

El potencial del genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* para la producción de proteínas recombinantes

Christian Carreño-Campos*, María Luisa Villarreal, Anabel Ortiz Caltempa

Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos,
Av. Universidad 1001, 62209, Cuernavaca, Morelos

chrcam12@gmail.com

Resumen

En los últimos años, las microalgas son una gran alternativa en la investigación científica debido a su capacidad de producción de proteínas recombinantes con aplicaciones comerciales. Como plataforma de producción, tienen varias ventajas ya que crecen muy bien, se caracterizan por su capacidad de crecimiento en condiciones autótrofas, heterótrofas o mixótrofas. Con más de 70000 especies, las microalgas representan un gran potencial para producir proteínas recombinantes a niveles comercialmente factibles. De estas especies, *Chlamydomonas reinhardtii* se ha destacado por su gran potencial en la expresión de más de 100 genes en el genoma del cloroplasto que codifican para proteínas recombinantes como proteínas terapéuticas, anticuerpos, hormonas y vacunas. En comparación con la transformación nuclear, varios estudios demuestran que la acumulación de proteínas recombinantes es más alta cuando los genes que codifican para estas se expresan en el genoma del cloroplasto de las microalgas. Sin embargo, todavía existen muchos desafíos en el uso de la ingeniería del genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* incluyendo la búsqueda de mejoras en las estrategias moleculares para que esta especie se posicione como una plataforma de expresión estándar para la industria biotecnológica. En este trabajo, se reporta el potencial de *Chlamydomonas reinhardtii* como una plataforma de producción de proteínas recombinantes utilizando la tecnología de transformación del genoma del cloroplasto de acuerdo con lo reportado en artículos científicos.

Palabras clave: Microalgas, proteínas recombinantes, *Chlamydomonas reinhardtii*, transformación del genoma del cloroplasto.

Abstract

In recent years, microalgae have emerged as an alternative platform for the production of recombinant proteins with commercial applications. As a production platform, it has several advantages, including rapid growth, facility to scale up, and the ability to grow in autotrophic, heterotrophic, or mixotrophic conditions. With more than 70,000 species, microalgae represents a vast, unexplored potential resource for producing recombinant proteins with economic feasibility. Of these, *Chlamydomonas reinhardtii* has been noted for its potential to express more than 100 different recombinant proteins, including therapeutic proteins, antibodies, hormones, and vaccines. Compared to nuclear transformation, several studies have shown that the accumulation of recombinant proteins is higher when their coding genes are expressed in the chloroplast genome of microalgae. However, there are still many challenges and bottlenecks in the use of chloroplast genome engineering with *C. reinhardtii*, such as improvements in molecular strategies to position this species as a standard expression platform for the biotechnology industry. In this work, the potential of *C. reinhardtii* as a platform to produce recombinant proteins using chloroplast genome transformation technology is discussed.

Key words: microalgae cells, recombinant proteins, *Chlamydomonas reinhardtii*, chloroplast genome transformation.

Introducción

A partir del desarrollo de las tecnologías del ADN recombinante en los años ochenta, los organismos modificados genéticamente se han convertido en una fuente importante para la producción de proteínas y metabolitos de interés industrial. En la actualidad, la mayoría de las proteínas recombinantes producidas comercialmente se obtienen con *Escherichia coli* (Shamriz et al., 2016), *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* (Salehzadeh et al., 2012); así como de líneas celulares de insectos (Demain y Vaishnav, 2009), mamíferos (Palomares et al., 2004) y plantas transgénicas (Ofoghi et al., 1999). Cada sistema ofrece distintas ventajas en términos de costo de producción, capacidad para producir proteínas funcionales correctamente plegadas, seguridad, distribución y rendimiento, entre otras (Tabla 1).

Las microalgas son un grupo amplio y diverso de células eucariotas fotosintéticas que viven en ecosistemas acuáticos y terrestres (Moazami et al., 2011). *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) son algas verdes biflageladas unicelulares de vida libre que se encuentran en agua dulce y suelo (Harris, 2009). Estas células se dividen por mitosis cuando existen condiciones

ambientales adecuadas (Harris, 2001). La temperatura mínima para el crecimiento de *Chlamydomonas* es de 13 a 15 °C en promedio, (Maikova et al., 2016), y crece en un intervalo mesófilo (15 a 37 °C). Cuando la temperatura disminuye a valores menores de 15°C (biorreactores sin control de temperatura) la división celular se detiene por completo (Lapina et al., 2013); sin embargo, se ha reportado que el tamaño de la célula continúa aumentando lentamente (Maikova et al., 2016), y su morfología cambia de tal manera que disminuye la densidad del nucleolo, cambia la forma del cloroplasto, aumenta el grosor de la capa de almidón alrededor del pirenoide y aumenta el tamaño de las vacuolas (Valledor et al., 2013). *C. reinhardtii* posee un cloroplasto grande y único que abarca aproximadamente el 40% del volumen celular (Schotz et al., 1972). El cloroplasto presenta un genoma circular de ~206 kb, alberga de 50 a 80 copias idénticas del plastoma, contiene 99 genes que codifican para los componentes centrales del aparato fotosintético y del aparato de transcripción-traducción del orgánulo (Gallaher et al., 2018).

