores. Al finalizar el proceso de centrifugación, el sobrenadante fue traspasado a dichas columnas. Se dejó decantar el sobrenadante en la columna, posteriormente las columnas se centrifugaron a máxima velocidad por un [min] a temperatura ambiente. Se descartó el eluido y se reutilizó el tubo colector. Se añadió a cada uno de los tubos 750 [μL] de solución de lavado y se centrifugó a máxima velocidad por un [min]. Se descartó el eluido y se reutilizó el tubo colector, para repetir la anterior acción, pero esta vez con 250 [μL] de solución de lavado. Posteriormente, se centrifugó

por 2 [min] a máxima velocidad y se traspasaron las columnas a nuevos tubos de 1,5 [mL] estériles. Finalmente, se agregó 50 [μL] de agua libre de nucleasas a la columna y se efluyó centrifugando por un [min] a máxima velocidad.

2.4.1- Cuantificación de ácidos nucleicos

Se añadieron 2 [μL] de muestra de material genético en diferentes pocillos de la herramienta Take3™ Micro-Volume Plate (BioTek, Santa Clara, USA), para luego ser introducido en el lector de placas Epoch 2 Microplate Spectrophotometer (BioTek, Santa Clara, USA). Las muestras fueron analizadas utilizando el *software* Gen5 (BioTek, Santa Clara, USA), seleccionando la opción Take 3, nucleic acids quantification, dsDNA.

2.5.- Obtención de piezas L1, L2 y L3 para *Gibson Assembly*.

La generación de las piezas de *Gibson* L1, L2 y L3, fue realizada mediante PCR. Cada reacción contenía los siguientes reactivos: 6 [μL] 5X Phusion GC *buffer* (ThermoFisher, Waltham, USA), 20,6 [μL] de agua libre de nucleasas, 0,6 [μL] de *mix* dNTPs 10 [mM]; 0,75 [μL] de alícuota de partidor *Forward* 10 [μM], 0,75 [μL] de alícuota de partidor *Reverse* 10 [μM]; 0,3 [μL] de Phusion DNA Polymerase 2[U·μL⁻¹] (ThermoFisher, Waltham, USA), y 347 [ng] de vector Pbc1-VEGF. Los detalles de las piezas generadas y los partidores utilizados se detallan a continuación:

Tabla 4: Partidores asociados a la producción de cada pieza de DNA del nuevo vector.

Partidor <i>Reverse</i>	Partidor <i>Forward</i>	Nombre asignado a la pieza	Temperatura <i>annealing</i> del par de partidores [°C]	Tamaño Pieza [pb]
R2	F3	L1	68	2161
R3	F4	L3	62	2051
R4	F1	L2	70	2099
R gblock	F gblock	Lg	62	505

Las reacciones se dispusieron en un termociclador, el cual fue configurado de la siguiente manera: calentamiento inicial a 98 [°C] por 10 [min], seguido de 30 ciclos con una denaturación inicial a 98 [°C] por 30 [s], fase de *annealing* por un [min] a la temperatura señalada en la Tabla 4, seguido de una fase de extensión a 72 [°C] por 90 [s]. Finalmente, tras terminar los ciclos se realizó una extensión final a 72 [°C] por 10 [min].

2.5.1- Electroforesis en gel de agarosa.

Se preparó agarosa al 2% y 3% según sea el caso en *buffer* TAE 1X (Tris-Cl 20 [mM], ácido acético 10 [mM] y EDTA 0,5 [mM]), posteriormente se agregó 15 [µL] de *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Waltham, USA). La mezcla se dispuso en un molde para geles y se esperó su solidificación para ser llevado a la cámara de electroforesis, dónde se sumergió el gel completamente en *buffer* TAE 1X. A cada uno de los tubos que fueron sometidos al PCR, se agregó 2 [µL] de *Gel Loading Dye, Purple* (6X), no SDS (New England Biolabs, Ipswich, USA). Las muestras fueron corridas a 120 [V] constante por 20 o 40 [min] según sea el caso. Finalmente, los fragmentos de DNA fueron visualizados

utilizando un transiluminador UV modelo Large blue LED transilluminator (IO Rodeo, Pasadena, USA).

2.5.2- Extracción de DNA desde gel de agarosa.

Sobre una superficie cubierta con mica, se hizo una incisión en el gel de agarosa previamente visualizado, se recortaron bloques que permitieran aislar las bandas deseadas del resto del gel. Tras eso se asignó a cada tamaño de banda deseado un tubo de 1,5 [ml] el cual se masó para posteriormente depositar dentro de este tubo todos los bloques asociados a ese tamaño de banda y se volvió a masar. Con la diferencia de las masas se determinó la masa de gel que hay en cada uno de los tubos, para luego con el *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up* (Promega, Madison, USA) realizar la extracción de DNA desde el gel siguiendo las instrucciones del fabricante, comenzando con añadir 10 [µL] de solución de unión de membrana por cada 10 [µg] de gel en el tubo. Se agitó en vortex la mezcla de cada tubo y se incubaron a 60 [°C] por 10 [min] intercalando vortex cada dos [min] para asegurar el correcto derretir del gel en cada tubo. Se traspasó el contenido de los tubos a las columnas *SV minicolumn* ensambladas en tubos colectores y se dejaron incubar a temperatura ambiente por un minuto. Luego, se centrifugaron las columnas a 14.000 [rpm] por un [min], se descartó el eluido en cada una y se reutilizaron los tubos colectores. Más tarde, se añadieron 700 [µL] de solución de lavado de membranas, se centrifugó por un [min] a 14.000 [rpm] y se eliminó lo eluido reutilizando los tubos colectores. Se repitió la acción anterior, pero esta vez con 500 [µL] de solución de lavado y se centrifugó por 5 [min] a 14.000 [rpm]. Tras ello se descartó el eluido de cada uno de los tubos y nuevamente se centrifugó por un [min] a la misma velocidad anterior. Luego

se traspasaron las columnas a tubos de 1,5 [mL] y se agregaron 50 [μ L] de agua libre de nucleasas, se incubó a un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 14.000 [rpm] por un [min]. Posteriormente, el DNA fue cuantificado siguiendo el protocolo descrito anteriormente (sección 2.4.1)

2.6.- Ensamblaje de vectores por medio de *Gibson Assembly*.

2.6.1- Cálculo de las concentraciones equimolares de las piezas para *Gibson Assembly*.

Para asegurar un correcto ensamblaje de las piezas durante la reacción de *Gibson Assembly* es necesario que cada pieza sea dispuesta en una cantidad equimolar determinada. Para calcular aquello se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned}
 \mathbf{A} \text{ pmol} &= \frac{\left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right] * 1000}{\text{Largo pieza (bp)} * 650} \\
 \mathbf{B} \text{ Relación de volumen de una pieza} &= \frac{\text{Factor}}{\text{pmoles pieza}} \\
 \mathbf{C} \text{ Vol. a añadir de una pieza} &= \left(\frac{\text{Volumen final}}{\text{Suma relación de volumen de piezas}} \right) * \text{Relación de volumen de la pieza}
 \end{aligned}$$

Figura 5: Relaciones matemáticas que permiten encontrar la cantidad equimolar necesaria para cada una de las piezas a usarse en el ensamblaje del vector Pbc1-KN035. Con lo observado en A es posible calcular la cantidad de picomoles de la pieza a partir de su concentración en unidades de [ng/ μ L] y el largo de la pieza. El número 1.000 permite pasar de [ng] a [pg] mientras que el número 650 corresponde al peso molecular promedio de un nucleótido. La relación de volumen de una pieza, detallada en B, se puede obtener utilizando el factor asociado al largo de la pieza, el cual puede ser 0,01 para piezas de más de 2500 [pb], 0,03 si la pieza tiene un tamaño entre 200 [pb] y 2.500 [pb], o 0,05 si la pieza es menos a 200 [pb]. Esta

relación de volumen de una pieza es necesaria para determinar el volumen a añadir a la reacción de cada pieza, relación que es mostrada en C, donde el volumen total de reacción electo es dividido por la suma de las relaciones de volumen d una pieza y multiplicado este cociente por la relación de volumen de la pieza a determinar su volumen en cuestión.

A partir de lo expuesto en la Figura 5, y habiendo determinado que el volumen necesario para la mezcla de piezas corresponde a 6 [μL], se determinaron las cantidades de cada una de las piezas presentes en cada mezcla, teniendo en la primera mezcla la pieza Lg proveniente directamente del *g-block* sintetizado por IDT. La segunda mezcla contiene la pieza Lg_a, esta pieza proviene de la amplificación de la construcción Ars2-KN035-6xHis.

Tabla 5: Volúmenes y concentraciones utilizadas para obtener cantidades equimolares de cada una de las piezas utilizados en la mezcla I de piezas.

Mezcla I			
Pieza	Volumen [μL]	Concentración [ng/μL]	Factor Pieza
L1	1,98	27,82	0,03
L2	1,53	35,04	0,03
L3	1,20	43,43	0,03
Lg	1,29	10,00	0,03
Total	6,00	-	-

Tabla 6: Volúmenes para cantidades equimolares de cada una de las piezas utilizados en la Mezcla II de piezas.

Mezcla II			
Pieza	Volumen [μL]	Concentración [$\text{ng}/\mu\text{L}$]	Factor Pieza
L1	2,40	27,82	0,03
L2	1,85	35,04	0,03
L3	1,46	43,43	0,03
L _{ga}	0,29	53,80	0,03
Total	6,00	-	-

2.6.2- Gibson Assembly.

Para la reacción de *Gibson Assembly* se mezcló en un tubo de 0,6 [mL], 100 [μL] de *buffer* de reacción isotérmica 5X (PEG-8000 al 25%, Tris-HCl pH 7,5, 500 [mM], MgCl_2 50 [mM], DTT 50 [mM], dNTPs 1 [mM] por cada uno de los cuatro, y NAD 5 [mM]), 2 [μL] de T5 exonucleasa 10 [$\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$], 6,25 [μL] de Polimerasa *Phusion 2* [$\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$], 50 [μL] de *Taq DNA ligasa* 40 [$\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$], 216,75 [μL] de agua libre de nucleasas para un volumen final de 375 [μL] de mezcla de reacción en un paso. A dos tubos de 0,2 [mL] se le añadieron 4,5 [μL] de esta mezcla para guardar el resto a -20 [°C]. Posteriormente al primer tubo se le añadió 1,5 [μL] de mezcla I mientras que al segundo se le añadió la misma cantidad de la mezcla II.

La mezcla se llevó posteriormente a un termociclador, donde se configuró un programa de 65 [min] a 50 [°C]. Una vez terminada la reacción se transformaron dos una alícuotas

de 50 [μl] de *E. coli TOP10*, siguiendo el protocolo antes descrito (sección 2.3), aplicando todo el volumen de material genético para la transformación. Posteriormente se sembró en placas con medio LB y ampicilina.

2.7.- PCR

En tubos de 0,2 [mL] se añadió 2 [μL] de 5X *Green GoTaq® Flexi buffer*; 4,45 [μL] de agua libre de nucleasas; 1,6 [μL] de MgCl₂ 25 [mM]; 0,25 [μL] mix dNTPs 10 [mM]; 0,25 [μL] de Partidor *Forward* 10 [μM], 0,25 Partidor *Reverse* 10 [μM] y 0,25 [μL] de *GoTaq® DNA Polymerase* 5 [U·μl⁻¹] (Promega, Madison, USA) y agua para un volumen final de 10 [μL]. Según sea el caso la Tabla 7 anuncia la cantidad de DNA, origen, temperatura de *annealing* y pares de partidores utilizados. En el caso del PCR de colonias se utilizó 1 [μL] de agua previamente inoculada

Las muestras se dispusieron en un termociclador modelo Axygen MaxyGene II (Axygen Scientific, Union City, USA), el cual fue configurado de la siguiente forma un ciclo inicial a 95 [°C] por 10 [min], luego 30 ciclos con una denaturación inicial a 95 [°C] por 30 [s], fase de *annealing* por un min a T° señalada en Tabla 7 según sea el caso y una fase de extensión a 72 [°C] de 90 [s], tras terminar los ciclos, se realizó una extensión final a 72 [°C] por 10 [min].

Tabla 7: Condiciones particulares para cada reacción de PCR.

Caso	Origen DNA	Cantidad DNA [ng]	Par de partidores	T° Annealing
PCR colonias	<i>E. coli TOP 10</i>	-	R3-F4	62
PCR sobre DNA nuclear aislado de <i>C. reinhardtii</i>	<i>C. reinhardtii</i> UVM11 KN035,	80 a 130 dependiendo de la cepa	F gblock y R gblcok	67
	UVM4 KN035 (Heterogéneas), UVM4 GFP y Pbc1-KN035		psbD R y psbD F	54
PCR en gradiente	<i>C. reinhardtii</i> UVM4 KN035 (Heterogénea) y UVM4 GFP	80 a 130 dependiendo de la cepa	F gblock y R gblcok	60, 63,65 y 67
PCR sobre clones derivados de UVM4 KN035	<i>C. reinhardtii</i> 4K1,	210 a 310 dependiendo de la cepa	F gblock y R gblcok	67
	4K2, 4K4, 4K5, 4K6 y 4K7, UVM4 wt, y vector Pbc1-KN035		psbD R y psbD F	56
PCR sobre clones derivados de UVM11 KN035	<i>C. reinhardtii</i> 11K1,	380 a 525 dependiendo de la cepa	F gblock y R gblcok	67
	11K2, 11K4, 11K5, 11K7 y 11K8, UVM11 wt y vector Pbc1-KN035		psbD R y psbD F	56

2.8.-Transformación de *C. reinhardtii* y selección de transformantes.

2.8.1- Tratamiento *glass beads*.

En tubos de 1,5 [mL] se depositaron 0,3 [g] de *glass beads* de 0.5 [mm] de diámetro (Merck, Darmstadt, Alemania), se agregó 1 [mL] de ácido clorhídrico 0,25 [M] y se incubó por una noche. Luego, se retiró el ácido clorhídrico, y se realizaron 4 lavados con agua en agitación hasta que se alcanzó un pH cercano a 7,0. Tras ello se secaron en su totalidad en estufa a 65 [°C] para más tarde, ser autoclavadas.

2.8.2- Transformación de *C. reinhardtii* vía *glass beads*.

Cultivos de 1 semana de las cepas UVM11 y UVM4 (Neupert y col, 2009) (se agitaron manualmente para luego extraerles 50 [μL] y traspasarlos a tubos de 1,5 [mL] en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Estas alícuotas se llevaron al microscopio y usando un aumento 10x se evaluó la salud de cada uno de los cultivos. Tras ello se extrajo 10 [μL] de la alícuota de cultivo tomada para diluirla en 990 [μL] de medio TAP líquido (1:100). Esto se agitó en vortex y se extrajeron por cada una de las cepas 10 [μL] para aplicarlos en la cámara de Neubauer y contar en microscopio Leica DMI1 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con un aumento de 10 X. Una vez contada se utilizó la fórmula detallada en la Figura 6.

$$[\text{Concentración}] \left[\frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right] = \frac{N^{\circ} \text{ total Celulas} \times 10.000}{N^{\circ} \text{ Cuadrantes} \times \text{Factor dilución}}$$

Figura 6: Fórmula para determinar concentraciones en cultivo utilizando placa de Neubauer. Permite calcular la concentración de un cultivo en unidades de [células·mL⁻¹]. El número de cuadrantes corresponde

a 5 y el factor de dilución puede ser 0,1 si se trata de una dilución 1:10 o 0,001 si se trata de una dilución 1:100.

Una vez conocida las concentraciones de los diferentes cultivos se recolectaron las células y se centrifugaron por 5 [min] a 1.000 x g a temperatura ambiente. Luego se resuspendieron en medio TAP líquido para ajustarlos a una concentración de 3×10^7 [células·mL⁻¹]. Una vez ajustadas las concentraciones de cada uno de los cultivos, se transfirió 1 [mL] a 3 tubos por cepa que contenían los *glass beads* estériles. Después, se agregaron 5 [µg] del vector Pbc1-KN035 a cada uno de los tubos mencionados. Los tubos se llevaron al vortex y se mezclaron por 20 [s] a máxima potencia. Terminado, se dejaron reposar por 5 [min] para que los *beads* decantaran. Luego, el sobrenadante fue transferido a alícuotas de 5 [mL] de TAP líquido contenidos en tubos de 15 [mL] y se dejaron incubar por la noche envueltos en papel aluminio y a agitación constante. Al día siguiente, se centrifugaron los cultivos a 1.000 x g por 5 [min] a temperatura ambiente, para luego resuspenderlas en 300 [µL]. Finalmente, 100 [µL] de transformante fueron utilizados para inocular 15 [mL] de medio TAP con 10 [µg·mL⁻¹] de paromomicina para cada una de las UVM4 KN035, UVM11 KN035 recién transformadas junto con muestras de las cepas UVM4 y UVM4 GFP. Estos se dejaron en agitación y luz constante a temperatura ambiente por 25 días. Posteriormente, los cultivos que presentaron crecimiento positivo fueron refrescados, en las mismas condiciones de medio e incubación, cada 1 semana durante 4 semanas en total. Tras ello se centrifugaron por 5 [min] a 2.000 [rpm], a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y el *pellet* se traspasó a placas de TAP

agar con $10 [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$ de paromomicina. Estas placas se renovaron cada 10 días evaluando el efecto que el antibiótico poseía sobre su crecimiento.

2.8.3- Extracción de DNA nuclear de *C. reinhardtii*.

Se cultivaron a luz constante y agitación por 10 días muestras de las cepas UVM4 KN035, UVM11 KN035, UVM4 GFP y UVM4 en 100 [mL] de TAP líquido con $10 [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$ de paromomicina para las primeras tres y 100 [mL] de TAP líquido para el caso de la cepa silvestre. Pasado el tiempo, se centrifugó todo el volumen a 2.000 [rpm] por 5 [min] y se transfirió la mayor cantidad de *pellet* a tubos de 1,5 [mL] previamente masados. Luego, utilizando el kit *DNAeasy plant minikit* (Qiagen, Hilden, Alemania) se siguieron las instrucciones para aislar el DNA nuclear de las microalgas, agregando 400 [μL] de *buffer A1* y 4 [μL] de la solución madre de *RNAse A* $100 [\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}]$ a cada uno de los tubos con *pellet*, se mezcló con vortex y pipeteo. Luego se incubaron los tubos por 10 [min] a 65 [°C] mezclando el tubo por inversión 3 veces durante la incubación. Terminado se agregaron 130 [μL] de *buffer P3*, se mezcló con la pipeta y se incubó por 5 [min] en hielo. Tras ello, se centrifugaron los tubos durante 5 [min] a 14.000 [rpm] y el lisado de cada uno se transfirió a una columna *QIAshredder Mini* ensamblada en un tubo colector. Estas columnas se centrifugaron por 2 [min] a 14.000 [rpm]. En cada columna se recolectó el eluído sin alterar el sedimento de residuos celulares dejado tras la centrifugación y se depositó en un tubo de 1,5 [mL] nuevo. Más tarde se agregó 1,5 volúmenes de *buffer AW1* a cada uno de los tubos y se mezcló con pipeteo. Luego, se tomaron 650 [μL] de esta mezcla por cada cepa y se transfirieron a la columna *DNeasy Mini*, previamente dispuesta en un tubo colector. Estas se centrifugaron por un minuto a 10.000 [rpm] y luego se

desechó el eluído. Finalizado, se llevaron las columnas *DNeasy Mini* a nuevos tubos colectores de 2 [mL] y se agregó a cada uno 500 [μL] de *buffer AW2*, para luego centrifugar por un minuto a 10.000 [rpm]. Se desechó el eluído y se reutilizó el tubo colector para repetir este mismo paso, pero centrifugando esta vez por 2 [min] a 14.000 [rpm]. Se transfirieron las columnas a tubos de 1,5 [mL] y se agregaron 75 [μL] de *buffer AE* directamente sobre la membrana. Se incubó por 5 [min] a temperatura ambiente y luego se centrifugaron por un [min] a 10.000 [rpm]. El eluído obtenido volvió a ser aplicado sobre la membrana, incubándose 5 [min] a temperatura ambiente para nuevamente centrifugar. Posteriormente, el DNA fue cuantificado siguiendo el protocolo descrito anteriormente (sección 2.4.1).