C. reinhardtii es la microalga más caracterizada genéticamente en los tres genomas que posee (nuclear, cloroplasto y mitocondrial), los cuales han sido ya

Tabla 1. Comparación de diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes. Información tomada de Yan et al., 2016.

Parámetro	Microalgas	Plantas	Bacterias	Levaduras	Insectos	Células mamífero
Costo operación	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
Costo de escalamiento	Medio	Muy bajo	Alto	Alto	Muy alto	Muy alto
Velocidad de crecimiento	Rápido	Lento	Rápido	Rápido	Medio	Lento
Riesgo de contaminación	Bajo	Bajo	Alto	Medio	Alto	Alto
Plegamiento de proteína	Alto	Alto	Bajo	Medio	Alto	Alto
Rendimiento de proteína	Alto	Alto	Alto	Medio	Medio	Medio
Seguridad	Alta	Alta	Bajo	Desconocido	Medio	Bajo
Distribución	Fácil	Fácil	Posible	Posible	Difícil	Difícil

secuenciados (Merchant et al., 2007; Gallaher et al., 2018). Actualmente existen procedimientos de transformación genética que permiten la integración de ADN exógeno en los tres genomas (Mussgnug, 2015). La modificación genética del cloroplasto de *C. reinhardtii* se realizó hace más de 30 años de forma estable mediante el método de biolística (Boynton et al., 1988) y posteriormente se obtuvo en agitación con perlas de vidrio (Kindle et al., 1991). Se ha demostrado científicamente en algas y plantas superiores, que las proteínas recombinantes se acumulan en niveles mucho más altos cuando se expresan en el genoma del cloroplasto en comparación con el genoma nuclear (Franklin et al., 2002, Daniell, 2006). La expresión de proteínas en el cloroplasto presenta varias ventajas, que incluyen: (1) niveles altos de proteína recombinante (2-20% de proteína soluble total) (Su Z et al., 2005); (2) ausencia de mecanismos de silenciamiento génico (Bock, 2015); (3) integración génica dirigida en el plastoma mediante recombinación homóloga; y (4) la posibilidad de realizar modificaciones postraduccionales tales como la correcta formación de enlaces disulfuro, (Mayfield et al., 2007; Almaraz-Delgado et al., 2014). Es importante destacar que el cloroplasto contiene la maquinaria adecuada para formar enlaces disulfuro y ensamblar proteínas grandes y complejas, como anticuerpos completos (Tran et al., 2009). Uno de los principales inconvenientes de la expresión de proteínas en el cloroplasto de *C. reinhardtii* es que las secuencias de codificación proteica requieren optimización de codones para cumplir con el uso de codones en el orgánulo y se puedan expresar las proteínas heterólogas eficientemente (Franklin et al., 2002), además de que no presentan mecanismos de glicosilación adecuados para algunas proteínas; por lo tanto, esta microalga se puede usar para producir proteínas que exhiben poca o ninguna glicosilación.

Se ha demostrado que la microalga *C. reinhardtii* es un sistema ideal para la expresión de proteínas recombinantes con fines de producción comercial, ya que ofrece varias ventajas que incluyen: (1) una alta tasa de crecimiento, tiempos de duplicación de 5 a 8 horas, y densidades celulares de 10^7 células/ml; (2) la transformación genética es una herramienta estable que permite generar en 4 a 6 semanas, una producción a gran escala de proteína recombinante (Mayfield et al., 2007); (3) facilidad de cultivo en diferentes

tipos de biorreactores; (4) se pueden transformar sus tres genomas (núcleo, mitocondria y cloroplasto), lo que permite la localización dirigida de la expresión de proteínas recombinantes (Larosa y Remacle, 2013); (6) algunas cepas de *C. reinhardtii* se pueden cultivar en condiciones heterótrofas (utilizando acetato como fuente de carbono) y fototróficas (con luz como única fuente de energía y CO₂ como fuente de carbono), en biorreactores y estanques al aire libre (Moon et al., 2013); (7) existe una amplia variedad de promotores y marcadores para la modificación genética de células; y (8) la FDA (Food and Drug Administration) considera a *C. reinhardtii*, como un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS), ya que no hay evidencia de componentes tóxicos o mutagénicos dentro de la célula (Murbach et al., 2018). Por todo lo anterior se abre la posibilidad de que se utilicen células recombinantes completas o extractos de estas (sin que se purifiquen las proteínas) como vacunas orales o en alimentos mejorados portando proteínas recombinantes. Por otra parte, el genoma del cloroplasto de *C. reinhardtii* soporta la expresión de genes que codifican para una amplia variedad de proteínas recombinantes que incluyen indicadores como la enzima beta-glucuronidasa (Sakamoto et al., 1993), la luciferasa (Mayfield y Schultz, 2004) y la proteína verde fluorescente (Franklin et al., 2002); proteínas terapéuticas como vacunas (Surzycki et al., 2009) y hormonas (Dyo y Purton, 2018); enzimas industriales (Gangl et al., 2015; Richter et al., 2018) y enzimas para sintetizar metabolitos (Fukusaki et al., 2003; Papaefthimiou et al., 2019; Tevatia et al., 2019). Se ha visto que muchas de las proteínas recombinantes que se han cuantificado se acumulan de 2% a 20% del total de la proteína soluble (TSP) (Manuell et al., 2007; Rasala et al., 2010).

El interés de *C. reinhardtii* se ha centrado principalmente en la producción de proteínas terapéuticas, las cuales no afectan la biología del cloroplasto (Dyo y Purton, 2018). Estas incluyen vacunas para ganado, como una posible vacuna contra la fiebre aftosa (Sun et al., 2003) y una que puede proteger contra la gripe aviar (Castellanos-Huerta et al., 2016). También se han expresado vacunas humanas candidatas contra la malaria (Jones et al., 2013), la

infección por *Staphylococcus aureus* (Dreesen et al., 2010) y los tumores causados por el virus del papiloma humano (Demurtas et al., 2013). La ingeniería de cloroplastos también se ha utilizado para producir otras proteínas terapéuticamente valiosas, como los anticuerpos de cadena única larga (Mayfield et al., 2003), una clase de conjugados anticuerpo-fármaco conocidos como inmunotoxinas que son prometedoros en el tratamiento del cáncer (Tran et al., 2013), y alérgenos recombinantes para el tratamiento de alergias al maní y al polen de abedul (Gregory et al., 2016, Hirschl et al., 2017). Investigaciones recientes han demostrado la viabilidad de expresar la toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* en el cloroplasto de *C. reinhardtii* como estrategia útil en el control de mosquitos, particularmente debido a la cohabitación de esta microalga y larvas de mosquitos en ciertos hábitats (Kang et al., 2018). A continuación, se describen las estrategias moleculares disponibles para diseñar la transformación del cloroplasto de *C. reinhardtii*, así como algunos ejemplos exitosos que han modificado el genoma del cloroplasto para obtener productos recombinantes en *C. reinhardtii* y una perspectiva de los desafíos futuros en la industria del cloroplasto con microalgas.

Sistemas de cultivo de *C. reinhardtii*

C. reinhardtii es capaz de crecer mixotróficamente; es decir, de forma autótrofa (puede producir su propio alimento) o heterótrofa (obtiene su alimento de fuentes externas), según la disponibilidad de compuestos orgánicos y la intensidad lumínica. Además, *C. reinhardtii*, se puede cultivar a gran escala en estanques abiertos o en fotobiorreactores. Los fotobiorreactores (FBRs) son sistemas cerrados transparentes, de plástico o vidrio, con geometrías de diversos tipos (tubulares, cilíndricas o planas). Estos sistemas tienen ventajas sobre los estanques abiertos al obtener una mayor productividad, fundamentalmente porque se mejora la eficiencia de la fotosíntesis y la capacidad de fijación del CO₂. Frente a los estanques abiertos, los FBRs necesitan un espacio menor y se puede mantener un monocultivo sin contaminación de otras especies, lo que permite tener un producto apto para su uso en la industria farmacéutica. Otra ventaja muy importante es que al ser sistemas cerrados los parámetros de

crecimiento más importantes como intensidad de luz (2500-5000 lux), temperatura (18-24°C), pH (8.2-8.7), cantidad de nutrientes y dióxido de carbono (1.85 g CO₂/g biomasa), se pueden monitorear y controlar, obteniendo un bioproceso robusto (Rosales-Mendoza et al., 2012). Se ha reportado que el uso de biorreactores tipo air-lift para el cultivo de microalgas como *C. reinhardtii* y *Dunaliella tertiolecta* bajo condiciones de fotoaclimatación, junto con un flujo de líquido controlado, un suministro de dióxido de carbono y eliminación de oxígeno no limitan la productividad en los rendimientos de biomasa (Janssen et al., 2000). Un desafío importante es el desarrollo y optimización de los FBRs para maximizar la productividad en *C. reinhardtii* y disminuir el consumo energético, con el fin de permitir la producción de proteínas recombinantes a gran escala. Estas metodologías deben incluir los siguientes parámetros operativos: relación altura/diámetro del reactor, velocidad de flujo, coeficiente de transferencia de masa (kLa), velocidad de mezcla, densidad inicial y penetración de luz (Wang et al., 2014), junto con el suministro de CO₂, la concentración de nutrientes, el pH, la salinidad y control de temperatura (Fernández et al., 2012), ya que todos estos parámetros pueden afectar la producción de proteínas recombinantes en microalgas.

En cambio, los estanques abiertos ofrecen la posibilidad de ser más baratos que los FBRs, en términos de inversión, mantenimiento y consumo energético. Los principales tipos de sistemas abiertos son estanques poco profundos, estanques circulares, estanques ovalados *raceway* con brazo rotatorio para la agitación del cultivo y sistemas en cascada o de capa delgada. Las desventajas son: susceptibles a contaminación, mezclado poco eficiente, baja productividad y una densidad celular dependiente de la superficie, y de la profundidad del estanque, lo que limita el tipo de microorganismo que se puede cultivar en estos sistemas (Borowitzka, 1999). A medida que las células reciben la iluminación y el intercambio de gases como el dióxido de carbono y oxígeno disminuyen con respecto a la distancia desde la superficie, se limita el crecimiento a cierta profundidad. Por lo tanto, el cultivo en estanques abiertos debe realizarse preferiblemente en capas delgadas y cubrir grandes áreas (Walker et al., 2005).