2.8.4- Aislamiento y establecimiento de líneas clonales derivadas de transformantes UVM11 y UVM4.

Se sembraron 150 [μL] de cultivo líquido de las cepas UVM11 KN035 y UVM4 KN035 de las cuales ya se había comprobado que existía presencia de la construcción, en placas Petri con medio TAP agar con 10 [μg·mL⁻¹] de paromomicina. Se dejaron crecer por 3 semanas bajo iluminación constante hasta la aparición de colonias. De cada placa, se seleccionaron 8 colonias por cepa, para ser traspasadas a nuevas placas TAP agar con 10 [μg·mL⁻¹] de paromomicina. Estas se establecieron en el tiempo siendo resembradas cada dos semanas en placas con el mismo medio y condiciones.

2.9.- RT-PCR sobre líneas portadoras del casete *Ars2-KN035-6xHis*.

2.9.1- Extracción de RNA total de *C. reinhardtii*.

Se cultivaron a luz y agitación constante por 10 días tres líneas clonales derivadas de transformadas de UVM11 (líneas 11K1, 11K5 y 11K7) (Tabla anexo I) junto con las cepas UVM4 GFP y UVM11 *wt* en 100 [mL] de TAP líquido con 10 [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$] de paromomicina para las primeras cuatro y 100 [mL] de TAP líquido para el caso de la cepa silvestre. Tras ello se contaron las células y se ajustaron las concentraciones según lo descrito previamente, de tal forma que se obtuvo una concentración por cultivo de 10^7 [células $\cdot\text{mL}^{-1}$] en tubos de 1,5 [mL]. Utilizando el Kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) se siguió el protocolo señalado por el fabricante añadiéndose a cada uno de estos cultivos 600 [μL] de *buffer RLT* y posteriormente mezclados con vortex a máxima velocidad. En seguida, se añadió 1 volumen de etanol 70% a cada uno de los tubos y se mezcló con pipeta. De cada una de estas mezclas, fueron transferidos 700 [μL] a columnas *RNeasy Mini Spin* dispuesta en tubos colectores de 2 [mL], se centrifugó por 15 [s] a 10.000 [rpm] y luego se descartó el eluido. Usando ahora el producto *RNase-Free DNase Set* (Qiagen, Hilden, Alemania) se realizó la eliminación de trozos de DNA residuales aislados. Para ello, siguiendo instrucciones del fabricante, se agregó 350 [μL] de *buffer RW1* a cada una de las columnas y tras ello se centrifugaron a 12.000 [rpm] descartando posteriormente el eluido. A continuación, en tubos de 0,6 [mL] se mezclaron 10 [μL] de *DNase I* con 70 [μL] de *buffer RDD* de forma que por cada columna exista una mezcla. Luego se vertieron los 80 [μL] de la mezcla, previamente preparado, en cada una de las columnas y se incubó a 25 [°C] por 15 [min]. Pasado este tiempo, se agregó 350 [μL] de *buffer RW1* a cada una

de las columnas y se centrifugó por 15 [s] a 12.000 [rpm] para luego descartar el eluido. Terminado esto, se añadieron 500 [μL] de *buffer RPE* a cada una de las columnas y se centrifugó por 15 [s] a 12.000 [rpm] y se descartó el eluido. Esta acción se repitió centrifugando esta vez por 2 [min] a la misma velocidad. Posteriormente las columnas fueron transferidas a un nuevo tubo colector y se centrifugaron a máxima velocidad por un minuto. Finalmente, se transfirieron las columnas a tubos de 1,5 [mL] y se añadieron 40 [μL] de agua libre de *RNasa* directo sobre las membranas de cada una de las columnas. Se centrifugaron luego por un [min] a 12.000 [rpm] para eluir el RNA, luego se repitió este paso reemplazando el agua por el eluido obtenido anteriormente. Posteriormente las muestras se guardaron a -80 [°C].

2.9.2- RT-PCR.

Utilizando el kit *Transcriptor One Step RT-PCR kit* (Roche, Basilea, Suiza) en tubos de 0,6 [mL] se mezclaron 10 [μL] de *buffer 5X*, 2 [μL] de partidior *Forward* 10 [mM], 2 [μL] de partidior *Reverse* 10 [mM], 1 [μL] de *Enzyme Mix*. Los partidiores utilizados en los tubos de la condición problema correspondieron a *Ars2-KN035 R* y *Ars2-KN035 F* (Tabla 8). En un caso paralelo se realizó otra condición experimental utilizando los partidiores *KN035 Par1 F* y *KN035 Par 1 R* (Tabla 8). Para el caso del control positivo para ambas recciones, se utilizó la misma metodología añadido los partidiores *Actina F* y *Actina R* (Tabla 8). Se tomaron 15 [μL] de las mezclas anteriormente descritas, para luego agregar por cada una de 2 [μg] de RNA y rellenar con agua para un volumen final de 50 [μL].

Luego los tubos fueron dispuestos en un termociclador configurado para una reacción de retro-transcripción por 30 [min] a 50 [°C], una activación inicial de PCR a 94 [°C] por 5 [min], para dar paso a 35 ciclos de denaturación a 94 [°C] por 10 [s], *annealing* por 30 [s] según las temperaturas descritas por la Tabla 8 para cada par de partidores, finalizado los ciclos con una extensión final de 10 [min] a 68 [°C]. Posteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 3%, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (sección 2.5.1).

Tabla 8: Partidores diseñados para RT-PCR.

Nombre	Largo [pb]	Tm [°C]	Molde	Amplicón esperado [pb]	Secuencia
Ars2-KN035 F	21	61	Ars2-KN035	424	TGCGTACCCTGACCCCAGTAC
Ars2-KN035 R	20	60			CTCTCGCCGTGTTTGCTGTG
KN035 Par 1 F	20	58	KN035	183	GCGCAGTAGTACATAGCGGT
KN035 Par 1 R	20	58			GTT TCG TCA GGC ACC TGG TA
KN035 6xHis F	22	60	KN035-6xHis	384	AATGATGGTGATGGTGGTGGC T
KN035 6xHis R	20	62			AGTCGGGTGGTGGACTCGTG
KN035 Par 4- 7 F	20	57	KN035	136	GTGGACTTCGCGTTGTTCTG
KN035 Par 4- 7 R	20	58			GCATGGCTTGGTTTCGTCAG

3. RESULTADOS

O.E 1: Diseñar y generar un vector que permita la inserción de un casete de expresión para KN035 en *C. reinhardtii*.

3.1.- Diseño *in silico* y generación de un vector que permita la inserción de un casete de expresión para KN035 en *C. reinhardtii*.

3.1.1.- Obtención y optimización de las secuencias para la generación de la construcción Ars2-KN035-6xHis.

Con el objetivo de expresar el nanocuerpo KN035 en *C. reinhardtii* fue necesario diseñar una construcción genética que permitiera afrontar las dificultades naturales para el trabajo con este microorganismo, las cuales fueron expuestas en la introducción. Lo primero que se realizó fue un borrador *in silico* de como debiesen disponerse las distintas regiones de la construcción que permitirán la expresión de dicho nanocuerpo. El orden escogido corresponde a en el extremo 5' ubicar un péptido señal (Ars2) conectado de forma quimérica con la región codificante para KN035 finalizando en el extremo 3' con un arreglo de seis histidinas. En la Figura 7 se detalla de forma esquemática el orden establecido para las secuencias.

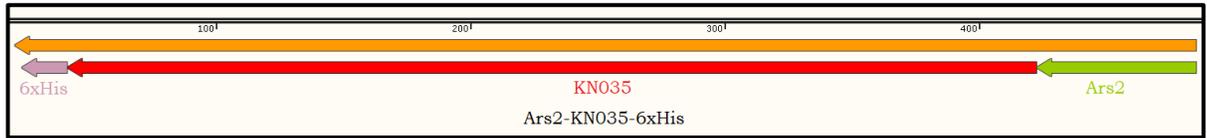


Figura 7: Representación gráfica de la construcción Ars2-KN035-6xHis. Se indica en violeta el 6xHis, en rojo la región correspondiente a KN035 y en verde el péptido señal Ars2. El sentido derecho a izquierda se debe a que las secuencias reguladoras en el vector *software* determinó como 3' → 5'.

Posteriormente se realizó la extracción de la secuencia aminoacídica a partir de lo expuesto en literatura (Zhang y col, 2017). Obteniendo la siguiente secuencia:

```

1  QVQLQESGGG LVQPGGSLRL SCAASGKMSS RRCMAWFRQA PGKERERVAK 50
51 LLTSGSTYL  ADSVKGRFTI SQNNAKSTVY LQMNSLKPED TAMYYCAADS 100
101 FEDPTCTLVT SSGAFQYWGQ GTQVTVS 127
    
```

Figura 8: Secuencia aminoacídica codificante para el nanocuerpo KN035. En rojo, se muestran las regiones de hipervariabilidad, CDR1, CDR2 y CDR3, con las cuales KN035 se une a PD-L1. Los números indican los aminoácidos de cada fila.

En la Figura 8, han sido destacadas las tres regiones de unión al ligando PD-L1 conocida como las zonas de hipervariabilidad CDR1, CDR2 y CDR3. Es de extrema importancia que esas regiones mantengan intacta la secuencia aminoacídica, por lo que al momento de ajustar las secuencias en los pasos siguientes se puso especial cuidado en ellas. Teniendo la secuencia aminoacídica de KN035 y utilizando la herramienta de conversión de

secuencias del *European Bioinformatic Institut* (EMBL-EBI) (https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/), se convirtió a secuencia nucleotídica, seleccionando la tabla propuesta para *C. reinhardtii* obteniéndose una secuencia de 381 bases con un porcentaje de 70 % GC. Debido a que esta misma no posee un triplete asociado a un codón de término de la traducción, se buscó en la base de datos ofrecida por *Kazusa DNA research Institut* la tabla de preferencia de codones de *C. reinhardtii* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3055&aa=1&style=N>) de la cual se extrajo aquel que más fracción de uso tenía, siendo el triplete TAA con 52% de preferencia.

1						18
CAGGTGCAG	CTGCAGGAG	AGCGGCGGC	GGCCTGGTG	CAGCCCGGC	GGCAGCCTG	
19						36
CGCCTGAGC	TGCGCCGCC	AGCGGCAAG	ATGAGCAGC	CGCCGCTGC	ATGGCCTGG	
37						54
TTCCGCCAG	GCCCCCGGC	AAGGAGCGC	GAGCGCGTG	GCCAAGCTG	CTGACCACC	
55						72
AGCGGCAGC	ACCTACCTG	GCCGACAGC	GTGAAGGGC	CGCTTCACC	ATCAGCCAG	
73						90
AACAACGCC	AAGAGCACC	GTGTACCTG	CAGATGAAC	AGCCTGAAG	CCCGAGGAC	
91						108
ACCGCCATG	TACTACTGC	GCCGCCGAC	AGCTTCGAG	GACCCACC	TGCACCCTG	
109						126
GTGACCAGC	AGCGGCGCC	TTCCAGTAC	TGGGGCCAG	GGCACCCAG	GTGACCCTG	
127						
AGCTAA						

Figura 9: Secuencia nucleotídica codificante para KN035 obtenida del algoritmo de transformación.

Corresponde a una secuencia de 381 bases con un porcentaje de 70 % GC. En calipso se observa el codón de término añadido en base a la información obtenida de la tabla de preferencias. En este caso la base nitrogenada uracilo señalada en la tabla es cambiada por una timina para hacerla coherente con el código genético. Los números en negro indican los tripletes de la secuencia.

Con la secuencia nucleotídica obtenida (Figura 9), y como es canon al momento de trabajar con *C. reinhardtii*, se procedió a pasar la secuencia por un algoritmo de optimización de codones, seleccionándose, por motivos de metodología, el ofrecido por IDT (Figura 10).

1						18
CAAGTGCAA	CTCCAGGAG	TCGGGCGGT	GGGCTCGTG	CAGCCTGGG	GGTTCCTG	
19						36
CGCCTCAGC	TGCGCCGCC	TCGGGCAAG	ATGAGCTCC	CGCCGCTGC	ATGGCTTGG	
37						54
TTTCGCCAG	GCCCCCGGC	AAGGAGCGG	GAGCGGGTG	GCCAAGCTG	CTCACCACG	
55						72
TCCGGTTCG	ACCTACCTG	GCGGATAGC	GTCAAGGGC	CGCTTTACG	ATCTCCCAG	
73						90
AACAACGCG	AAGTCCACC	GTGTACCTG	CAGATGAAC	AGCCTGAAG	CCTGAGGAC	
91						108
ACCGCTATG	TACTACTGC	GCCGCCGAT	TCCTTTGAG	GACCCGACC	TGCACGCTC	
109						126
GTGACCAGC	TCGGGGGCG	TTTCAGTAC	TGGGGGCAG	GGCACGCAG	GTGACGUTC	
127						
AGCTAA						

Figura 10: Optimización de la secuencia nucleotídica para KN035. Secuencia obtenida tras la optimización de codones de *C. reinhardtii* para el uso de la tecnología *g-Block*. Los números en negro indican los tripletes de cada fila.

Teniendo la secuencia codificante para KN035 y, en consideración a la necesidad de ser secretado al medio extracelular, fue necesario incorporar una secuencia codificante para un péptido señal de secreción. El péptido señal seleccionado fue el de la proteína *Arilsulfatasa II*, conocido como *Ars 2*, el cual ya se ha utilizado para la secreción de VEGF en trabajos anteriores (Chávez y col, 2015). Este péptido consta de los 21 primeros aminoácidos de la proteína, los cuales fueron extraídos desde la base de datos *Uniprot* (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9ATG5>) obteniéndose la siguiente secuencia aminoacídica:

1 MGALAVFAVA CLAAVASVAH **A21**

Figura 11: Secuencia aminoacídica del péptido señal a secreción de la proteína Ars 2. Los números en negrita indican el aminoácido número 1 y número 21.

Del mismo modo que con la secuencia que codifica a KN035 se procedió a transformarla a secuencia de tripletes utilizando la herramienta ya mencionada, EMBL-EBI, obteniendo la siguiente secuencia:

1 ATGGGCGCC CTGGCCGTG TTCGCCGTG GCCTGCCTG GCCGCCGTG GCCAGCGTG GCCCAAGCC **21**

Figura 12: Secuencia de nucleótidos codificantes para el péptido señal Ars 2. Los números en negro indican los tripletes de cada fila.

Siguiendo la misma lógica que con la secuencia de KN035, se realizó el ajuste de codones, utilizando el optimizador de secuencias de IDT especialmente para *C. reinhardtii* y en coherencia con la metodología de síntesis artificial. Se obtuvo la siguiente secuencia:

1	21
ATGGGTGCT CTCGCCGTG TTTGCTGTG GCGTGCTG GCTGCTGTC GCGTCCGTC GCGCAOGOC	

Figura 13: Secuencia codificante para el péptido señal de Ars2 tras la optimización de codones realizada por el algoritmo de IDT. Los números en negro indican los tripletes de cada fila.

En la Figura 13 se observa, en comparación existe un porcentaje GC de 65% respecto a lo mostrado en la Figura 12 donde este correspondía al 79%. Finalmente, en base a la necesidad de poseer algún método para purificar la proteína, ya sea desde el medio extracelular o intracelular, se decidió añadir una cola de seis histidinas (6xHis). Para ello se generó un arreglo codificante para estas seis histidinas de la siguiente manera:

1	6
CACCACCAT CACCATCAT	

Figura 14: Secuencia nucleotídica codificante para 6xHis. Los números en negro indican los tripletes de cada fila.

Con esto listo, las secuencias expuestas en la Figuras 10, 13 y 14 se unificaron en el orden: Ars2-KN035-6xHis, de forma que se generó una secuencia para una proteína quimera, en la cual, en vista de que el 6xHis se diseñó para ser expresado próximo al carboxilo terminal de la proteína, fue necesario eliminar el triplete codificante para el codón de termino TAA anexado originalmente a KN035 para instalarlo tras el arreglo 6xHis. La secuencia nucleotídica finalmente obtenida fue:

1	21
ATGGGTGCT	CTCGCCGTG
TTTGCTGTG	GCGTGCCTG
GCTGCTGTC	GCTTCCGTC
GCTCACGCA	
22	42
CAAGTGCAA	CTCCAGGAG
TCGGGTGGT	GGACTCGTG
CAGCCTGGA	GGTTCCCTG
CGTCTCAGC	
43	63
TGCGCAGCA	TCGGGCAAG
ATGAGCTCC	CGCCGCTGC
ATGGCTTGG	TTTCGTCAG
GCAOCTGGT	
64	84
AAGGAGCGT	GAGCGTGTG
GCAAAGCTG	CTCACCACG
TCCGGCTCG	ACCTACCTG
GCTGATAGC	
85	105
GTCAAGGGC	CGCTTTACG
ATCTCCAG	AACAACGCG
AAGTCCACC	GTGTACCTG
CAGATGAAC	
106	126
AGCCTGAAG	CCTGAGGAC
ACCGCTATG	TACTACTGC
GCCGCCGAC	TCCTTTGAG
GACCCGACC	
127	147
TGCACGCTG	GTGACCAGC
TCGGGCGCG	TTTCAGTAC
TGGGGTCAG	GGTACGCAT
GTGACTGTC	
148	
AGCCACCAC	CATCACCAT
CATTAA	

Figura 15: Secuencia nucleotídica de Ars2-KN035-6xHis. En rojo se destaca la secuencia que codifica a Ars2, en negro se observan los tripletes que codifican a KN035, en verde la zona correspondiente al arreglo que codifica a 6xHis y en calipso se observa el triplete de término de traducción.

Debido a la tecnología seleccionada para la generación sintética de la construcción Ars2-KN035-6xHis (Figura 15), se evaluó ésta con el algoritmo de complejidad de IDT, el cual determina la dificultad en términos de síntesis asignando un puntaje arbitrario a la secuencia. Al someterla por primera vez el algoritmo arrojó un puntaje de complejidad 7,2 con una ventana de 100 bases, desde el triplete 15 en adelante, con un contenido GC superior al 74%, haciéndose muy difícil la posibilidad de síntesis. Por lo tanto, se utilizó la tabla de preferencia de codones entregada por *Kazusa DNA Research Institut* para reajustar los tripletes de modo de disminuir gradualmente el contenido GC. El criterio utilizado para el cambio de codones consistió en seleccionar aquellos tripletes que estuvieran solamente compuestos por guanina y citosina, remplazándose por aquél que tuviera la segunda mayor frecuencia de uso según la tabla ofrecida por el *Kazusa DNA Research Institut* siempre y cuando éste estuviera compuesto por dos guaninas o citosinas. De esta manera, se obtuvo una secuencia optimizada (Figura 16).