Además, aunque todavía no se conoce el impacto en los ecosistemas circundantes por la propagación de microalgas, la aceptación pública sigue siendo renuente al cultivo de algas transgénicas en estanques abiertos.

En general, las microalgas tienen la capacidad de crecer en escalas que van desde unos mililitros hasta 500 mil litros de forma rentable. En comparación con otros sistemas de cultivo celular, los costos adicionales de iluminación y agitación se compensan con los bajos costos del medio de cultivo. Por ejemplo, las proteínas terapéuticas complejas, como los anticuerpos (mAbs), se producen principalmente mediante el cultivo de células de mamíferos transgénicos. Los costos de producción de mAb en células de mamíferos cultivadas promedian unos \$150 dls por gramo de materia prima, mientras que en plantas transgénicas se ha estimado que la producción de mAb cuesta \$0.05 dls por gramo (Dove, 2002). Se estima que los costos de producción de mAb en sistemas de microalgas compitan con los de las plantas terrestres, dado que los costos de los medios para las algas son bastante razonables (\$0.002 dls por gramo), además las microalgas pueden crecer en cultivos continuos, en donde el medio de cultivo se puede reciclar (Mayfield et al., 2003).

Métodos de transformación para la ingeniería genética del cloroplasto

La ingeniería genética del genoma del cloroplasto (plastoma) se denomina transplastómica (Purton et al., 2013). Los genomas de los cloroplastos son moléculas circulares poliploides que poseen entre 100 y 200 genes, y la mayoría de ellos codifican los componentes centrales del aparato fotosintético o la maquinaria de transcripción y traducción del orgánulo. La transformación del cloroplasto se logró por primera vez utilizando *C. reinhardtii* mediante una mutante fotosintética que portaba una delección del gen del cloroplasto, con la cual se restauró a fototrofia mediante bombardeo de micropartículas con un plásmido que portaba el gen de tipo salvaje. El análisis molecular mostró que el locus mutante se había reparado mediante recombinación homóloga (HR) entre las secuencias del plastoma y el ADN introducido. Desde entonces, *C. reinhardtii* ha sido ampliamente usado

como modelo de laboratorio para estudios de genética inversa de la expresión génica del cloroplasto y la función fotosintética, con eliminaciones genéticas específicas o cambios dirigidos al sitio introducidos en el plastoma mediante ingeniería mediada por recombinación homóloga.

El método más utilizado para obtener células transplastómicas de *C. reinhardtii* es el bombardeo de micropartículas (biolística) con el dispositivo PDS-1000/He (Randolph-Anderson et al., 2015). Previo al bombardeo, *C. reinhardtii* debe esparcirse en medio sólido para inmovilizarlas. El dispositivo de bombardeo acelera las partículas de tungsteno u oro recubiertas de ADN utilizando helio a alta presión para bombardear las células inmovilizadas mantenidas a presión subatmosférica. Varios factores, incluida la naturaleza, el tamaño y la velocidad de las micropartículas; la distancia a las células inmovilizadas; el número de células que se bombardearán; la forma lineal o circular del plásmido recombinante y la concentración de ADN blanco, contribuyen a una eficiencia de transformación óptima mediante el bombardeo de micropartículas (Coll, 2006).

Una de las ventajas al utilizar partículas de oro es que tienen un tamaño y una forma uniformes y no reaccionan químicamente con otras sustancias. Una transformación estable ocurre cuando se usan partículas de oro de tamaño submicrónico debido a que las células sufren menos daño celular, por lo tanto, se recuperan más rápido después del bombardeo. Por el contrario, las micropartículas de tungsteno tienen forma irregular y tamaño heterogéneo, éstas suelen ser tóxicas para las células y pueden degradar el ADN diana; sin embargo, son más baratas (Randolph-Anderson et al., 2015). El elevado costo del dispositivo de bombardeo ha llevado a buscar alternativas más baratas y sencillas como el uso de perlas de vidrio. Otra técnica de transformación utilizada en microalgas es la agitación de protoplastos (células deficientes en la pared celular) con perlas de vidrio utilizando vórtices, esta técnica es simple y eficiente para la transformación de cloroplasto en *C. reinhardtii* (Economou et al., 2014). Con este método se propone que se generen huecos en la célula y en las membranas del cloroplasto debido a la acción abrasiva de las perlas y el ADN ingresa directamente al

cloroplasto. En este método, la pared celular actúa como una barrera física que evita la entrada de ADN en la célula. La pared celular puede eliminarse mediante digestión enzimática con autolisinas (gametolisina), enzimas que están activas durante la reproducción celular (Economou et al., 2014). También se ha desarrollado un método de transformación de cloroplasto mediante electroporación. La electroporación es el método de elección para introducir ADN en el genoma nuclear. Sin embargo, esta técnica también se ha utilizado para transferir ADN al cloroplasto de microalgas. El uso de cepas de pared delgada o deficiente de la pared celular mejora la eficiencia de transformación por electroporación (Shimogawara et al., 1998). La integración del ADN en el plastoma poliploide da como resultado una mezcla heteroplasmática de copias de plastoma transgénicas y no transformadas dentro de un solo cloroplasto. Después, se comprueba la presencia del gen de interés (GOI) en las colonias resistentes y se someten a múltiples rondas de selección de una sola colonia para garantizar que las líneas transformantes alcancen un estado homoplásmico estable en el que todas las copias del genoma poliploide contienen el marcador y el GOI (Figura 1).

Optimización del uso de codones para la expresión transgénica

Una consideración importante en la ingeniería genética del plastoma de *C. reinhardtii* es la preferencia por codones con adenina (A) o timina (T) en la tercera posición (aproximadamente 64%) sobre aquellos con citosina (C) o guanina (G). Un estudio mostró que la proteína verde fluorescente (GFP) con codones optimizados de acuerdo con el uso de codones del genoma del cloroplasto podría aumentar la acumulación de la proteína transgénica hasta 80 veces más en el cloroplasto (Franklin et al., 2002). Enfoques similares que utilizan el gen de anticuerpo humano y el gen de luciferasa con codones optimizados también respaldaron el papel significativo de la optimización de codones en la producción de proteínas dentro del cloroplasto de microalgas (Mayfield y Schultz, 2004). En consecuencia, la optimización de codones de los transgenes da como resultado una mejor eficiencia de traducción y, por lo tanto, niveles más altos de acumulación de proteínas. Actualmente, existen herramientas de software disponibles para el diseño de genes sintéticos con codones optimizados para la expresión de muchas de las proteínas recombinantes en el cloroplasto (Purton, 2007).

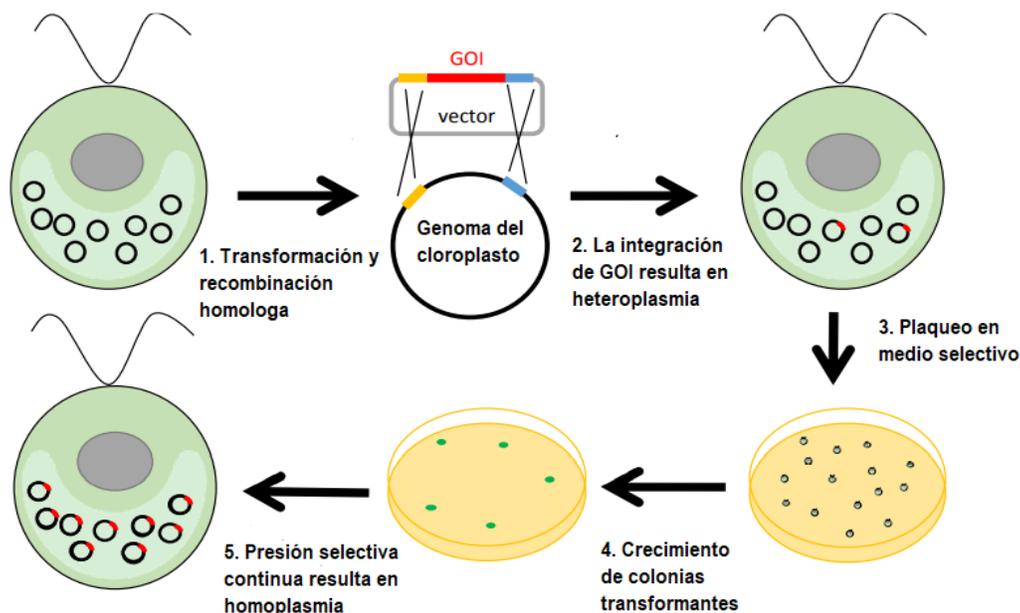


Figura 1. Transformación de cloroplasto de *C. reinhardtii*. El gen de interés (GOI) se inserta en algunas de las copias del plastoma mediante recombinación homóloga. Solo las células que contienen al menos una copia del transgén y el marcador de selección podrán sobrevivir en el medio selectivo y formarán colonias. Puede requerirse de múltiples rondas de selección de una sola colonia para lograr la homoplasma. Imagen adaptada de Esland et al., 2018.

Una última consideración es el sitio de integración, y esto está determinado por los elementos derivados del plasmoma que flanquean la construcción transgénica y median los dos eventos de cruzamiento, como se muestra en la Figura 1. Se han identificado varios sitios de integración 'neutrales' que permiten la integración de ADN exógeno sin alterar los genes endógenos ni afectar la expresión de genes cercanos (Taunt et al., 2018).

Marcador de selección

Un requisito importante para la transformación del plásmido es tener un marcador de selección. La inserción exitosa de ADN en el cloroplasto de microalgas es baja: uno de cada 10^5 - 10^6 células tratadas (Murbach et al., 2018). Por lo tanto, es esencial tener un método de selección que permita el desarrollo de colonias que surjan de estos eventos al tiempo que evita el crecimiento de células no transformadas. Los marcadores de selección para la transformación del cloroplasto se resumen en la Tabla 2.