Secuencia original:	
15	33
<p>GCG TCCGTC GCG CAC GCC ATGCAAGTG CAACTCCAG GAGTCG GGC GGT GGG CTC</p>	
34	50
<p>GTGCAGCCT GGG GGTTC CTG CGC CTC AGCTGC GCC GCCTCG GGC AAG</p>	
Secuencia optimizada:	
15	33
<p>GCT TCCGTC GCT CAC GCA ATGCAAGTG CAACTCCAG GAGTCG GGT GGT GGA CTC</p>	
34	50
<p>GTGCAGCCT GGA GGTTC CTG CGT CTC AGCTGC GCA GCA TCG GGT AAG</p>	

Figura 16: Primera optimización manual de codones. En pos de disminuir el porcentaje de GC para permitir la síntesis, se cambiaron aquellos codones compuestos por tres guaninas y/o citosinas por aquellos que solo poseyeran dos y que codificasen el mismo aminoácido. Así, se puede observar en rojo aquellos tripletes en la secuencia original que fueron cambiados por aquellos que se muestran en verde en la secuencia tras el arreglo.

La secuencia nucleotídica obtenida fue sometida nuevamente a la prueba de complejidad de IDT arrojando que la secuencia poseía una complejidad de 4,8 con una ventana de 100 pares de base con contenido GC mayor que un 71% a partir del triplete 49. Se rediseñó nuevamente la secuencia asociada a la ventana según la tabla ya mencionada previamente (Figura 17).

Secuencia original:	
49	66
ATGAGCTCC	CGCCGCTGC ATGGCTTGG TTTCGCCAG GCCCCCGGC AAGGAGCGG
67	82
GAGCGGGTG	GCCAAAGCTG CTCACCACG TCCGGTTCG ACCTACCTG GCG
Secuencia optimizada:	
49	66
ATGAGCTCC	CGTCGTGTC ATGGCTTGG TTTCGTCAG GCACCTGGT AAGGAGCGT
67	82
GAGCGTGTG	GCAAAGCTG CTCACCACG TCCGGTTCG ACCTACCTG GCT

Figura 17: Segunda optimización manual de los codones. De la misma manera que en la figura 16 los codones destacados en rojo fueron reemplazados por aquellos en verde utilizando la tabla del *Kazusa Research Institute* de modo que aquellos tripletes compuestos completamente por guanina o citosina se reemplazarán por un equivalente con al menos una timina o una adenina. Los números sobre las secuencias representan los tripletes.

Del resultado de este arreglo se pudo concretar la siguiente secuencia para ser sometida a la prueba de IDT:

1		21
ATGGGTGCT	CTCGCCGTG	TTTGCTGTG
	GCGTGCCTG	GCTGCTGTC
	GCTTCCGTC	GCTCACGCA
22		42
CAAGTGCAA	CTCCAGGAG	TCGGGTGGT
	GGACTCGTG	CAGCCTGGA
	GGTTCCCTG	CGTCTCAGC
43		63
TGCGCAGCA	TCGGGTAAG	ATGAGCTCC
	CGTCGTTGC	ATGGCTTGG
	TTTCGTCAG	GACCTGGT
64		84
AAGGAGCGT	GAGCGTGTG	GCAAAGCTG
	CTCACCACG	TCCGGTTCG
	ACCTACCTG	GCTGATAGC
85		105
GTCAAGGGC	CGCTTTACG	ATCTCCAG
	AACAACGCG	AAGTCCAOC
	GTGTACCTG	CAGATGAAC
106		126
AGCCTGAAG	CCTGAGGAC	ACCGCTATG
	TACTACTGC	GCCGCCGAT
	TCCTTTGAG	GACCCGAOC
127		147
TGCACGCTC	GTGACCAGC	TCGGGGGCG
	TTTCAGTAC	TGGGGGCAG
	GGCACGCAG	GTGAOGGTC
148		
AGCCACCAC	CATCACCAT	CATTAA

Figura 18: Secuencia final de Ars2-KN035-6xHis. Secuencia obtenida tras los dos arreglos realizados en pos de disminuir el contenido GC para que la síntesis pueda ser viable bajo la evaluación del algoritmo de complejidad.

La prueba de complejidad de IDT asignó un puntaje de 2,9 a esta nueva secuencia, por lo cual esta podía ser sintetizada como *g-block* (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA). Finalmente, con el objetivo de facilitar el uso de esta construcción como una pieza para *Gibson Assembly* y disminuir el riesgo de generar una mutación en la secuencia codificante al ensamblar el vector, se decidió añadir brazos de homología a las secuencias

circundantes al sitio en el cual la construcción se ubicaría dentro del vector. Estas secuencias de homología corresponden en el extremo 3' de la construcción a 20 [pb] homólogos al terminador psaD y en el extremo 5' de la construcción a 20 [pb] homólogos al promotor psaD. De esta forma la secuencia nucleotídica final sintetizada es la siguiente:

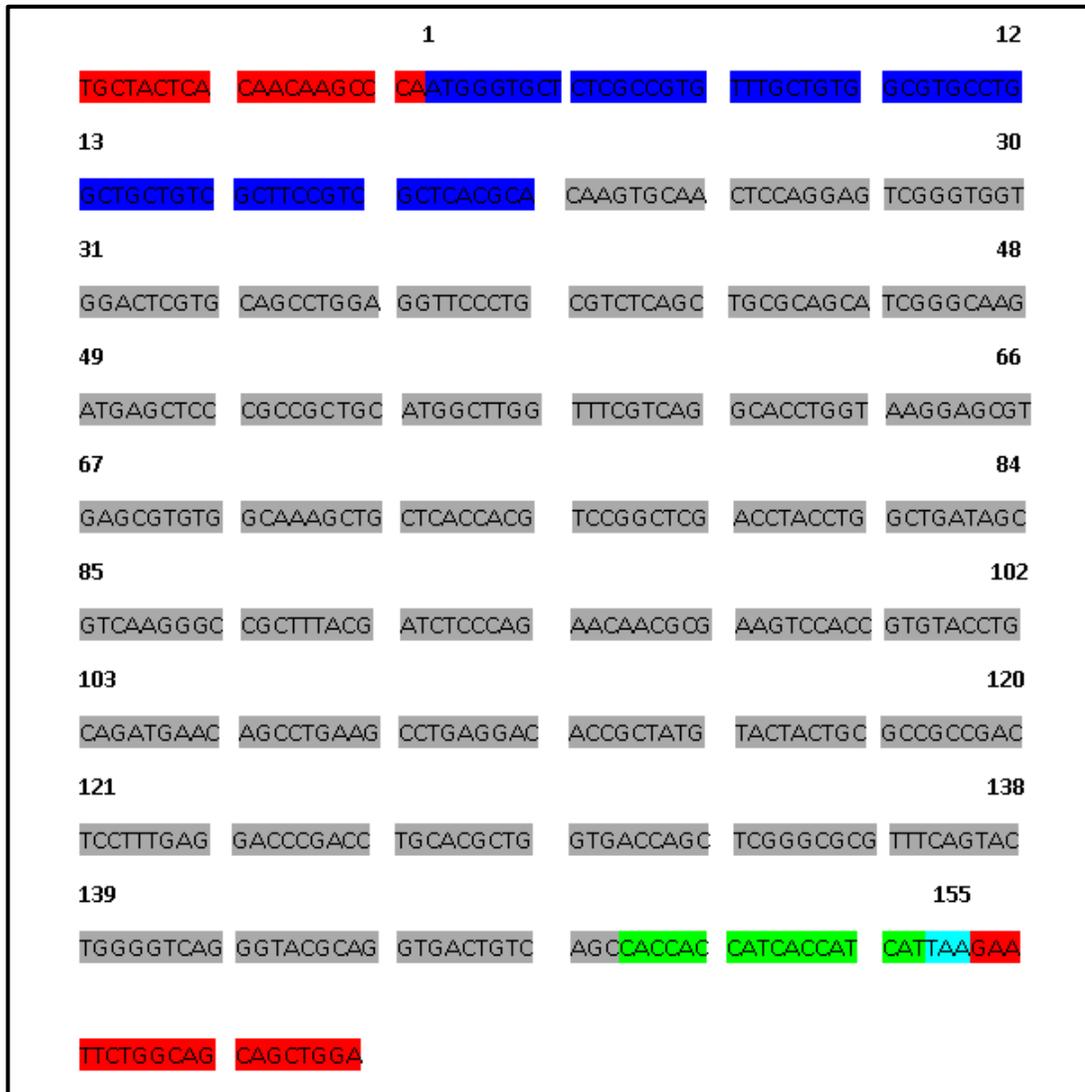


Figura 19: Secuencia final de síntesis de la construcción Ars2-KN035-6xHis. En rojo se observa los brazos de homología tanto en el extremo 5' y 3', en azul se observa la zona codificante para Ars2, en gris la zona codificante para KN035, en verde el arreglo 6xHis y en calipso el triplete terminal

3.1.2 Diseño y simulación *in silico* de las piezas del vector Pbc1-KN035.

Con el ánimo de poder prevenir cualquier tipo de inconveniente al momento de ensamblar el vector por *Gibson Assembly*, así como, por otro lado, agilizar la planificación del experimento mismo, se realizó una simulación *in silico* del ensamblaje del nuevo vector. Para lo cual, se tomó como vector *backbone* el plásmido Pbc1-VEGF el cual previamente había sido utilizado para secretar VEGF en esta misma cepa de algas (Chávez y col, 2015). La siguiente figura detalla la estructura de dicho vector visualizado a través del *software Snap gene* (Insightful Science, San Diego, USA.). .

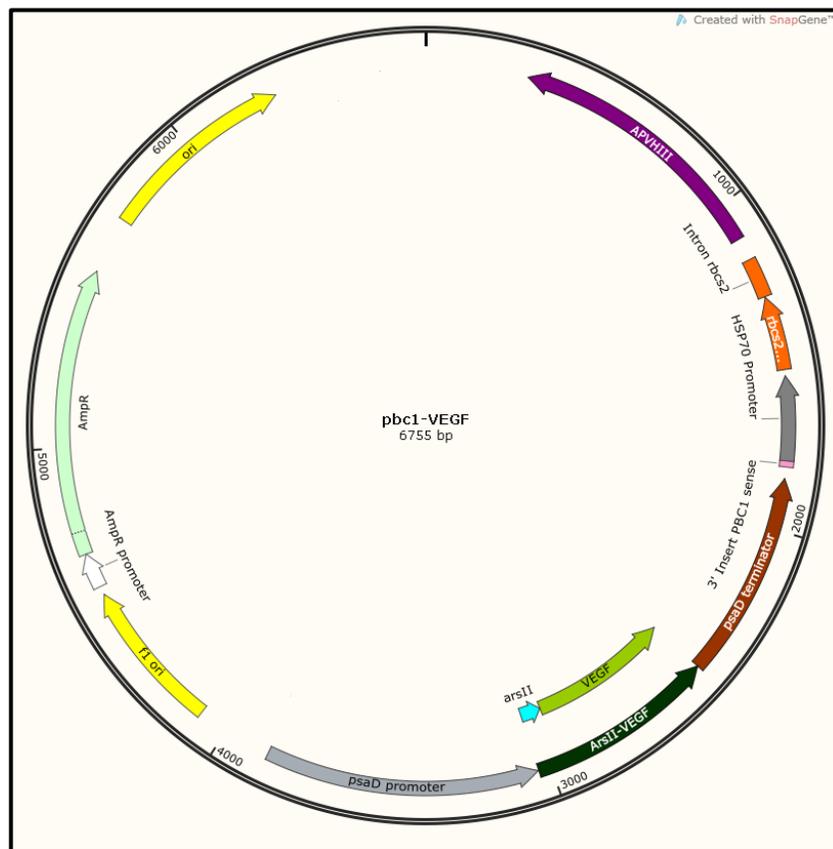


Figura 20: Estructura del vector *backbone* binario Pbc1-VEGF. Se observa en calipso, el gen de resistencia a ampicilina (AmpR) para extender el vector en bacterias, mientras que en morado el gen de resistencia a paromomicina (APVHII) destinado a la selección de algas transformadas. El casete de expresión que comanda la producción de VEGF está compuesto por el promotor constitutivo fuerte *psaD* (en gris), proveniente del gen de la subunidad II del Fotosistema I de *C. reinhardtii* y su respectivo terminador (en café), los cuales incluyen los necesarios 5' UTR y 3' UTR para la expresión recombinante.

Debido al tamaño del vector *backbone*, el cual corresponde a 6755 [pb], se decidió fragmentarlo en 3 piezas para *Gibson Assembly* cercanas cada una a los 2000 [pb], de modo de remplazar la secuencia codificante para Ars2-VEGF por aquella codificante para Ars2-KN035-6xHis, construcción la cual sería a la vez la última parte de *Gibson* para poder ensamblar el vector nuevo, denominado Pbc1-KN035. Para ello, se generaron 3 pares de partidores para amplificar 3 regiones distintas de Pbc1-VEGF y un par de partidores para amplificar la construcción como la cuarta pieza. La Tabla 1 detalla las secuencias y características de estos partidores. Con los partidores expuestos en la Tabla 1, se diseñaron las 4 reacciones de PCR que permitirían obtener las piezas para ensamblar el vector (Tabla 4).

De esta forma, se simuló *in silico* tanto la producción de piezas como el resultado del *Gibson Assembly* utilizando el programa *Snap Gene* (Insightful Science, San Diego, USA.). En la Figuras 21 y 22 se detallan las piezas obtenidas.

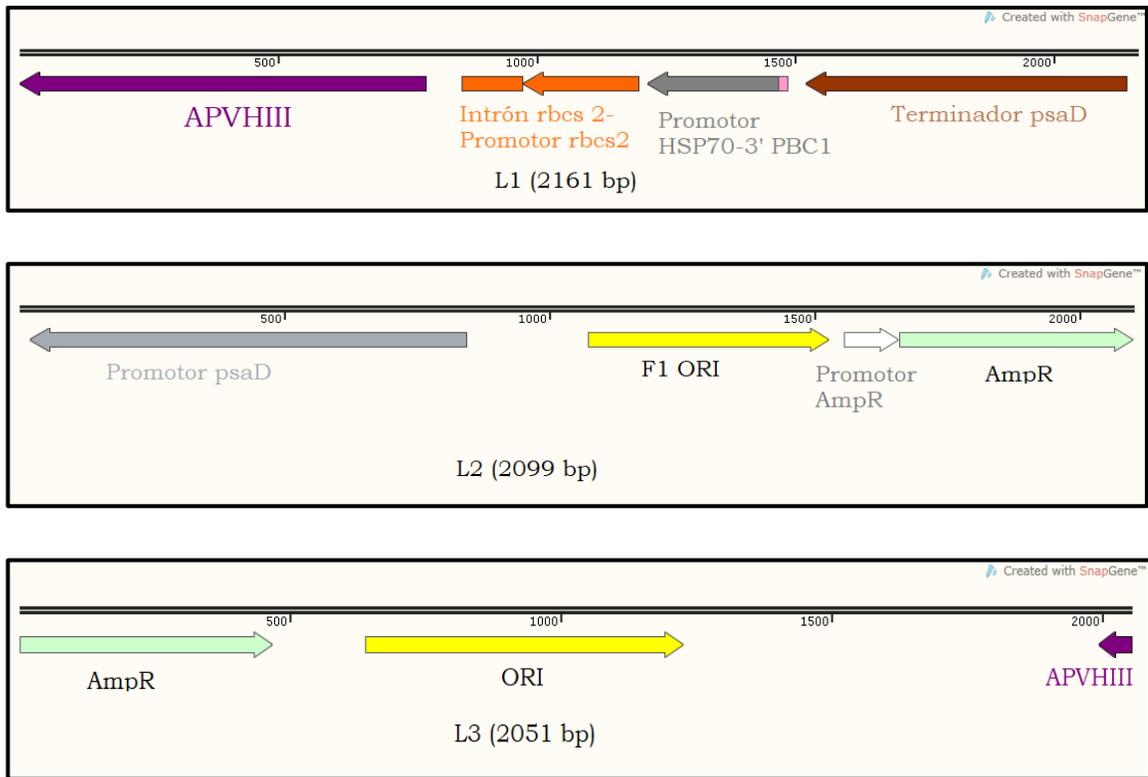


Figura 21: Mapa de las tres piezas generadas para Gibson Assembly. En ellas se puede observar los genes codificantes para la resistencia de antibióticos en eucariontes (paramomicina, APVHIII en flecha púrpura) y en procariontes (Ampicilina, AmpR en calipso) En las flechas naranjas y blancas se representan los promotores que dirigen la expresión de estos. En amarillo se muestran 2 distintos orígenes de replicación para la multiplicación del vector en bacterias. En las flechas gris y burdeo se encuentra representada la maquinaria de expresión del gen psaD destinada a ser la que determina la expresión de la construcción aquí desarrollada. Los genes que confieren resistencia se encuentran “cortados” a modo de control. Si el ensamblaje no es correcto, estos genes no serían funcionales, por ende, no se obtendrían colonias tanto de algas como de bacterias resistentes en medios con presiones selectivas.

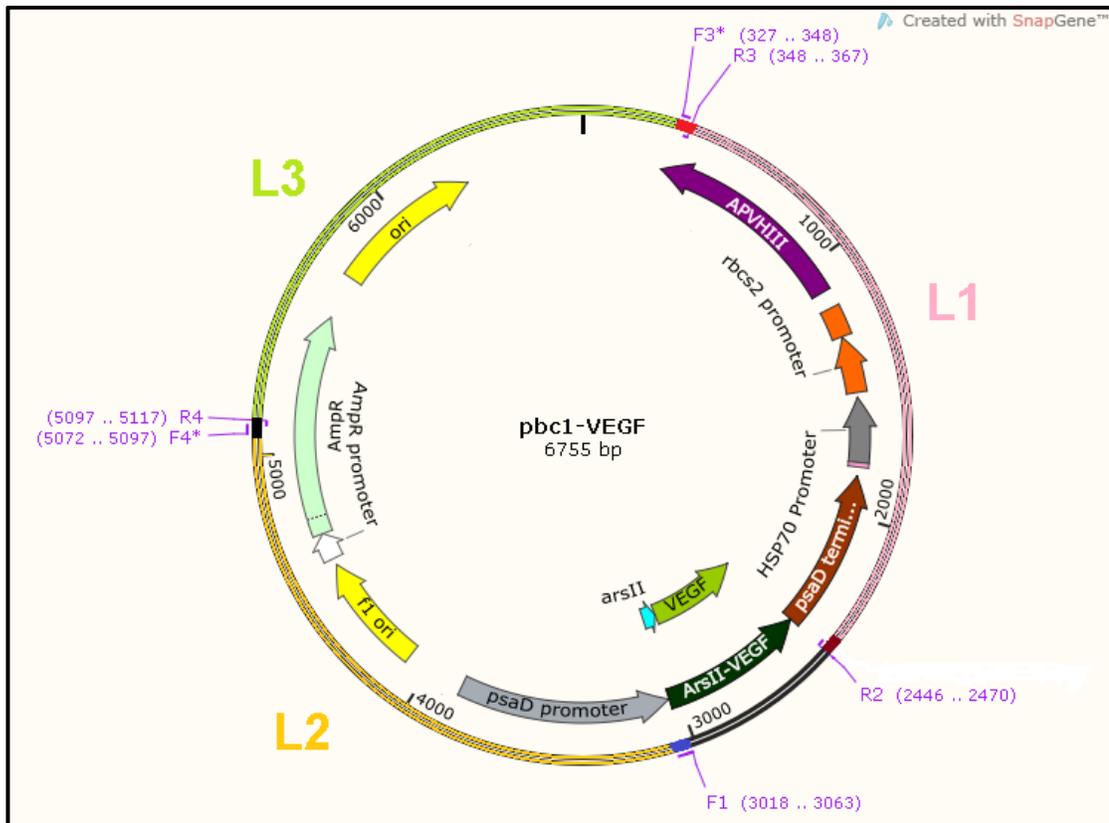


Figura 22: Ubicación de cada pieza generada en la estructura del vector Pbc1-VEGF. En rosado se muestra la pieza L1 la cual se enlaza a la pieza L3 (verde), que a su vez se une a la pieza L2 (amarillo). La zona presentada en negro corresponde a aquella a ser remplazada por la construcción Ars2-KN035-6xHis.