La selección de las cepas transformadas se basan generalmente con genes bacterianos ("casetes") que confieren resistencia a los antibióticos (Bateman y Purton, 2000), sin embargo, debido a esto, el uso de

tales marcadores en productos comerciales no es deseable. El marcador seleccionable más utilizado para la ingeniería de cloroplasto es el gen *aadA* (Goldschmidt-Clermont, 1991). El gen bacteriano *aadA* codifica para la aminoglucósido adeniltransferasa (AAD), que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin, antibióticos que se dirigen al ribosoma 70S de bacterias y cloroplastos. En consecuencia, cuando la secuencia codificante se fusiona con un promotor de cloroplasto y regiones no traducidas de los genes (untranslated region: UTR) apropiado, el gen *aadA* puede servir como marcador dominante y portátil en algas y plantas. Un segundo marcador para la selección basada en antibióticos en *C. reinhardtii* es el gen *aphA6* (Bateman y Purton, 2000). Este gen de *Acinetobacter baumannii* codifica para la aminoglucósido fosfotransferasa que confiere resistencia a la kanamicina e inhibidores relacionados de los ribosomas 70S. Una selección alternativa basada en antibióticos implica el uso de variantes de los genes *rmsS* y *rmsL* del cloroplasto que codifican para los ARN ribosomales 16S y 23S, respectivamente. Las mutaciones puntuales específicas en *rmsS* pueden dar lugar a ribosomas resistentes a espectinomicina, estreptomycin o kanamicina, mientras que mutaciones en *rmsL* pueden dar lugar a resistencia a eritromicina (Randolph-Anderson et al., 2015).

Tabla 2. Marcadores de selección para la transformación del cloroplasto.

Marcador	Modo de selección	Referencia
<i>aadA</i>	Resistencia espectinomicina/estreptomycin	Goldschmidt-Clermont, 1991
<i>aphA6</i>	Resistencia kanamicina	Bateman y Purton, 2000
<i>rmsS</i> y <i>rmsL</i>	Resistencia espectinomicina, estreptomycin y eritromicina	Randolph-Anderson et al., 2015
<i>atpB</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Bateman y Purton, 2000
<i>nifH</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Cheng, Day, Dowson-Day, Shen y Dixon, 2005
<i>psbA</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Michelet et al., 2011
<i>psbH</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Economou et al., 2014
<i>tscA</i>	Restauración de fotosíntesis (fototrofia)	Kindle, Richards, y Stern, 1991
<i>arg9</i>	Restauración síntesis de arginina (prototrofia)	Remacle et al., 2009
<i>ptxD</i>	Uso de fosfito como única fuente de fósforo	Changko et al., 2020

Artículos

Si bien los diversos métodos de selección descritos anteriormente se pueden utilizar para transformar cepas de tipo silvestre de *C. reinhardtii*, una estrategia alternativa es aprovechar el hecho de que esta especie puede prescindir por completo de la fotosíntesis y crecer heterotróficamente en una fuente de carbono como el acetato. En consecuencia, se han descrito cepas mutantes fotosintéticas que portan eliminaciones o mutaciones puntuales en el plastoma que alteran los genes esenciales de la fotosíntesis (Harris, 2001). La transformación de tales cepas con una copia de tipo silvestre del gen afectado proporciona una selección robusta, ya que la recombinación homóloga restaura una copia funcional del gen en el plastoma, lo que permite la selección de un fenotipo de tipo "silvestre" en medio mínimo (sin acetato). Como consecuencia, la homoplasma con marcadores basados en antibióticos se pueden obtener líneas homoplásmicas incluso después de una sola ronda de aislamiento con una sola colonia (Wannathong et al., 2016). Esto reduce el tiempo para generar transformantes estables a 3-4 semanas (Boynton y Gillham, 1993). El aspecto más

atractivo del uso de un gen endógeno para la selección es que las líneas transformantes están "libres de marcadores" (Chen y Melis, 2013; Bertalan et al., 2015). Como se ilustra en la Figura 2, un GOI se puede dirigir a un sitio neutral río arriba o río abajo del gen fotosintético incorporándolo en uno de los elementos que se usan para flanquear dentro de la construcción de transformación. El transformante resultante contiene sólo el GOI como ADN externo en su plastoma, lo que evita la transferencia de resistencia a antibióticos como el gen *aadA*. Es importante destacar que el uso del alelo de tipo silvestre de un gen endógeno como marcador seleccionable no corre el riesgo de comprometer la eficiencia traslacional o fotosintética, a diferencia de los marcadores basados en mutaciones puntuales dominantes como los genes con resistencia a espectinomicina, estreptomycin y eritromicina (*rrnS/L*). Los mutantes de cloroplasto no fotosintéticos de *C. reinhardtii* que se han empleado como receptores para dicho rescate fototrófico incluyen aquellos que portan grandes deleciones que afectan a los genes *tscA*, *psbA* y *atpB* (Boynton et al., 1988; Goldschmidt-Clermont, 1991).

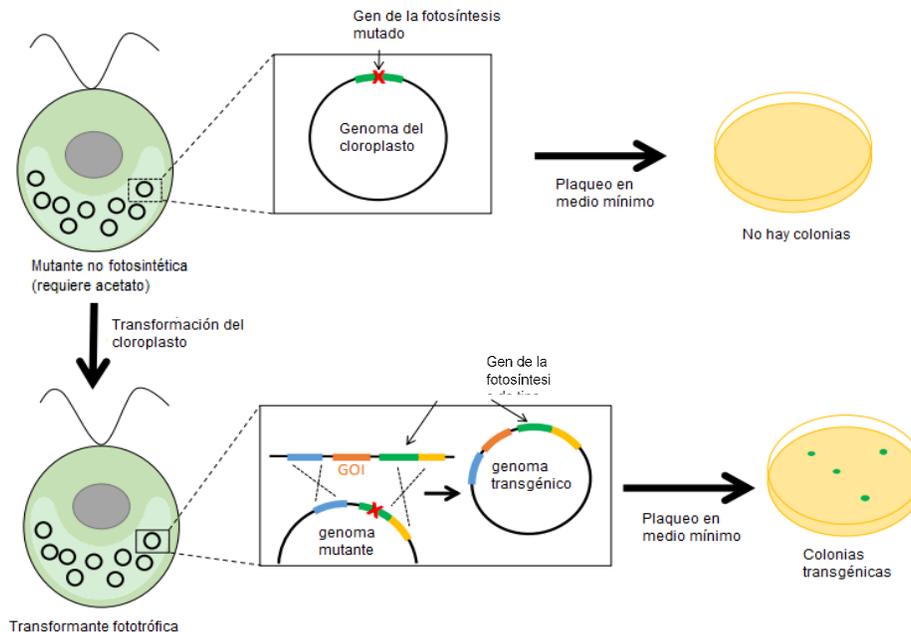


Figura 2. Selección basada en rescate fotosintético. La cepa receptora mutante de *C. reinhardtii* es incapaz de crecimiento fototrófico debido a una deleción o mutación puntual en un gen de fotosíntesis y debe mantenerse en un medio que contenga acetato. La transformación del receptor con el ADN del donante, incluida la versión de tipo silvestre del gen, da como resultado la restauración de la fotosíntesis y la integración concomitante del GOI, lo que permite que los transformantes crezcan en un medio mínimo. Imagen adaptada de Esland et al., 2018.

Existen otras estrategias de selección basadas en marcadores metabólicos que rescatan mutantes auxótrofos. La capacidad de *C. reinhardtii* de tipo silvestre para sintetizar arginina depende de una ruta biosintética que se encuentra predominantemente dentro del cloroplasto. Una enzima clave en esta vía es la N-acetilornitina aminotransferasa (codificada por el gen nuclear *arg9*), y los mutantes afectados en este gen requieren un medio que contenga arginina para sobrevivir (Remacle et al., 2009). Por lo tanto, *arg9* funciona un marcador metabólico en lugar de una enzima de resistencia a antibióticos, lo cual es preferible cuando se buscan estrategias ambientalmente seguras con aplicaciones industriales, evitando así los problemas de bioseguridad asociados a los marcadores con antibióticos. Otra enzima metabólica que se ha desarrollado recientemente como marcador seleccionable para el cloroplasto de *C. reinhardtii* se genera a partir del gen bacteriano *ptxD* que codifica para la fosfito oxidorreductasa (Changko et al., 2020). Los eucariotas y la mayoría de los procariontes no pueden utilizar fosfito (PO_3^{3-}) como fuente de fósforo, sin embargo, la enzima *ptxD* oxida el fosfito a la forma biodisponible en fosfato (PO_4^{3-}) (Kanda et al., 2014). En consecuencia, la enzima *ptxD* se puede utilizar como marcador general para transformar microorganismos de tipo silvestre, incluido *C. reinhardtii*, seleccionando el crecimiento en un medio que contiene fosfito como única fuente de fósforo.

Promotores y secuencias de regiones no traducidas del ARNm (UTRs)

Para obtener proteínas recombinantes con altos rendimientos en microalgas, el diseño en la construcción de expresión del transgén debe optimizarse en todas las etapas de la expresión génica, desde la transcripción hasta la estabilidad de la proteína recombinante en las que se deben incluir varios elementos reguladores. Para obtener niveles altos de transcripción, los elementos clave son los promotores y las regiones no traducidas del ARNm (UTRs) 5'/3'. En el cloroplasto de *C. reinhardtii* la subunidad grande de ribulosa bifsosfato carboxilasa (*rbcL*) (Dreesen et al., 2010), las proteínas D1 y D2 encontradas en el centro de reacción del fotosistema II (*psbD* y *psbA*) (Manuell et al., 2007; Rasala et al., 2010), la subunidad α de la adenosina trifosfatasa (*atpA*) (Sun et al., 2003) y sus respectivas regiones no traducidas (UTRs) son las opciones más elegidas (Surzycki et al., 2009). Los promotores del cloroplasto de *C. reinhardtii* usados para la expresión de proteínas heterólogas se resumen en la Tabla 3.

Se sabe que las estructuras secundarias de ARN son cruciales para la estabilidad de la transcripción, por ejemplo, los bucles de tallo (loops) que se encuentran a menudo en los extremos 5' y 3' de los ARNm afectan la transcripción. En un estudio se mostró que el tallo-bucle del ARN es esencial en el

Tabla 3. Promotores del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizados para la expresión de proteínas heterólogas.