Finalmente, utilizando la herramienta de simulación del *software* se simuló el proceso de *Gibson Assembly* utilizando las piezas L1, L2, L3 y Lg. Este proceso entregó como resultado el ensamblaje de un vector de 6649 [pb] llamado Pbc1-KN035 (Figura 23).

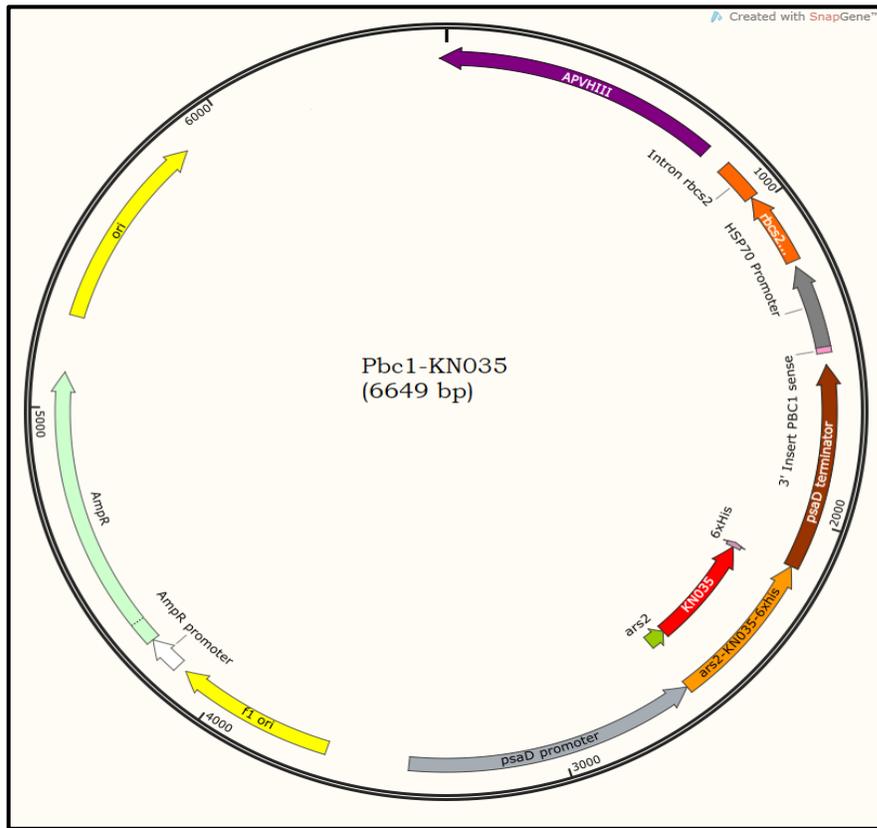


Figura 23: Mapa del vector Pbc1-KN035 generado tras el Gibson Assembly. Este vector al igual que el *backbone* es binario, de modo que posee tanto secuencias funcionales en organismos procariontas, como lo son el origen de replicación (flechas amarillas) y gen de resistencia a ampicilina (AmpR en flecha calipso), como también otras secuencias destinadas a eucariontes como la resistencia a paromomicina (APVHIII en flecha púrpura), su maquinaria de expresión (rbc2 en flecha naranja) y la construcción Ars2-KN035-6xHis.

A modo de resumen se adjunta en el Anexo I, una imagen de página completa que resume el procedimiento simulado, el cual fue posteriormente llevado a cabo en el laboratorio.

3.1.3.- Generación del vector Pbc1-KN035

3.1.3.1.- Propagación del vector *backbone* Pbc1-VEGF.

Lo primero que se realizó fue la propagación de vector *backbone*, Pbc1-VEGF. Para ello fueron transformadas bacterias *E. coli Top10* utilizando este vector. Para asegurarse de que las colonias obtenidas tras la selección en medio LB con presencia de ampicilina poseían el vector, se realizó PCR de colonias a cinco colonias extraídas desde la placa, amplificando una región del vector Pbc1-VEGF con un largo esperado de 2051 [pb] (Figura 24).

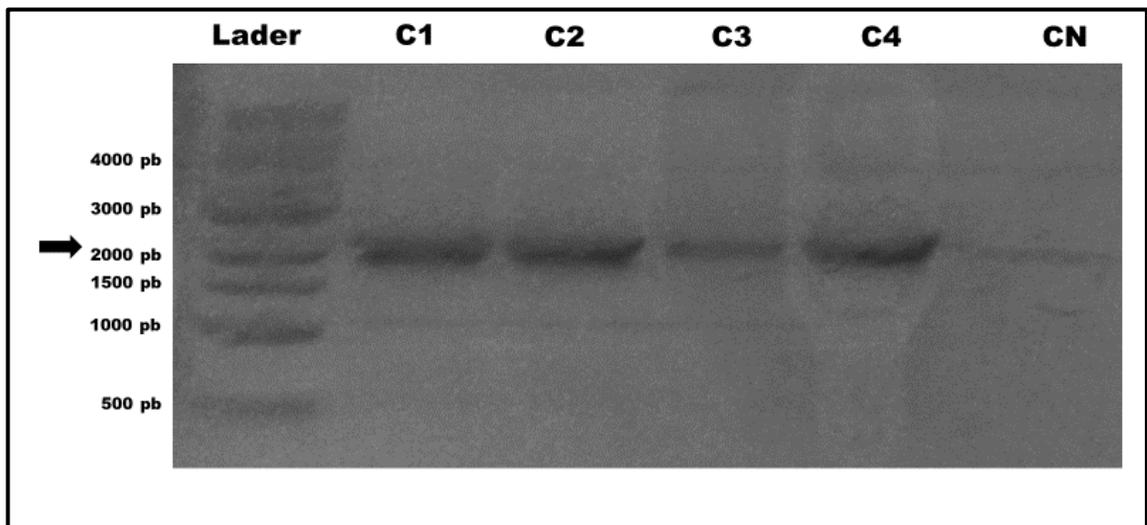


Figura 24: Productos de PCR de colonias transformadas con Pbc1-VEGF. Gel de agarosa al 2% tras una electroforesis por 20 min a 120 [V]. En el primer carril se muestra el Lader con sus respectivos pesos asociados señalados a un costado. En las filas posteriores, tituladas "C" se exponen muestras de cuatro colonias distintas evaluadas las cuales todas muestran la banda esperada cercana a los 2000 [pb] indicado por la flecha negra a un costado. La columna titulada CN corresponde al control negativo de la reacción de PCR sin DNA molde.

Como se observa en la Figura 24, de todas las colonias evaluadas de la placa se amplificó la región asociada al vector, por lo cual todas ellas estaban transformadas. Posteriormente, se recuperó el DNA plasmídico desde estas colonias con el objetivo de recuperar el vector Pbc1-VEGF.

3.1.3.2.- Amplificación de las piezas para *Gibson Assembly*.

Con el stock de vector *backbone* creado, se dio pase a la fase de generación de las piezas *Gibson* previamente simuladas *in silico*. Para ello, se realizaron tres diferentes reacciones de PCR con una polimerasa de alta fidelidad sobre el vector Pbc1-VEGF recuperado desde la colonia C1 para obtener las piezas L1, L2 y L3 (Figuras 25 y 26).

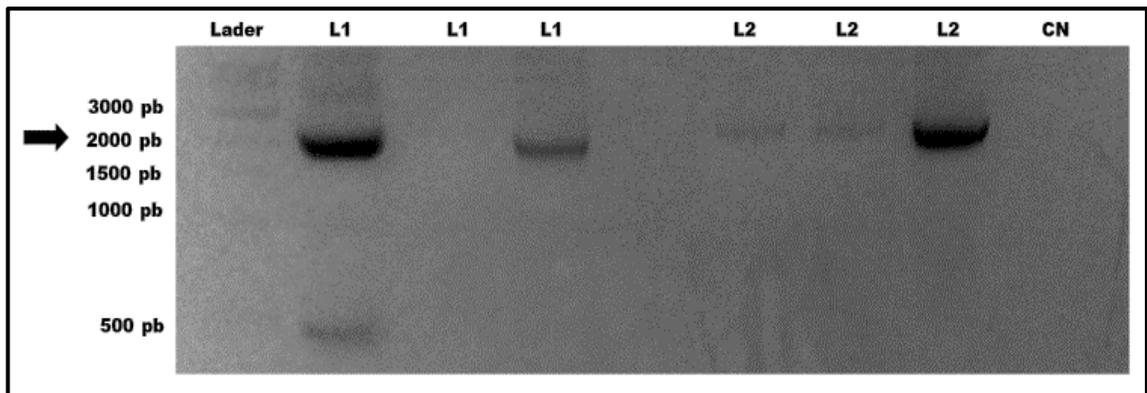


Figura 25: Generación de las piezas L1 y L2. Visualización del gel de agarosa al 2% desde el que se recuperó las piezas L1 y L2, las cuales se observan cercanas a los 2.000 [pb] señalados por la flecha negra en el costado izquierdo. Cada uno de los carriles L1 y L2 corresponden a reacciones independientes, CN corresponde al control negativo de la reacción de PCR donde no se añadió DNA molde a la reacción, el cual fue reemplazado por agua.

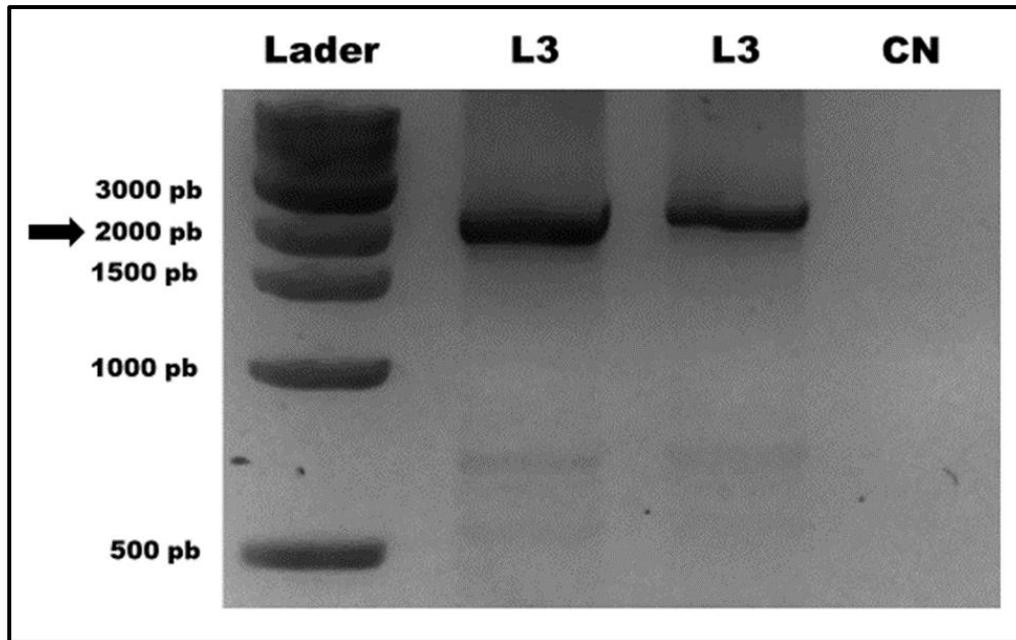


Figura 26: Generación de la pieza L3. Visualización del gel de agarosa 2% desde el que se recuperó la pieza L3. Se observa un duplicado de la reacción junto con un control negativo (CN), donde el material genético fue reemplazado por agua. En los dos primeros casos se puede observar la banda esperada cercana a los 2000 [pb] señalada por la flecha negra en el costado izquierdo.

Al igual que las piezas L1, L2 y L3, se amplificó la construcción Ars2-KN035-6xHis utilizando como molde el *g-block* sintetizado. Tras ello, se corrió una electroforesis obteniéndose una banda cercana a los 500 [pb], la cual luego fue recuperada (Figura 27).

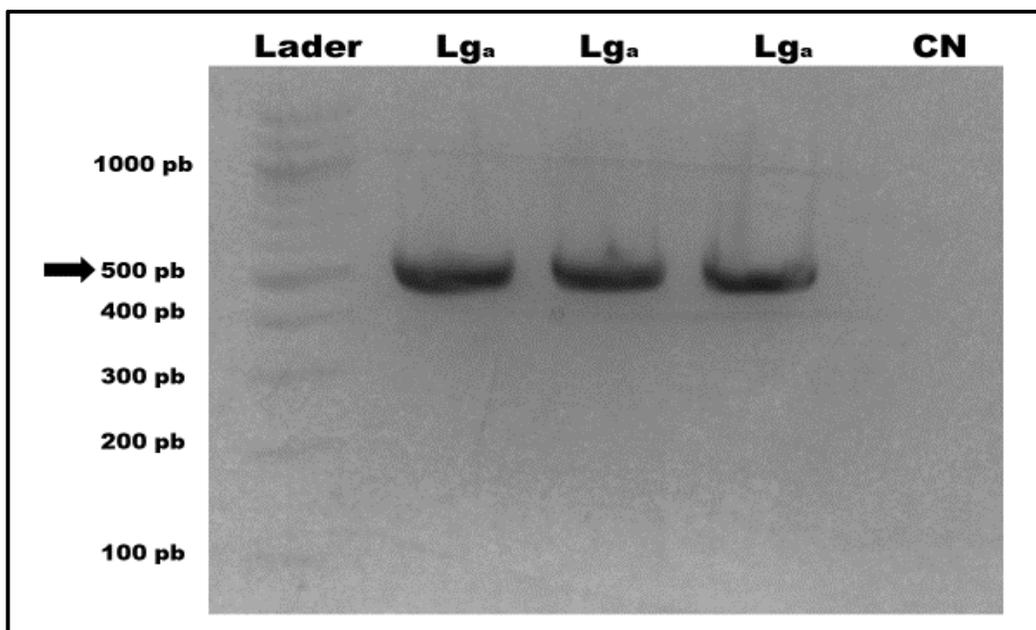


Figura 27: Obtención de la pieza Lg_a. Visualización del gel desde el que se recuperó la pieza Lg_a tras la amplificación de la construcción Ars2-KN035-6Hisx para ser usado como pieza de *Gibson Assembly*. Cada uno de los carriles Lg_a corresponde a un triplicado, donde en los tres casos se observa una banda cercana a los 500 [pb] indicado por la flecha negra en el costado izquierdo coincidiendo con los 505 [pb] esperados. CN corresponde al control negativo de la reacción.

Los productos de PCR correspondientes a las piezas L1, L2, L3 y Lg, fueron purificados desde los geles de agarosa para ser ensamblados mediante *Gibson Assembly*

3.1.3.3.- *Gibson Assembly*.

Se realizaron dos reacciones de *Gibson Assembly* en paralelo, una utilizando las piezas L1, L2, L3, Lg_a (transformación A) y otra utilizando las piezas L1, L2, L3 y Lg (transformación G) proveniente directamente desde el material sintetizado por IDT. Para las placas derivadas de la transformación G se obtuvo mayor eficiencia en la transformación, observándose varias colonias aisladas. Sin embargo, para las placas

derivadas de la transformación A, la eficiencia fue baja y solo dos colonias pudieron ser recuperadas. Tras ello se extrajo DNA plasmídico de 4 colonias provenientes de la transformación G y de las 2 colonias de la transformación A, para luego comprobar, a través de PCR y electroforesis en gel de agarosa, la presencia de la secuencia de la construcción Ars2-KN035-6xHis (Figura 28). Los plasmidios aislados tanto de las colonias obtenidas de la transformación G (G1x, G1y, G2x y G2y) como de la transformación A (A1x y A1y), mostraron la presencia de la construcción.

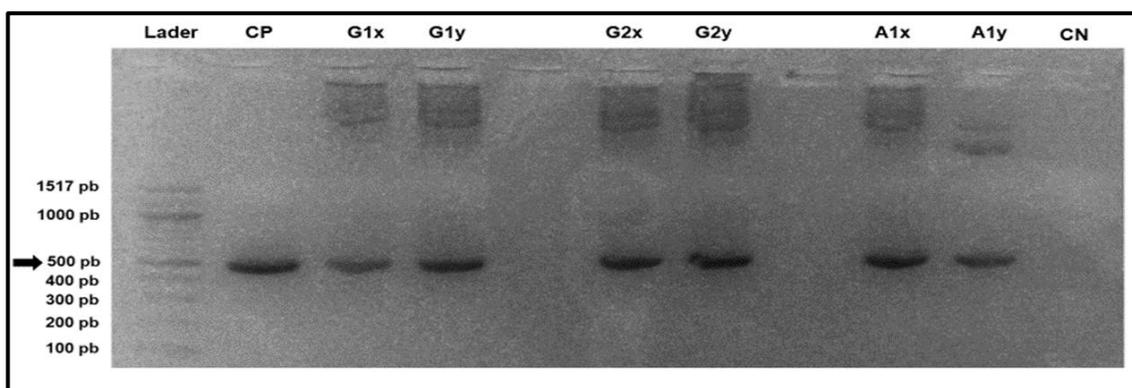


Figura 28: Productos de PCR correspondiente a la secuencia Ars2-KN035-6xHis amplificados desde el vector Pbc1-KN035. Amplificación del fragmento Ars2-KN035-6xHis utilizando como *backbone* el vector Pbc1-KN035. La flecha negra indica el tamaño esperado aproximado (500 [pb]). Como control positivo (CP) se utilizó la misma construcción sintetizada por IDT, mientras que para el control negativo (CN) se reemplazó el volumen de DNA molde por agua.

O.E 2: Generar líneas genéticamente independientes que presenten en su genoma el casete de expresión para KN035.

3.2.- Transformación de *C. reinhardtii* y selección de transformantes.

Tras la ejecución del protocolo de transformación detallado en la sección materiales y métodos, se seleccionaron transformantes de *C. reinhardtii* a través del uso de cultivos en medio TAP líquido con $10 \text{ } [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$ de paromomicina en agitación e iluminación constante, para más tarde, a partir de dichos cultivos ser traspasados a medio sólido bajo la misma presión selectiva dónde se pudiese generar crecimiento de colonias con el objetivo de obtener líneas genéticamente independientes unas de otras.

3.2.1.-Selección de transformantes en medio líquido.

Una vez realizada la transformación vía *glass beads* utilizando aquel vector proveniente de la aislación G1_Y, (Figura 28) , 100 [μL] de transformante fueron utilizados para inocular 15 [mL] de medio TAP con $10 \text{ } [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$ de paromomicina para cada una de las cepas. Estas, se dejaron en agitación y luz constante por 12 días. Para ese momento, se pudo observar crecimiento en uno de los duplicados de la cepa UVM11 KN035. Esto queda detallado en la Figura 29, en donde en la fila correspondiente a 12 días se puede observar que el medio se encuentra de color verde para el caso de uno de los duplicados de la cepa UVM11 KN035.

Para el día 25 desde la inoculación, cada uno de los cultivos presentaba crecimiento a excepción del control negativo UVM4 (Figura 29), dando a entender que la selección ejercida por el antibiótico estaba haciendo efecto. De esta forma, se siguió haciendo una

seguidilla de renovación de los cultivos cada 4 semanas, con el objetivo de confirmar la transformación, para después volver a sembrar en placa el pellet de los cultivos y poder almacenarlos en placas con medio TAP agar con presencia de antibiótico. La Figura 30 muestra que los cultivos seleccionados de esta manera pueden ser efectivamente hechos crecer en medio sólido para su almacenamiento a largo plazo.

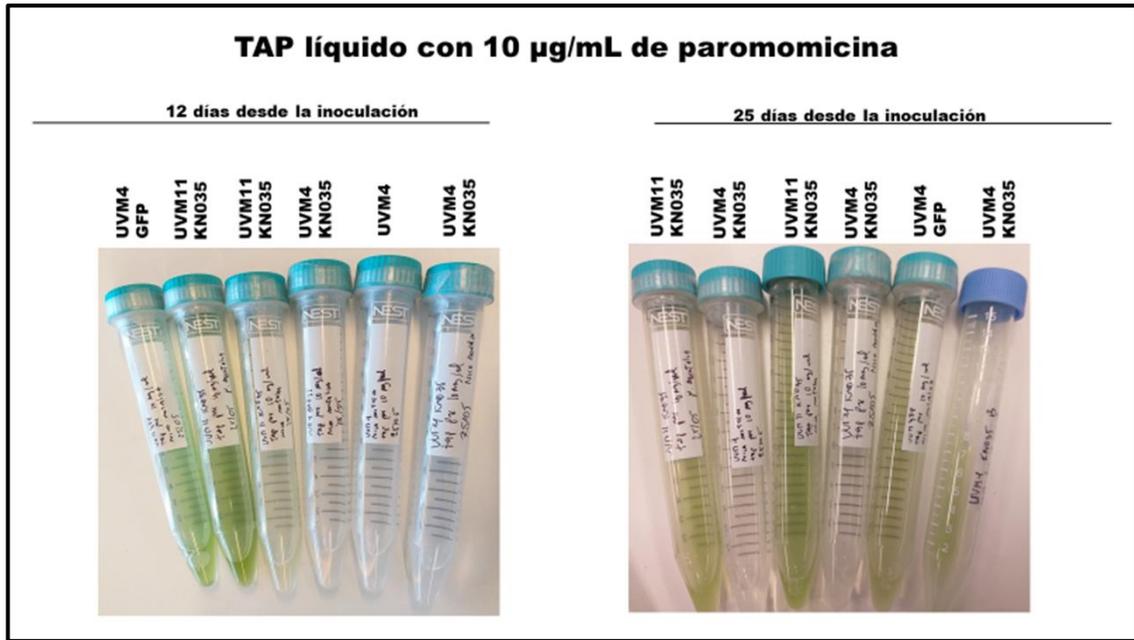


Figura 29: Selección de transformantes de *C. reinhardtii* en medio líquido con $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Diferentes estadios de los cultivos de transformantes seleccionados en medio TAP líquido en presencia de paromomicina. Como control positivo se usó la cepa UVM4 GFP, mientras que el control negativo está representado por la cepa UVM4. A la izquierda se tienen los cultivos tras 12 días de la inoculación, mientras que a la derecha se muestra a los 25 días tras la inoculación.

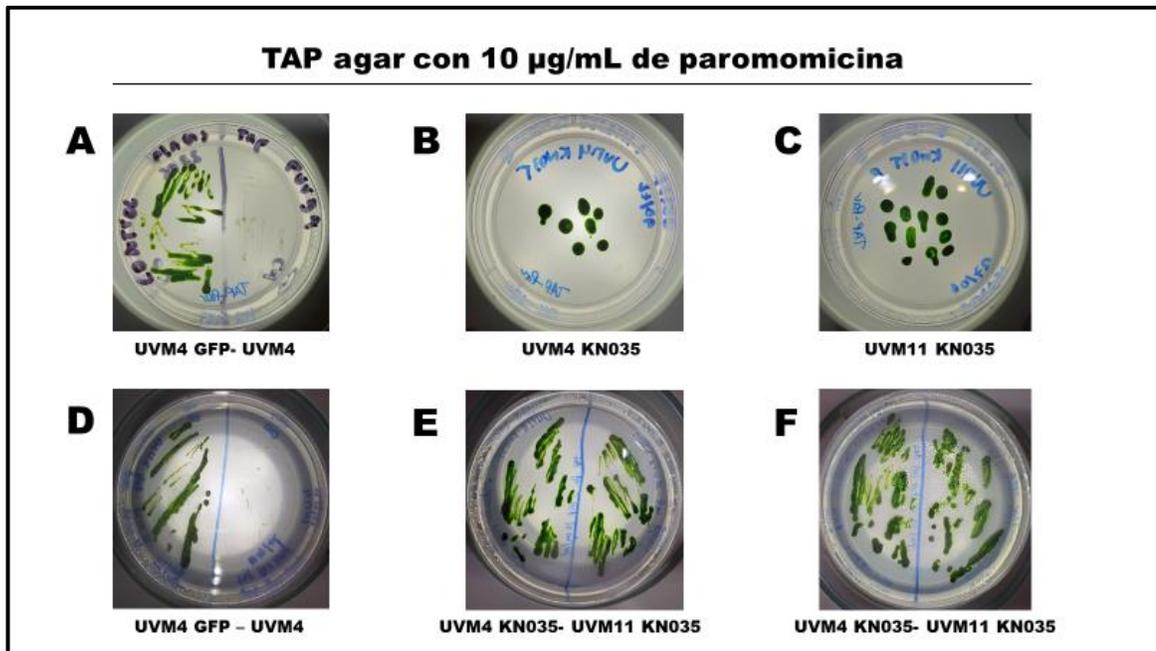


Figura 30: Transformantes seleccionados en medio líquido pueden sobrevivir y ser almacenados en el tiempo en medio sólido bajo la misma presión de selección. En la primera fila, se observa en (A) placa inoculada con la cepa UVM4 GFP como control positivo y la cepa UVM4 como control negativo tras 4 días desde la siembra. En efecto, se puede notar que el antibiótico está ejerciendo su función selectora ya que el control negativo no presenta crecimiento. En la misma fila, se puede observar ambas cepas transformadas, UVM4 KN035 y UVM11 KN035, las cuales presentan crecimiento normal (B, C). En la segunda fila, se observan las mismas cepas mencionadas, resembradas ya por tercera vez en forma continua, alrededor de un mes desde la inoculación original. Nuevamente en la primera imagen se puede observar que el antibiótico ejercía su función selectora ya que el control negativo no presentó crecimiento (D), luego, en las placas que siguen el crecimiento se observa crecimiento normal, sin signos de clorosis (E, F).

3.2.2.- Evaluación de la presencia de de la construcción Ars2-KN035-6xHis en las cepas transformadas mediante PCR.

En vista de lo mostrado en las Figuras 29 y 30 se pudo observar que efectivamente las cepas transformadas pueden resistir al antibiótico, demostrando, por ende, que al menos el casete de resistencia a paromomicina es activo en ellas y fue añadido al genoma nuclear. Sin embargo, esto no demuestra, que específicamente el casete asociado a KN035 esté insertado en el DNA nuclear. Para resolver esto, se realizó una extracción de DNA genómico desde las placas de las cepas transformadas, de modo que este DNA pueda ser posteriormente utilizado en reacciones de PCR.

Con el DNA obtenido, se realizó una reacción de PCR específica para detectar la correcta inserción de la construcción en el genoma nuclear utilizando los partidores R gblock y L gblock con una temperatura de *annealing* a 63 [°C]. Tras la electroforesis en agarosa se observó lo siguiente.

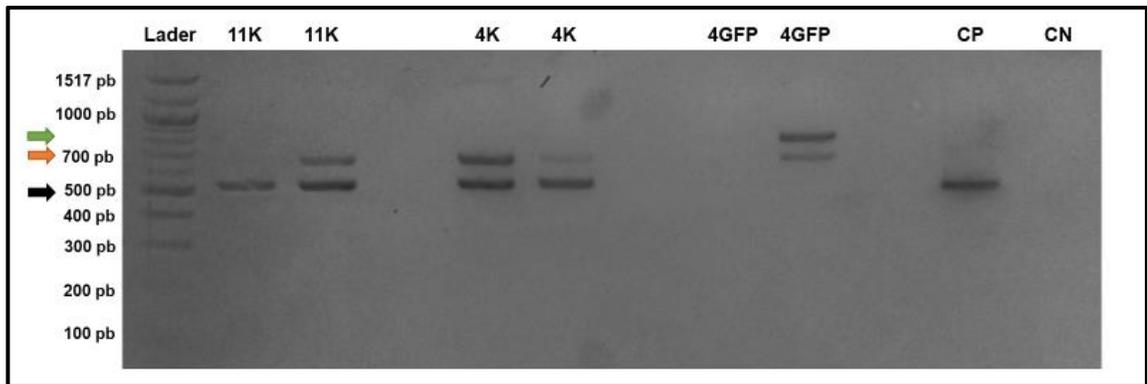


Figura 31: Evaluación de la presencia de la construcción *Ars2-KN035-6xHis* en el DNA nuclear de *C. reinhardtii* UVM11 KN035 y UVM4 KN035. La flecha negra al costado izquierdo indica el tamaño de la banda esperada para cada una de las cepas transformadas, tituladas en la figura como 11K y 4K para la cepa UVM11 KN035 y UVM4 KN035, respectivamente. Las flechas naranja y verde muestran los tamaños aproximados de bandas inespecíficas cercanas a los 700 y 800 [pb]. Como control positivo (CP) se tuvo el vector PBC1-KN035 el cual solo presentó la banda deseada. Como control negativo se tuvo a la cepa UVM4 GFP(4GFP en la foto) y como control negativo de la reacción (CN) se reemplazó el material genético problema por agua.

Si bien se pudo observar presencia de la banda deseada de 500 [pb] en ambos transformantes, el resultado no fue satisfactorio debido a la aparición de bandas de tamaños no deseados, cercana a los 700 y 800 [pb] mostradas en la Figura 31 por las flechas naranja y verde respectivamente. Estas se presentaron no solo en las cepas transformantes, sino que también en la cepa UVM4 GFP. Ante ello se supuso que estas se debían a que la temperatura de *annealing* utilizada en la reacción anterior, correspondiente a 63 [°C], era demasiado permisiva, de forma que los partidores perdían especificidad y eran capaces de anclarse a otras regiones del DNA molde. Para afirmar esta aseveración y descartar de ese modo que exista un problema en los partidores (lo cual podría llevar a conclusiones incorrectas respecto a si las cepas están transformadas o no),

se decidió realizar un PCR en gradiente de temperatura, para buscar aquella que sea la más restrictiva posible sin dejar de permitir el anclaje deseado. Se diseñó de esta forma un experimento que constaba de 4 reacciones PCR cada una a temperatura de *annealing* distinta para el mismo par de partidores L gblock y R gblock teniendo como DNA molde muestras provenientes de UVM4 GFP y UVM4 KN035. Se obtuvo lo siguiente:

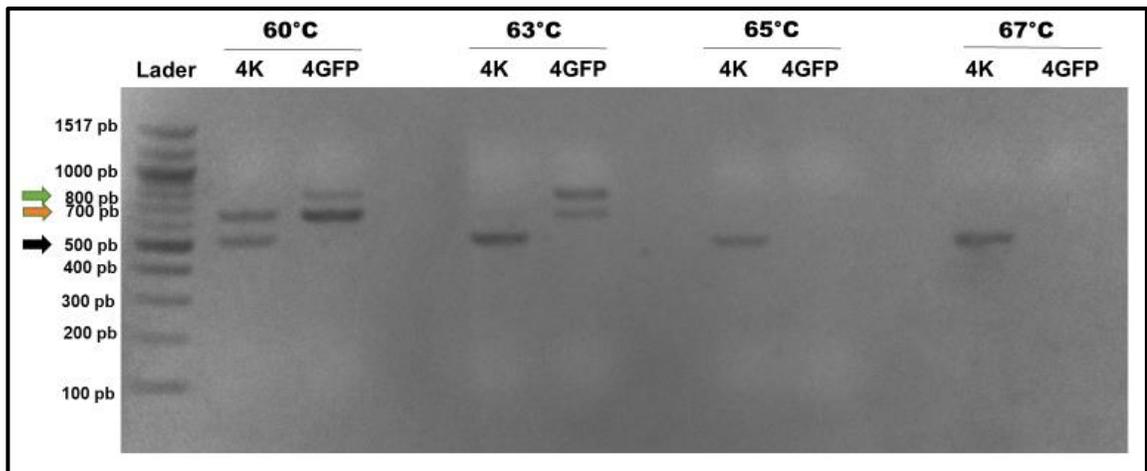


Figura 32: PCR en gradiente utilizando como molde DNA nuclear de *C. reinhardtii* UVM4 GFP y UVM4 KN035. Arriba se muestran las 4 diferentes temperaturas utilizadas para el experimento, al cual se sometió la cepa UVM4 KN035 (4K) y UVM4 GFP (4GFP). La flecha negra al costado izquierdo cercana a los 500 [pb] indica el tamaño esperado mientras que la naranja y verde indican bandas inespecíficas cercanas a 700 y 800 [pb], respectivamente.

De la figura anterior se pudo concluir que la temperatura de *annealing* ideal necesaria para el PCR deseado, tenía que ser sobre los 65 [°C] ya que las bandas inespecíficas desaparecen sobre esta temperatura. Sabiendo este dato, se realizó nuevamente un PCR sobre las cepas transformadas, utilizando los partidores R gblock y L gblock con una temperatura de *annealing* a 67[°C]. En este caso, además, se decidió añadir como control

positivo el uso de un par de partidores que amplificaran un gen endógeno de *C. reinhardtii*, siendo en este caso, un trozo de 413 [pb] del gen de la proteína D2 del fotosistema II. Este par de partidores, psbD, había sido ya previamente esgrimido en literatura mostrando buenos resultados (Chávez y col, 2015). A continuación, se muestra en la Figura 33.

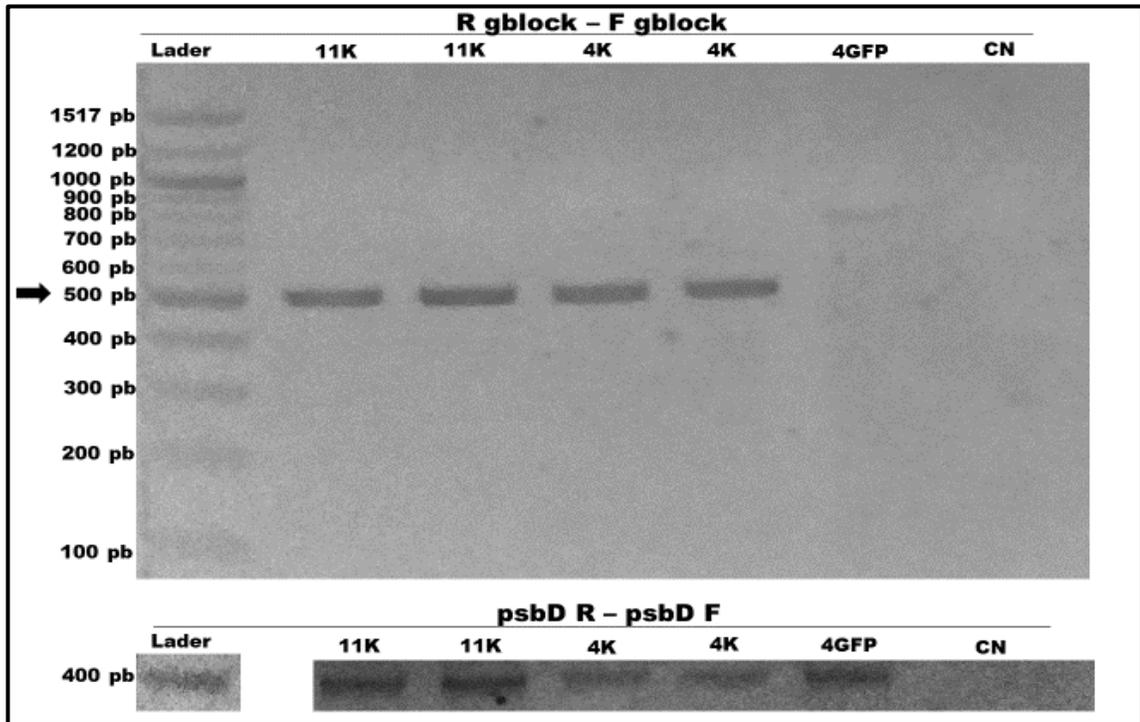


Figura 33: Evaluación de la presencia de la construcción Ars2-KN035-6xHis en DNA nuclear de cepas transformadas. En el primer gel se evaluó las cepas UVM11 KN035 y UVM4 KN035 esperando una banda cercana a los 500 [pb] que indique la presencia de la construcción, señalada por la flecha negra. Como controles negativos se tuvo la cepa UVM4 GFP y una reacción donde el molde fue remplazado por agua (CN). El segundo gel, muestra el control positivo de la reacción, donde se amplificó el gen endógeno de *C. reinhardtii* codificante para la Proteína D2 del Fotosistema II. Se pudo ver que la banda esperada de 413 [pb] se encontró presente en todas las cepas demostrando que el DNA utilizado como molde corresponde al de la microalga. Como control negativo de la reacción se reemplazó el material genético molde por agua.

3.3.-Generación de líneas clonales genéticamente independientes.

En vista de que las poblaciones hasta ahora trabajadas corresponden a poblaciones genéticamente heterogéneas, surgió la necesidad de crear líneas que fueran genéticamente independientes unas de otras, y que al mismo tiempo portaran la construcción. Para lograr aquello, se sembraron 150 [µL] de cultivo de las cepas UVM11 KN035 y UVM4 KN035. Tras tres semanas de espera, pudo ser evidente el deseado crecimiento de colonias pudiendo obtener líneas independientes unas de otras mostrado en la Figura 34.

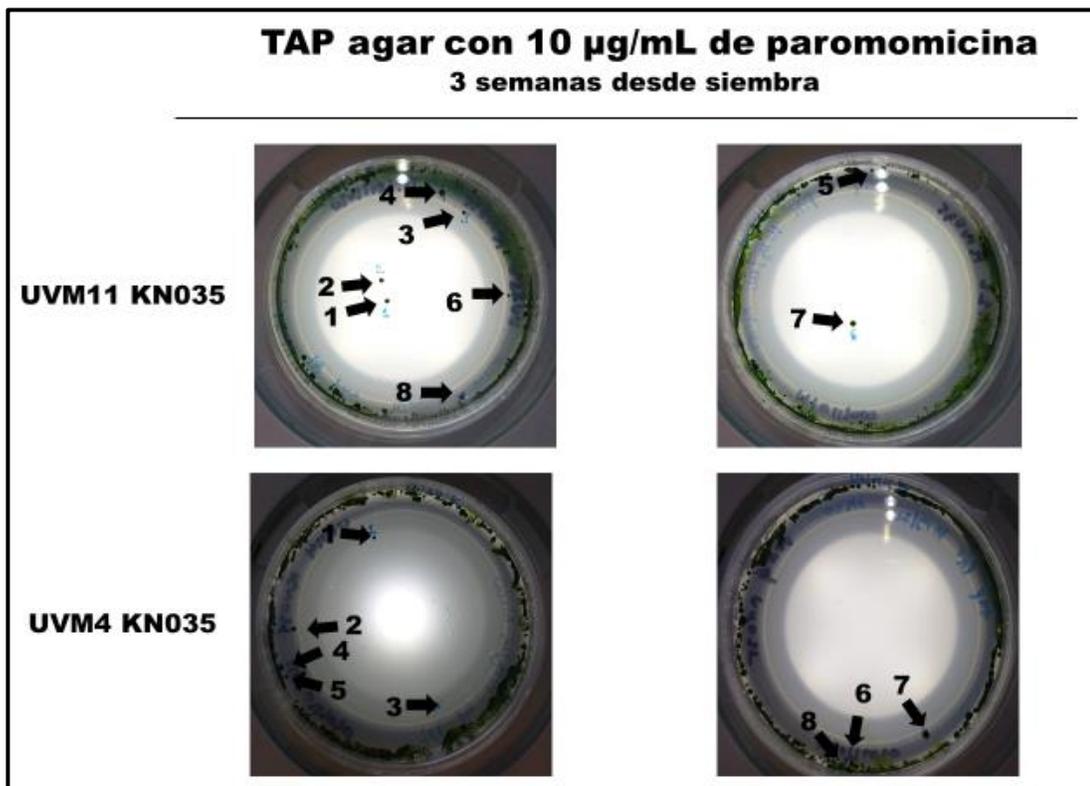


Figura 34: Colonias genéticamente independientes de transformantes de las cepas UVM11 KN035 y UVM4 KN035. De cada una de las cepas, se seleccionaron 8 colonias, señaladas por las flechas negras en

cada una de las imágenes, para ser traspasadas de siembra en siembra y así generar líneas genéticamente independientes que portaran la construcción que permitiese la expresión del nanocuerpo KN035.

Cada una de estas líneas fue posteriormente sembrada en el mismo tipo de medio para de esta forma poder generar un stock elevado de cada una de las distintas líneas clonales. Esto se muestra en la Figura 35 donde se muestra la primera siembra desde las placas mostradas en la Figura 34 hasta la tercera siembra de cada una de las líneas, mostrando que estas presentan una estable resistencia al medio de presión selectiva.

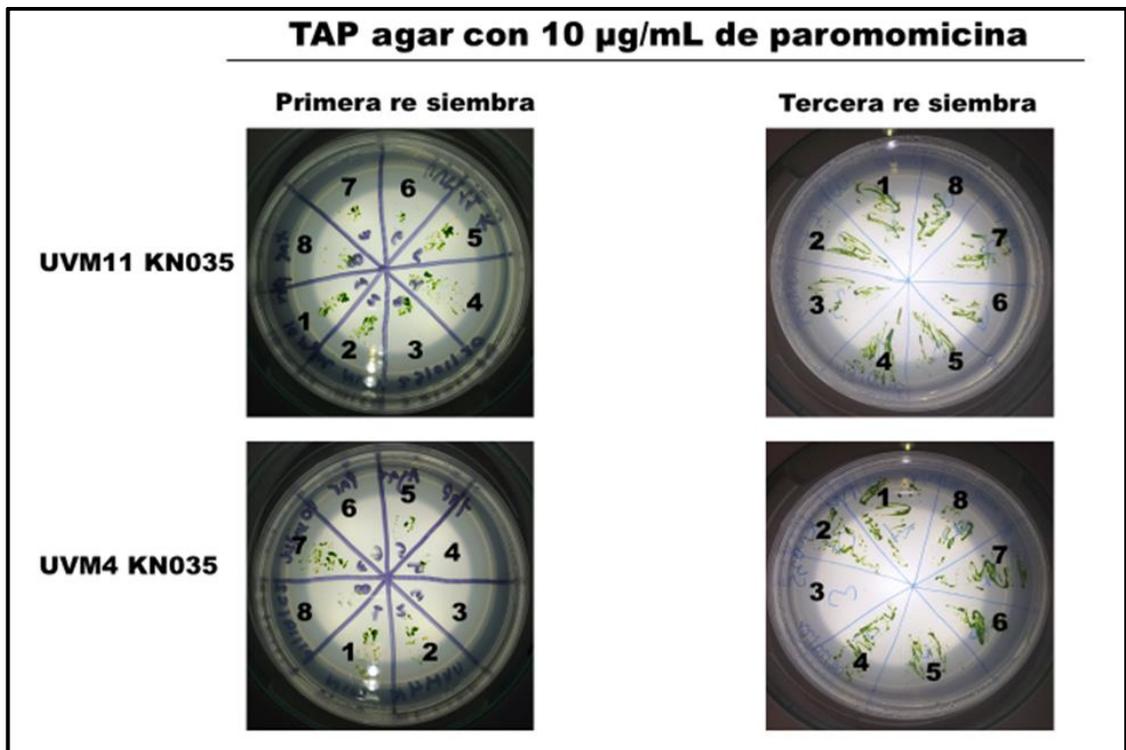


Figura 35: Mantenimiento y expansión de poblaciones clonales de las cepas UVM11 KN035 y UVM4 KN035. Imágenes de tanto la primera resiembra (primera columna) como de la tercera resiembra de forma

lineal. Para todos los casos el medio corresponde a TAP agar con $10 [\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$ de paromomicina. Cada línea es señalada por los números en negrita que se muestran en cada una de las divisiones de las placas. Es de interés notar, que para la cepa UVM4 KN035 no existe línea número 3 ya que la colonia original no mostró crecimiento al ser resembrada.

De todas las colonias sólo hubo una que no logró sobrevivir a la resiembra, la cual correspondía a la colonia número 3 de la cepa UVM4 KN035. De este modo, la mencionada cepa quedaba con 7 líneas genéticamente independientes mientras que de la cepa UVM11 KN035 se generaron 8 líneas. Para referirse a estas líneas, se utilizará como acrónimo para las figuras y texto, el número 11 o 4 para referirse a la cepa desde la que vienen, la letra K para hacer referencia a que portan el casete de expresión para KN035 diseñado previamente, y el número corresponde a la línea. Por ejemplo, la línea número 5 de la cepa UVM4 KN035, se denominó 4K5 mientras que la línea 5 de la cepa UVM11 KN035 se denominó 11K5. La Tabla I del anexo, incluye un pequeño resumen de todas estas.

Si bien todas las cepas provienen de una población que demostró portar el transgén específico para KN035 y que además son resistentes a paromomicina, no es posible afirmar por tales razones que estas líneas generadas aquí presenten la construcción Ars2-KN035-6xHis. Para confirmar su presencia, se realizó un PCR utilizando los partidores R gblock y F gblock usando como molde el DNA genómico de cada una de estas líneas. Para ello, se seleccionaron 6 de los 8 clones por cada una de las cepas originales. Los resultados de las reacciones de PCR se muestran en la la Figura 36 y 37.

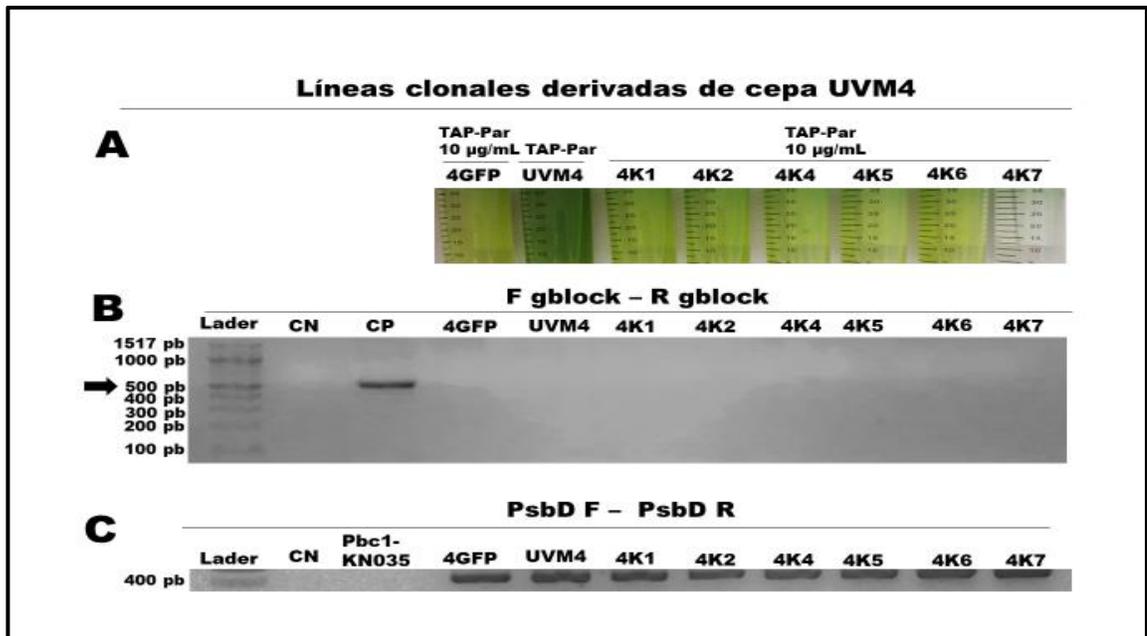


Figura 36: Análisis molecular de la presencia del casete *Ars2-KN035-6xHis* en las líneas clonales derivadas de la cepa UVM4. En (A), se visualizan cultivos de cada una de las cepas clonales junto con los controles UVM4 y UVM4 GFP. La cepa 4K7 no pudo ser traspasada desde placas de TAP sólido con 10 [µg/mL] de paromomicina a cultivos líquidos del mismo medio con la misma concentración de antibiótico. Al momento de realizar el PCR teniendo como molde el DNA nuclear de dichas cepas, ninguna exhibió la presencia de la banda deseada cercana a los 500 [pb] mostrada por una flecha negra al costado izquierdo. Como control positivo (CP) se utilizó el vector Pbc1-KN035 (B). Como control positivo de la reacción se realizó un PCR contra el gen *psbD*, endógeno de *C. reinhardtii* (C). Como control negativo (CN) se reemplazó el material genético por agua.

Como se puede observar en la Figura 36, ninguna de las cepas derivadas de la transformación de la cepa UVM4 logró insertar de forma correcta la construcción aún cuando mostraron en casi todos los casos, poseer la resistencia a paromomicina. Para el caso de las líneas derivadas de la transformación de la cepa UVM11 el resultado se muestra en la Figura 37.

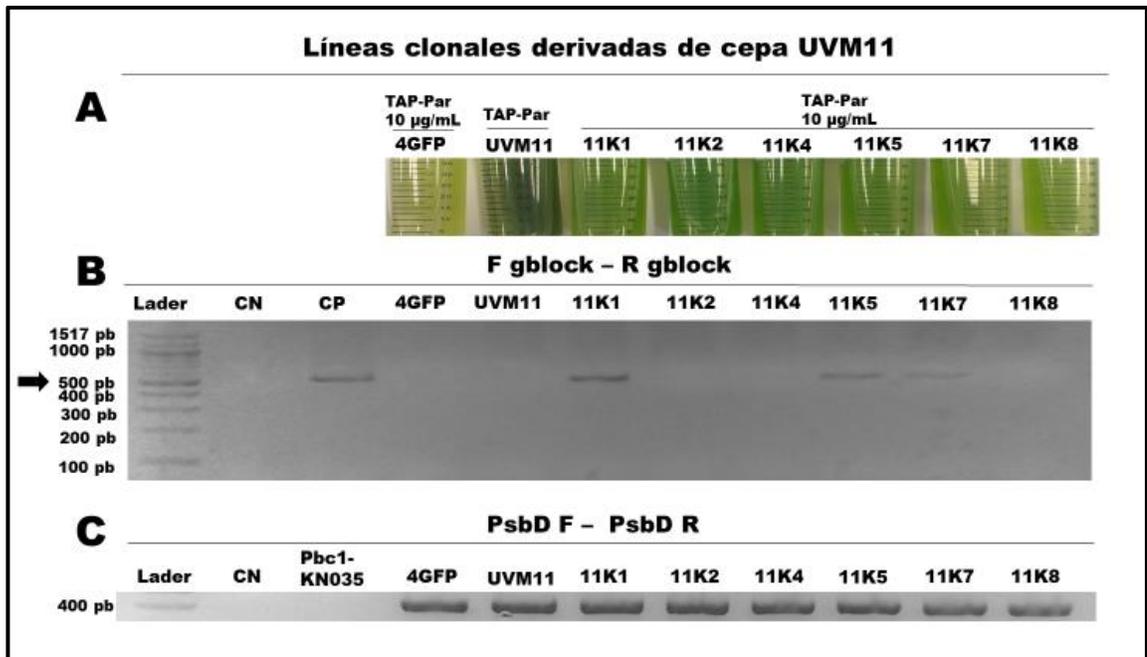


Figura 37: Análisis molecular de la presencia del casete Ars2-KN035-6xHis en las líneas clonales derivadas de la cepa UVM11. En (A), cultivos de cada una de las cepas clonales junto con los controles UVM11 y UVM4 GFP. Al realizar el PCR teniendo como molde el DNA nuclear de estas cepas, solo tres: 11K1, 11K5 y 11K7 exhibieron la presencia de la banda deseada, presente también en el control positivo (CP) representado por el vector Pbc1-KN035 con una banda cercana a los 500 [pb] mostrada por una flecha negra en el costado derecho (B). Como control positivo de la reacción se realizó un PCR contra el gen psbD, endógeno de *C. reinhardtii* (C). Como control negativo (CN) se reemplazó el material genético por agua.

A partir de lo mostrado en la Figura 37, se pudo concluir que en el caso de las líneas derivadas de los transformados de la cepa UVM11, tres líneas: 11K1, 11K5 y 11K7 exhiben en su genoma la presencia de la construcción que permite la expresión del nanocuerpo KN035.

O. E 3: Corroborar la expresión de la construcción codificante para KN035 en *C. reinhardtii* a nivel de transcrito.

3.4.- Análisis de la presencia de transcrito Ars2-KN035-6xHis en las cepas transformantes.

Se diseñaron 4 pares de partidores de forma de poder generar 4 amplicones de diferentes tamaños teniendo como molde diferentes zonas del casete. A continuación, se esquematizan dichas zonas:

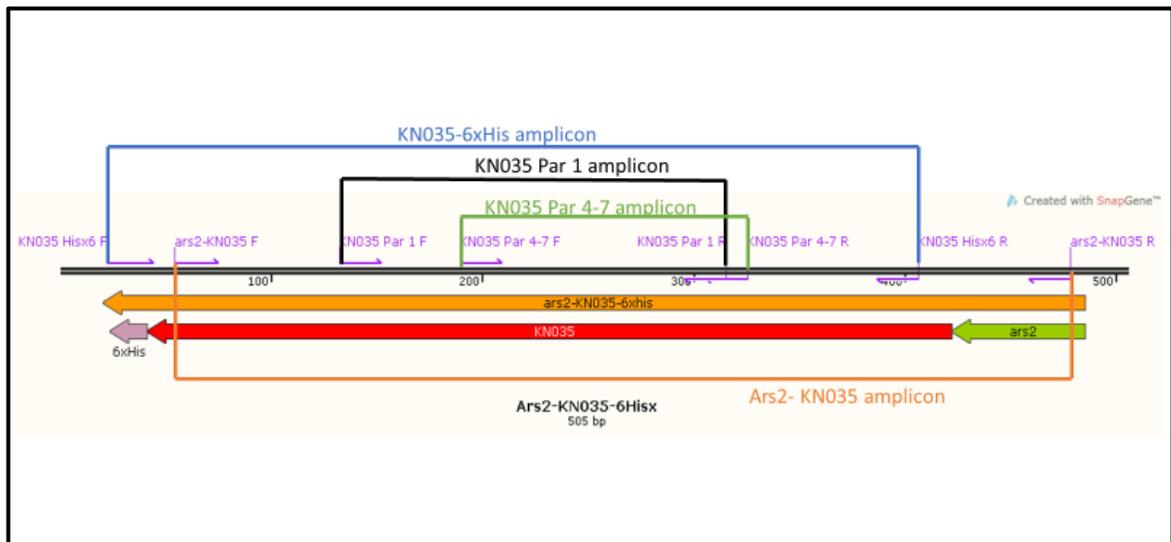


Figura 38: Posibles amplicones y zonas de anclaje respecto al mensajero de Ars2-KN035-6xHis. En azul se detalla aquel asociado al par de partidores KN035-6xHis, en negro está el amplicón del par KN035 Par1, en verde el más pequeño de todos los posibles amplicones correspondiente al par KN035 par 4-7. Abajo en naranja, se esquematiza el amplicón posible del par Ars2-KN035.

Los detalles de los partidores y amplicones diseñados se muestran en la Tabla 8 de la sección 2.9.2.

Se extrajo RNA total de las cepas 11K1, 11K5 y 11K (Tabla anexo I), para luego realizar la correspondiente cuantificación y, en primer lugar, se seleccionó el par de partidores “KN035 par 1” (Tabla 8) para la realización de una reacción de RT-PCR esperando obtener un amplicón de aproximadamente 180 [pb] que se extiende exclusivamente por la zona asociada a la secuencia de KN035 (Figura 39).

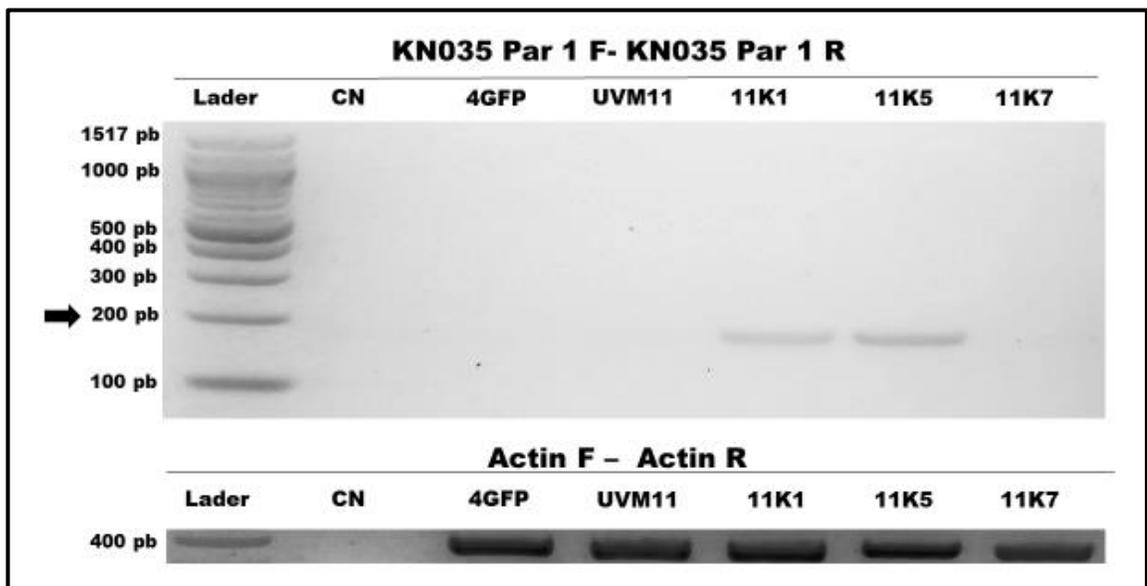


Figura 39: RT-PCR específico para el mensajero Ars2-KN035-6xHis. Utilizando los partidores KN035 Par 1 se amplificó una zona del mensajero de la construcción. El tamaño de la banda esperada es indicado por la flecha negra cercano a los 200 [pb]. Dicha prueba se realizó con RNA aislado de las cepas 11K1, 11K5, 11K7, UVM4 GFP y UVM11. En el gel de abajo se tiene el control positivo de la reacción, donde se amplificó una zona del mensajero del gen de actina endógeno de *C. reihnardtii* con un tamaño esperado cercano a los 400 [pb]. Como control negativo (CN) se remplazo el material genético por agua.

Con lo observado en la Figura 39 sólo se pudo confirmar la presencia del transcrito estudiado en las cepas 11K1 y 11K5. Esto es consistente ya que los controles negativos (CN y UVM11) no mostraron presencia del amplicón. Para confirmar este resultado, se realizó una segunda reacción de RT-PCR utilizando la pareja de partidores Ars2-KN035 (amplicón esperado de 413 [pb]) que amplifican una región más grande no exclusiva de KN035.

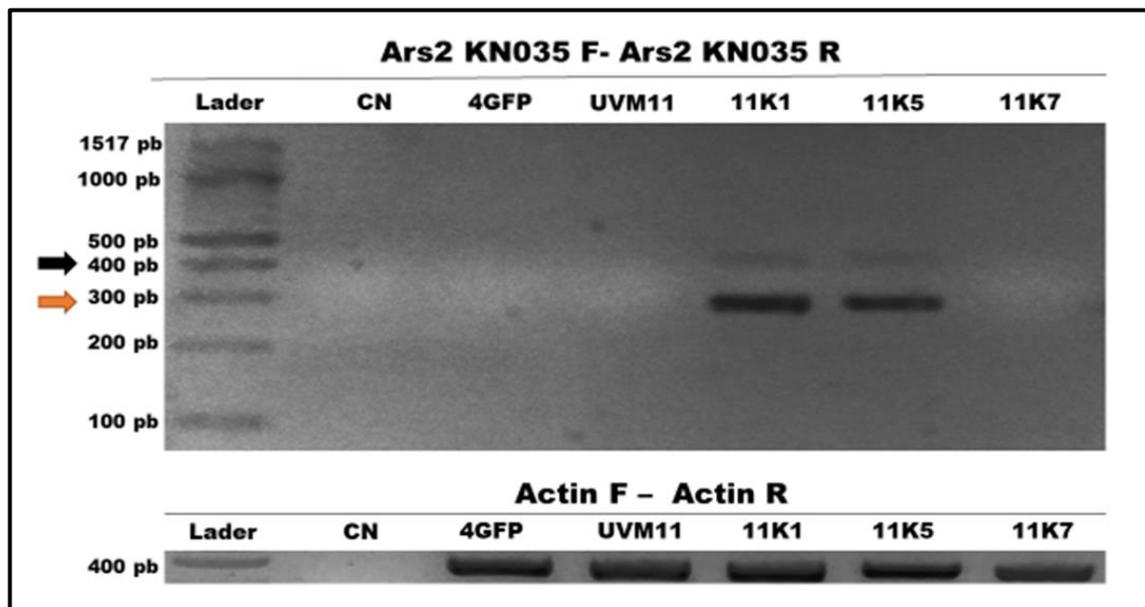


Figura 40: RT-PCR específico para el mensajero Ars2-KN035-6xHis. Utilizando el par Ars2-KN035 se buscó amplificar una región distinta de 413 [pb] del mensajero asociado a la construcción Ars2-KN035-6xHis sometiendo las mismas cepas que la Figura 39. Ninguno de los controles negativos (UVM4 GFP y UVM11 *wt*) exhibió ninguna de las bandas. Como control positivo de la reacción se utilizó un par de partidores destinados a amplificar 401 [pb] del mensajero del gen de actina endógeno de *C. reinhardtii*. El control negativo de la reacción (CN) correspondió en ambos a remplazarse el RNA por agua.

A diferencia de lo observado en la Figura 39, se evidenció no solo la banda esperada, cercana a los 400 [pb] sino que también una alternativa de mayor intensidad de aproximadamente 300 [pb]. Ésta podría tratarse de la amplificación de una variante del transcrito producto de *splicing* alternativo. Sin embargo, esto continúa siendo coherente con los resultados mostrados en la Figura 40 y refuerza la idea de que, en dichas cepas, se está generando una transcripción asociada al casete añadido.

4. DISCUSIÓN

La microalga verde *C. reinhardtii* ha sido durante muchos años un modelo de estudios en diferentes tópicos que van desde motilidad celular hasta fotosíntesis. Sin embargo, desde la primera transformación nuclear y cloroplástica en 1988 (Boynton y col, 1988; Blowers y col, 1989; Kindle y col, 1989), este organismo ha tomado un profundo interés biotecnológico, transformándose en un blanco de trabajos y avances relativos a ingeniería genética, con el fin de poder convertir a *C. reinhardtii* en una biofábrica de moléculas de interés tanto comercial como terapéutico (Scaife y col, 2015). En términos productivos, este organismo ofrece también una rápida proliferación, fácil escalabilidad, sustentabilidad y seguridad, siendo clasificado como organismo GRAS, del inglés *generally recognized as safe* (Jarquin-Cordero y col, 2019).

Ejemplos de estos éxitos son la síntesis de factores involucrados en la regeneración de heridas (Chávez y col, 2015; Jarquín-Cordero y col, 2019), los cuales en combinación con la producción endógena de oxígeno que estos organismos poseen, han permitido la generación de matrices fotosintéticas de regeneración dermal, donde *C. reinhardtii* actúa como una biofábrica *in situ* (Chávez y col, 2015). En este mismo sentido, otro objetivo interesante de oxigenación son los tumores, donde son característicos los ambientes hipóxicos, los cuales son factores pronósticos y predictivos negativos debido a que contribuyen a la quimioresistencia, radioresistencia y metástasis entre otros factores (Wilson & Hay, 2011). Durante el año 2020, se publicó un sistema en el cual ejemplares

de la microalga verde *Chlorella vulgaris* fueron ingenierizados para ser utilizados como biofábrica de oxígeno *in situ* en ratones con tumores subcutáneos 4T1, presentando alentadores resultados relacionados a inhibición de crecimiento tumoral, aparentemente debido a una correcta oxigenación de dichos tumores (Qiao y col, 2020) como también estrategias similares utilizando cianobacterias (Huo y col, 2020; Liu y col, 2020). Sin embargo, dichas estrategias fotosintéticas no dan respuesta a otro importante aspecto en la batalla contra el cáncer: la inmunosupresión. Este fenómeno puede ser observado en diferentes tipos de cáncer y puede ser desatado utilizando diferentes mecanismos (O'Sullivan y col, 1996; von Bernstorff y col, 2001; Torres-Poveda y col 2014).

Un mecanismo ampliamente observado y estudiado por el cual las células tumorales pueden evadir al sistema inmune es por medio de la vía PD1-PDL1. Esta vía, corresponde a un *checkpoint* inmunológico asociado al mantenimiento de la autotolerancia y a la prevención de reacciones autoinmunes (Zhang y col, 2017) mecanismo el cual, ha sido también usurpado por células cancerígenas. De esta forma, la interrupción de dicha interacción se ha convertido en un *hot spot* en lo que respecta al desarrollo de diferentes tecnologías que van desde bloqueo por anticuerpos, uso de terapia génica, uso de células T clonales tumor-específicas, entre otras (Okazaki & Honjo, 2006).

Una atractiva nueva alternativa, que podría remplazar el uso de anticuerpos para generar el bloqueo de la interacción PD1-PDL1 es el uso de nanocuerpos. Estos, poseen sólidas ventajas, mencionadas en la introducción, sobre los anticuerpos tradicionalmente utilizados. En particular, en el año 2017, se publicó una completa caracterización del nanocuerpo KN035 que podría cumplir esta condición (Zhang y col, 2017). En base a

estos antecedentes, se vuelve interesante el proyectar fusionar dos frentes de ataque en futuras terapias celulares contra el cáncer: la oxigenación tumoral y la reversión de la inmunosupresión local ejercida a través de la vía PD1-PDL1.

En términos de oxigenación tumoral, existen antecedentes utilizando *C. vulgaris*. Esta especie ha sido transformada y utilizada para la producción recombinante de proteínas (Niu y col, 2011; Talebi y col, 2013; Yang y col, 2015), siendo un candidato para la transformación y producción del nanocuerpo KN035, cumpliendo este doble alcance recién proyectado. Sin embargo, *C. vulgaris* carece de las ventajas mostradas en *C. reinhardtii* respecto a su baja inmunogenicidad en modelos *in vivo*, en términos de inflamación sistémica y local en las zonas aledañas (Chávez y col, 2015). Si analizamos desde la perspectiva de que aquellas microalgas también pueden actuar como biofábrica de moléculas terapéuticas, *C. reinhardtii* toma ventaja sobre *C. vulgaris*, debido a la gran cantidad de herramientas moleculares disponibles para realizar ingeniería genética con estas microalgas, (Crozet y col, 2018).

El único antecedente, a la fecha, que se tiene de producción recombinante en el cloroplasto de nanocuerpos en *C. reinhardtii*, fue la producción tres distintos nanocuerpos que funcionan como antitoxinas contra la neurotoxina botulínica (Barrera y col, 2015). Sin embargo, la idea de producir nanocuerpos a través de una transformación en el cloroplasto no se vuelve tan atractiva, si consideramos que la secreción al medio externo es muy compleja, por ende, el microorganismo no puede actuar como biofábrica *in situ*. Para ello, es necesario una transformación nuclear, estrategia abordada en esta tesis, método con el

cual no se ha reportado producción nanocuerpos utilizándose *C. reinhardtii* hasta el momento, escogiéndose KN035 por las razones anteriormente expuestas.

Cuando se realizó la optimización de codones para la construcción Ars2-KN035-6xHis, la secuencia entregada alcanzó un contenido de GC aún muy alto para que fuese inmediatamente aprobado por el algoritmo de síntesis de IDT (Figura 15). Esto forzó a rearmar la secuencia optimizada para que pudiese ser sintetizada *de novo*. Si bien, el criterio seguido fue mantener la segunda preferencia más alta en términos de codones, cabe destacar que no es lo óptimo en vista de asegurar que el transgén no sea silenciado (Figuras 16 y 17).

El uso de nuevas tecnologías de ensamblaje como *Gibson Assembly*, demostró en este trabajo sus amplias facilidades y ventajas. Sin problema, en una simple reacción de apenas una hora, se obtuvo un vector completamente funcional generado a partir de distintas piezas de PCR obtenidos de un *backbone* compatible (Figuras 22, 23, 24 y 29). Lo interesante de ello, es la versatilidad que ofrece, ya que del mismo vector *backbone* diseñando los partidores correctos, puede ser utilizado para la expresión de cualquiera otra proteína. Esto, se potencia a la posibilidad actual de poder diseñar *in silico* cada una de las reacciones, como fue realizado en este Seminario de Título, pudiendo anteponerse a errores y dificultades en el diseño, en especial, en aquellos relacionados a las zonas de *overhang* entre cada una de las piezas. En el presente trabajo, las uniones del vector fueron estratégicamente diseñadas para que se ubicasen en zonas críticas del vector, como las resistencias a antibióticos selectivos (Figura 22). De este modo, en caso de no existir una correcta unión entre las piezas, al momento de transformar, ya sea en bacterias o en las

algas, estas no podrían haber sobrevivido a la presión del antibiótico, reduciendo así, la cantidad de falsos positivos. Es muy probable, que un fenómeno asociado a este hecho sea el que explique por qué la eficiencia de transformación entre el vector Pbc1-KN035 de originario de la transformación A fuese tan distinta al originario de la transformación G. El único elemento que diferencia dichos vectores, radica en el origen de la pieza Lg que corresponde a la construcción Ars2-KN035-6xHis. En el caso de la transformación G, se utilizó directamente la construcción sintetizada por IDT; mientras que A, corresponde a la amplificación por PCR de dicho segmento de DNA. Además, existe la posibilidad de que pequeños errores en la reacción de PCR hayan facilitado que la cantidad de vector correctamente producido haya disminuido en el caso de la reacción A, desembocando en una transformación considerablemente menos eficiente.

C. reinhardtii es conocida por su alta velocidad de crecimiento, fáciles requisitos de cultivos y poca dificultad de trabajo en materia relacionado a ingeniería genética. Es por ello, que la elección de transformarlas utilizando la estrategia de *glass beads* se debe básicamente a la simplicidad de la técnica, como al no requerir equipamiento especializado. Además, se ha descrito que *C. reinhardtii* presenta una estabilidad del fenotipo recombinante en el tiempo, sin la presencia de presión de selección, al utilizar la técnica de *glass beads*, bastante más alta que la electroporación o la biobalística (Coll J. M, 2006).

Posterior a la transformación de *C. reinhardtii*, a nivel de protocolo, fue necesario generar cultivar las colonias en presencia de antibiótico, lo cual hizo que el tiempo de crecimiento de las algas transformadas fuese cercano a un mes. Esto, es una considerable cantidad de

tiempo, más si se tiene en cuenta la posibilidad de que no exista ningún tipo de crecimiento, debido a fallas en la expresión del gen de resistencia al antibiótico. En este trabajo, ante la inquietud de poder acelerar ese proceso de selección en medio sólido con antibiótico, se probó si es que era posible seleccionar transformantes desde medio líquido con antibiótico, pudiendo reducirse así el tiempo de crecimiento. Afortunadamente a los doce días, fue posible observar selección y crecimiento en una de las cepas aquí generadas, dando certeza de que el experimento de transformación fue correcto (Figuras 29 y 30). Sin embargo, con el objetivo de asegurar homogeneidad genética, se realizaron posteriores selecciones de líneas clonales teniendo seguridad de la presencia de la resistencia antibiótica, y, por ende, con mayores probabilidades de obtener la presencia del transgén (Figuras 34 y 35).

Durante este trabajo se demostró la presencia del transgén en el genoma nuclear de dos cepas distintas, las cuales poseían carácter heterogéneo, comprobando con éxito que la construcción Ars2-KN035-6xHis diseñada en este trabajo, fue insertada en el núcleo (Figura 32). No obstante, dichas cepas, UVM11 KN035 y UVM4 KN035 correspondían a poblaciones heterogéneas a nivel genético, ante lo cual fue necesario establecer poblaciones clonales. Sin embargo, al momento de realizar el mismo tipo de PCR realizado a las poblaciones heterogéneas, éstas demostraron que ninguno de los clones seleccionados desde cultivos heterogéneos de UVM4 KN035 tenían de la construcción Ars-KN035-6xHis (Figura 36). Por su parte, en aquellos clones derivados de UVM11 KN035 si fue posible comprobar la presencia de la construcción en tres poblaciones clonales distintas (Figura 37). Estos resultados pueden ser abordados desde distintos

enfoques: el primero, hace referencia a que la alta variabilidad genética que pudo existir en las poblaciones heterogéneas haya tenido una fuerte incidencia. La razón de porque siempre se obtuvo clones resistentes al antibiótico, pero que no necesariamente portaran la construcción Ars2-KN035-6xHis, puede deberse a la constante presión selectiva. En este caso, el crecimiento sólo es posible si se mantiene el gen de resistencia al antibiótico paromomicina activo, dando ventaja adaptativa, impidiendo que este gen sea silenciado tanto a nivel transcripcional, como por recombinación o rearrreglos de los cromosomas. Sin embargo, en ese contexto el poseer la construcción para el nanocuerpo no aportaría ventaja y podría suponerse que sería mucho más susceptible a la pérdida por recombinación. Otro enfoque pudiese estar relacionado a la presencia de transgenes temporalmente episómicos. Se ha descrito que en *C. reinhardtii* puede existir presencia de DNA episomal temporal (Rochaix & Van Dillewijn, 1982), el cual es más propenso a aparecer cuando se utilizan plásmidos circulares para transformar, los cuales pueden estar en estado *supercoiled* (Coll J. M, 2006), tal como el vector Pbc1-KN035. En ese sentido y considerando la gran cantidad de transformantes (hasta cien transformantes por millón de transfectados) que la metodología de *glass beads* produce (Coll J. M, 2006), es posible pensar que una fracción haya podido mantener el plásmido de forma episómica, de forma que no sería estable en el tiempo, desapareciendo tras algunas generaciones en especial si la presión antibiótica selectiva se pierde o reduce en el tiempo (Coll J. M, 2006). Sin embargo, este DNA en estado episomal pudo haber sido susceptible al aislamiento de DNA realizado, para más tarde ser usado como molde en experimentos de PCR para constatar la presencia del transgén.

La mera presencia de la construcción en el genoma de las cepas 11K3, 11K5 y 11K7, no asegura que el transgen se transcriba. Por ello, se evaluó su expresión a nivel de transcrito a través de RT-PCR con partidores que permiten reconocer específicamente el mensajero del nanocuerpo KN035. La realización de dicho ensayo permitió constatar que sólo 2 de las líneas portadoras del transgén, las líneas 11K1 y 11K5, generaban un transcrito asociado a la construcción (Figura 39 y Figura 40), ya que fue posible observar producto de PCR del tamaño esperado. Estudios han demostrado que existiría un potencial efecto posicional de los transgenes integrados en forma aleatoria (Leon & Fernandez, 2007), de manera que se puede inducir el silenciamiento, al coincidir en zonas que no son fácilmente accesibles para la maquinaria de expresión, mostrándose incluso diferencias en los niveles de expresión entre clones transformados con el mismo fragmento de DNA (Weiner y col, 2018). Este efecto no debe ser despreciado, porque, además, es un *gap* no enfrentado en ninguna de las estrategias clásicas mencionadas anteriormente, y que está simplemente relacionado a la aleatoriedad de la inserción de los transgenes y no a un efecto debido a la naturaleza genética del alga misma. Cabe destacar que además del producto de PCR del tamaño esperado en las líneas líneas 11K1 y 11K5, también se observó la presencia de un posible mRNA de alrededor de 100 [pb] menos, cuya banda era de mayor intensidad indicando que es probable que la cantidad de mRNA asociado a dicha banda pueda ser mayor que la cantidad que hay del mensajero esperado. Para corroborar dicha hipótesis pruebas cuantitativas como un qPCR debiesen ser realizadas. Como dicha banda no fue observada en las cepas UVM11 *wt*, UVM4 GFP ni en ninguna de las otras líneas evaluadas (11K7), con el control positivo correcto en todos los casos, es posible que la maquinaria de procesamiento de mRNA esté detectando zonas para posibles *splicing* alternativo,

dentro de la secuencia codificante para KN035, generando por ende un transcrito alternativo de KN035. Si la banda de menor tamaño fuese una banda inespecífica, se esperaría que ésta se hubiese encontrado en todas las otras cepas. El 88% de todos los genes de *C. reinhardtii* poseen intrones con un promedio de 7.2 intrones por gen y un largo promedio de exón de 240 [pb], por lo que la idea de un *splicing* alternativo en este microorganismo no es extraña (Weiner y col, 2018). Además, se ha relacionado que bajas tasas de producción recombinante se verían asociado al mecanismo de *splicing* (Weiner y col, 2018; Baier y col, 2018). Estas razones son las mismas que pueden explicar el por qué la línea 11K7, portadora de la construcción no mostró transcrito de este mismo.

Finalmente, es necesario realizar experimentos que permitan captar y aislar el nanocuerpo, ya sea del medio extracelular o del medio intracelular, considerando que la presencia de su mRNA no asegura la síntesis del nanocuerpo. Drante el diseño *in silico* de la construcción, se decidió anexar un *tag* de seis histidinas al nanocuerpo para su posterior purificación. Esto es común a la hora de producir nanocuerpos de forma recombinante (Conrath y col, 2001; Vaneycken y col, 2010; D'huyvetter y col, 2014) y abre posibilidades de generar detección del nanocuerpo vía ELISA, *western blot* o inmunoprecipitación. Debido al pequeño tamaño del nanocuerpo, la idea de poder detectarlo con técnicas dependientes de gel puede ser complejo, ganado fuerza estrategias como test ELISA en combinación de cromatografías, estrategias también utilizadas con anterioridad (Saerens y col, 2004). La posibilidad de encontrar la proteína en el medio extracelular es esperable debido a la presencia del ya probado péptido señal Ars2, el cual

ha tenido resultados exitosos para la liberación de factores de crecimiento (Chávez y col 2015, Jarquín-Cordero y col, 2019).

A futuro más lejano, se pueden proyectar interesantes experimentos relacionados a co-cultivos con células cancerígenas, pudiéndose evaluar la reacción de estas ante la presencia del alga y el nanocuerpo KN035, así como también; la evaluación *in vivo* de la respuesta tumoral ante la oxigenación y la entrega del nanocuerpo KN035 en el tumor tanto previo a irradiarse como posterior. Interesante sería también poder cuantificar los niveles de expresión del nanocuerpo, tanto en condiciones de co-cultivo con células tumorales como sin ellas, estableciendo si existen parámetros que favorezcan mayores tasas de expresión, con el objetivo de poder adecuar cualquier tipo de terapia a ellos, buscando conseguir la mayor eficacia en la actividad antitumoral.

A modo de conclusión, a través de este estudio se pudo demostrar que es posible utilizar las tecnologías bioinformáticas disponibles para desarrollar vectores genéticos que permitan la transformación nuclear de *C. reinhardtii*, así como también la transcripción de un mRNA asociado a un nanocuerpo de alto impacto inmunológico en tratamientos antitumorales el cual posteriormente pudiese ser liberado de forma local desde esta microalga permitiendo proponer el desarrollo de nuevas terapias antitumorales basadas en microalgas genéticamente modificadas, para que liberen tanto oxígeno como moléculas inmunomoduladoras directamente en el tumor, modificando de esta forma el microambiente tumoral.

5. CONCLUSIONES

- 1.- Se diseñó y generó el vector Pbc1-KN035 el cual contiene la construcción para la expresión funcional del nanocuerpo KN035.
- 2.- Las piezas generadas; L1, L2, L3 pueden ser utilizadas para generar nuevos vectores que expresen distintas proteínas en este modelo.
- 3.- Se logró transformar exitosamente las cepas UVM11 y UVM4 utilizando el vector producido, generando 8 y 7 líneas clonales respectivamente resistentes al antibiótico paromomicina.
- 4.- Se corroboró molecularmente que tres líneas clonales derivadas de la cepa UVM11 portan la construcción para la expresión de KN035.
- 5.- De aquellas líneas, 11K1 y 11K5 mostraron tener presencia de mRNA asociado al nanocuerpo. Encontrándose, además, evidencia de al parecer un *splicing* alternativo para el mRNA relativo a la construcción genética aquí desarrollada.

6. BIBLIOGRAFÍA

Akbay, E. A., Koyama, S., Carretero, J., Altabef, A., Tchaicha, J. H., Christensen, C. L., ... & Wilkerson, M. D. (2013). Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer discovery*, 3(12), 1355-1363.

Baier, T., Wichmann, J., Kruse, O., & Lauersen, K. J. (2018). Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic acids research*, 46(13), 6909-6919.

Barrera, D. J., Rosenberg, J. N., Chiu, J. G., Chang, Y. N., Debatis, M., Ngoi, S. M., ... & Mayfield, S. P. (2015). Algal chloroplast produced camelid VHH antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant biotechnology journal*, 13(1), 117-124.

Blowers, A. D., Bogorad, L., Shark, K. B., & Sanford, J. C. (1989). Studies on *Chlamydomonas* chloroplast transformation: foreign DNA can be stably maintained in the chromosome. *The Plant Cell*, 1(1), 123-132.

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

Barahimipour, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda, M., Merchant, S. S., & Bock, R. (2015). Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 84(4), 704-717.

Bertalan, I., Munder, M. C., Weiß, C., Kopf, J., Fischer, D., & Johanningmeier, U. (2015). A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of biotechnology*, 195, 60-66.

Casini, A., Storch, M., Baldwin, G. S., & Ellis, T. (2015). Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(9), 568-576.

Centeno-Cerdas, C., Jarquín-Cordero, M., Chávez, M. N., Hopfner, U., Holmes, C., Schmauss, D, ... & Egaña, J. T. (2018). Development of photosynthetic sutures for the local delivery of oxygen and recombinant growth factors in wounds. *Acta biomaterialia*, 81, 184-194.

Chávez, M. N., Schenck, T. L., Hopfner, U., Centeno-Cerdas, C., Somlai-Schweiger, I., Schwarz, C., ... & Nickelsen, J. (2016). Towards autotrophic tissue engineering: photosynthetic gene therapy for regeneration. *Biomaterials*, 75, 25-36.

Churchill-Davidson, I., Foster, C. A., Wiernik, G., Collins, C. D., Pizey, N. C. D., Skeggs, D. B. L., & Purser, P. R. (1966). The place of oxygen in radiotherapy. *The British journal of radiology*, 39(461), 321-331.

Coll, J. M. (2006). Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae. *Spanish Journal of Agricultural Research*, (4), 316-330

Conrath, K. E., Lauwereys, M., Galleni, M., Matagne, A., Frère, J. M., Kinne, J., ... & Muyldermans, S. (2001). β -Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(10), 2807-2812.

Crozet, P., Navarro, F. J., Willmund, F., Mehrshahi, P., Bakowski, K., Lauersen, K. J., ... & Niemeyer, J. (2018). Birth of a photosynthetic chassis: A MoClo toolkit enabling synthetic biology in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS synthetic biology*, 7(9), 2074-2086.

Deans, T. L., Grainger, D. W., & Fussenegger, M. (2016). Synthetic Biology: Innovative approaches for pharmaceuticals and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 105(Pt A), 1.

Dejtisakdi, W., & Miller, S. M. (2016). Overexpression of Calvin cycle enzyme fructose 1, 6-bisphosphatase in *Chlamydomonas reinhardtii* has a detrimental effect on growth. *Algal research*, 14, 116-126.

D'huyvetter, M., Vincke, C., Xavier, C., Aerts, A., Impens, N., Baatout, S., ... & Lahoutte, T. (2014). Targeted radionuclide therapy with A ¹⁷⁷Lu-labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*, 4(7), 708.

Engler, C., Kandzia, R., & Marillonnet, S. (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS one*, 3(11).

Fischer, N., & Rochaix, J. D. (2001). The flanking regions of PsaD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics and Genomics*, 265(5), 888-894.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods*, 6(5), 343-345.

Gibson, D. G. (2014). Programming biological operating systems: genome design, assembly and activation. *Nature methods*, 11(5), 521.

Huo, M., Wang, L., Zhang, L., Wei, C., Chen, Y., & Shi, J. (2020). Photosynthetic Tumor Oxygenation by Photosensitizer-Containing Cyanobacteria for Enhanced Photodynamic Therapy. *Angewandte Chemie*, 132(5), 1922-1929.

Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12293–12297.

Jarquín-Cordero, M., Chávez, M. N., Centeno-Cerdas, C., Bohne, A. V., Hopfner, U., Machens, H. G, ... & Nickelsen, J. (2019). Towards a biotechnological platform for the production of human pro-angiogenic growth factors in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-15.

Jovčevska, I., & Muyldermans, S. (2019). The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs*, 1-16.

Kindle, K. L., Schnell, R. A., Fernández, E., & Lefebvre, P. A. (1989). Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase. *The Journal of cell biology*, 109(6), 2589-2601

Leon, R., & Fernandez, E. (2007). Nuclear transformation of eukaryotic microalgae. In *Transgenic microalgae as green cell factories* (pp. 1-11). Springer, New York, NY.

Levine, R.P. (1960). Genetic control of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46: 972–978.

Liu, L., He, H., Luo, Z., Zhou, H., Liang, R., Pan, H., ... & Cai, L. (2020). In Situ Photocatalyzed Oxygen Generation with Photosynthetic Bacteria to Enable Robust Immunogenic Photodynamic Therapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Advanced Functional Materials*, 30(10), 1910176.

McAllaster, M. R., Sinclair-Davis, A. N., Hilton, N. A., & de Graffenried, C. L. (2016). A unified approach towards *Trypanosoma brucei* functional genomics using Gibson assembly. *Molecular and biochemical parasitology*, 210(1-2), 13-21.

Neupert, J., Karcher, D., & Bock, R. (2009). Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *The Plant Journal*, 57(6), 1140-1150.

Niu, Y. F., Zhang, M. H., Xie, W. H., Li, J. N., Gao, Y. F., Yang, W. D., ... & Li, H. Y. (2011). A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. *Genet Mol Res*, 10(4), 3427-34.

Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T., & Honjo, T. (2001). PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13866-13871.

Okazaki, T., & Honjo, T. (2006). The PD-1–PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in immunology*, 27(4), 195-201.

O'Sullivan, G. C., Corbett, A. R., Shanahan, F., & Collins, J. K. (1996). Regional immunosuppression in esophageal squamous cancer: evidence from functional studies with matched lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 157(10), 4717-4720.

Qiao, Y., Yang, F., Xie, T., Du, Z., Zhong, D., Qi, Y., ... & Sun, Y. (2020). Engineered algae: A novel oxygen-generating system for effective treatment of hypoxic cancer. *Science Advances*, 6(21), eaba5996.

Ramos-Martinez, E. M., Fimognari, L., & Sakuragi, Y. (2017). High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant biotechnology journal*, 15(9), 1214-1224.

Reverts, H., De Baetselier, P., & Muyldermans, S. (2005). Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert opinion on biological therapy*, 5(1), 111-124.

Rochaix, J. D., & Van Dillewijn, J. (1982). Transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with yeast DNA. *Nature*, 296(5852), 70-72.

Saerens, D., Kinne, J., Bosmans, E., Wernery, U., Muyldermans, S., & Conrath, K. (2004). Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 51965-51972.

Salomé, P. A., & Merchant, S. S. (2019). A series of fortunate events: Introducing *Chlamydomonas* as a reference organism. *The Plant Cell*, 31(8), 1682-1707.

Salvador, J. P., Vilaplana, L., & Marco, M. P. (2019). Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(9), 1703-1713.

Scaife, M. A., Nguyen, G. T., Rico, J., Lambert, D., Helliwell, K. E., & Smith, A. G. (2015). Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *The Plant Journal*, 82(3), 532-546.

Shi, L., Chen, S., Yang, L., & Li, Y. (2013). The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*, 6(1), 74.

Talebi, A. F., Tohidfar, M., Tabatabaei, M., Bagheri, A., Mohsenpor, M., & Mohtashami, S. K. (2013). Genetic manipulation, a feasible tool to enhance unique characteristic of

Chlorella vulgaris as a feedstock for biodiesel production. *Molecular biology reports*, 40(7), 4421-4428.

Torres-Poveda, K., Bahena-Román, M., Madrid-González, C., Burguete-García, A. I., Bermúdez-Morales, V. H., Peralta-Zaragoza, O., & Madrid-Marina, V. (2014). Role of IL-10 and TGF- β 1 in local immunosuppression in HPV-associated cervical neoplasia. *World journal of clinical oncology*, 5(4), 753.

Vaneycken, I., Govaert, J., Vincke, C., Caveliers, V., Lahoutte, T., De Baetselier, P., ... & Devoogdt, N. (2010). In vitro analysis and in vivo tumor targeting of a humanized, grafted nanobody in mice using pinhole SPECT/micro-CT. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(7), 1099-1106.

von Bernstorff, W., Voss, M., Freichel, S., Schmid, A., Vogel, I., Jöhnk, C., ... & Kalthoff, H. (2001). Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 7(3), 925s-932s.

Weiner, I., Atar, S., Schweitzer, S., Eilenberg, H., Feldman, Y., Avitan, M., ... & Yacoby, I. (2018). Enhancing heterologous expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by transcript sequence optimization. *The Plant Journal*, 94(1), 22-31.

Wilson, W. R., & Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 393-410.

Yang, B., Liu, J., Liu, B., Sun, P., Ma, X., Jiang, Y., ... & Chen, F. (2015). Development of a stable genetic system for *Chlorella vulgaris*—A promising green alga for CO₂ biomitigation. *Algal research*, 12, 134-141.

ANEXO I

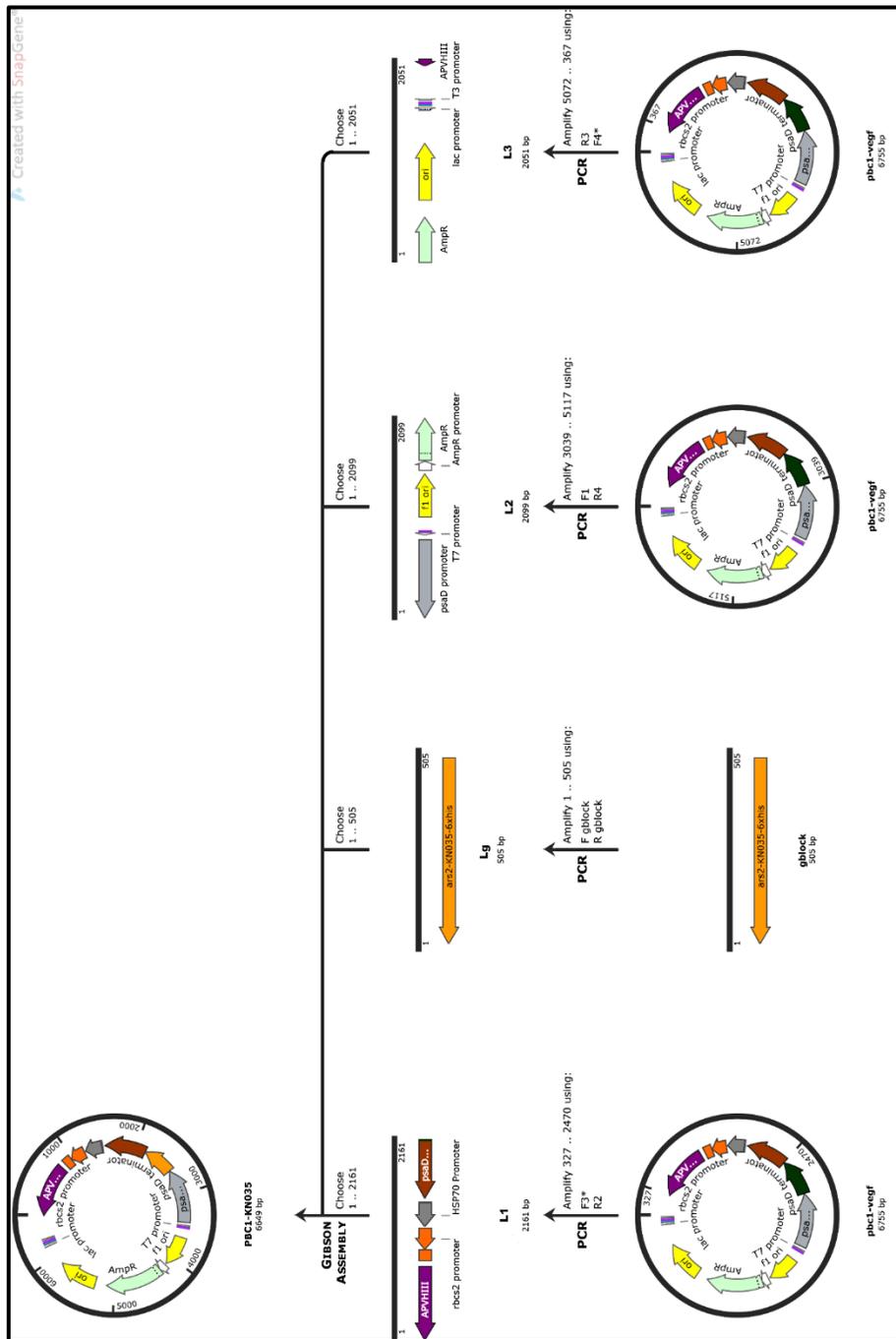


Figura 1 anexo: Resumen del procedimiento *in silico* simulado del ensamblaje del vector Pbc1-KN035.

Tabla I anexo: Resumen de las cepas trabajadas y obtenidas. El carácter no evaluado hace referencia a que, no seleccionada para extraer DNA de dicha línea, impidiendo por ende el análisis por PCR de la presencia de la construcción. El carácter -, denota que al no haber sido reportada la presencia de la construcción en el núcleo tras el PCR, dichas líneas no fueron seleccionadas para ser analizadas por RT-PCR.

Derivadas de UVM11	Resistencia Paromomicina [10 µg/mL]	Presencia construcción Ars2-KN035-6xHis	Presencia mRNA relativo a construcción Ars2-KN035-6xHis
11K1	Sí	Sí	Sí
11K2	Sí	No	-
11K3	Sí	No evaluada	No evaluada
11K4	Sí	No	-
11K5	Sí	No	Sí
11K6	Sí	Sí	-
11K7	Sí	Sí	No
11K8	Sí	No	-
Derivadas de UVM4			
4K1	Sí	No	-
4K2	Sí	No	-
4K3	No	-	-
4K4	Sí	No	-
4K5	Sí	No	-
4K6	Sí	No	-
4K7	Perdida	No	-
4K8	Sí	No evaluada	No evaluada