Promotor	Gen	Proteína	Nivel de expresión (% TPS)	Referencia
<i>atpA</i>	subunidad α de la adenosina trifosfatasa	CTBVP1	~ 3–4	Sun et al., 2003
<i>psbD</i>	Fotosistema II D1	M-SAA	~ 0.25	Manuell et al., 2007
<i>rbcL</i>	Subunidad grande de Rubisco	CTBD2	~ 0.7	Dreesen et al., 2010
<i>psbA</i>	Fotosistema II	14FN3	~ 3	Rasala et al., 2010

CTBVP1: Proteína de fusión que comprende la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa y la subunidad B de la toxina del cólera

M-SAA: Amiloide sérico asociado a la mama

CTBD2: Proteína de fusión que comprende el dominio de unión a fibronectina D2 de *S. aureus* y la subunidad B de la toxina del cólera

14FN3: Dominio 14 de la fibronectina humana

extremo 5' para la correcta transcripción del gen *rbcL* en *Chlamydomonas*. Alterar dicha estructura hace que las transcripciones sean inestables. Por lo tanto, estas regiones específicas dentro de los UTRs 5' pueden impactar la estabilidad del ARNm y usarse para aumentar o reducir la producción de proteínas recombinantes (Salvador et al., 2004; Suay et al., 2005). Además, se sabe que los UTR 5' de los ARNm en los plástidos contienen elementos clave como las proteínas de unión a RNA (RBP) las cuales podrían establecer un andamio proteico para las transcripciones del cloroplasto, ayudando a mejorar la estabilidad del ARN y el plegamiento del ARN (Nickelsen, 2003). En contraste, el UTR 3' tiene relativamente poca influencia en el nivel de expresión heteróloga. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la secuencia y la estructura de las UTRs 3' tienen papeles funcionales en la regulación de la elongación, terminación, estabilización y acumulación del ARNm (Blowers et al., 1993; Rott et al., 1998; Stern et al., 1991). Todas estas observaciones sugieren que la traducción y la acumulación de ARNm están determinadas principalmente por el promotor y el UTR 5' apropiado; por lo tanto, la elección de regiones promotoras y reguladoras son factores críticos que se deben considerar para cada proteína de interés con el fin de lograr un alto rendimiento de proteínas recombinantes.

Producción de proteínas recombinantes en cloroplasto de *C. reinhardtii*

Como se describió anteriormente, *C. reinhardtii* ha demostrado ser una plataforma muy versátil con diversas aplicaciones biotecnológicas, y es una alternativa muy atractiva para la producción de una amplia variedad de proteínas recombinantes con aplicación médica. Sin embargo, el número de informes exitosos sigue siendo bajo, especialmente en comparación con otros sistemas de expresión como *Escherichia coli*, células de mamífero (células de ovario de hámster chino, CHO) y plantas transgénicas. El uso de células de mamífero para producir proteínas recombinantes tiene la ventaja de que estas proteínas son idénticas a las de origen humano; sin embargo, el cultivo de estas células es costoso, además de que se corre el riesgo de tener contaminación viral o priónica (Kwon et al., 2018). Por otra parte, las bacterias pueden usarse para producir

proteínas recombinantes a gran escala, pero tienen la desventaja de carecer de muchas de las modificaciones postraduccionales (metilación, glucosilación) necesarias para las proteínas complejas. Como organismos eucariotas, las plantas transgénicas superan este obstáculo y se ha demostrado ampliamente que las plantas ofrecen un sistema económico para la expresión de ciertas proteínas en la industria biotecnológica (Daniell et al., 2001; Peters y Stoger 2011). En cambio, *C. reinhardtii* presenta tiempos cortos de producción, bajo riesgo de patogenicidad (no se conocen patógenos o toxinas que pudieran causar contaminación en el producto final, como en el caso de bacterias y células de mamíferos), y se ha demostrado su capacidad para sintetizar proteínas complejas de origen humano.

En los siguientes párrafos se describen algunos trabajos que han explotado el uso del cloroplasto de *C. reinhardtii* como plataforma para producir proteínas recombinantes de interés médico (Tabla 4). La primera proteína terapéutica expresada en el cloroplasto de *C. reinhardtii* fue el anticuerpo monocatenario contra la glicoproteína D del virus del herpes simple. El anticuerpo expresado formó enlaces disulfuro y se acumuló como una proteína soluble capaz de unirse a la proteína D del virus del herpes *in vitro* (Mayfield et al., 2003). El virus de la fiebre aftosa es un virus severo y altamente contagioso que afecta al ganado y tiene un impacto significativo en la economía.

La vacuna de subunidad viral contra la fiebre aftosa consistió en la proteína estructural VP1 fusionada con la subunidad B de la toxina del cólera, un potente adyuvante en mucosas, se expresó en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. El nivel de acumulación de la proteína VP1 alcanzó hasta un 3% de la proteína soluble total, fue más alto que el nivel informado en estudios previos en plantas. La proteína de fusión expresada tenía tanto antigenicidad como afinidad de unión hacia el gangliósido GM1 (Sun et al., 2003). La proteína E2 como candidata a vacuna contra el virus de la peste porcina clásica (CSFV) se expresó en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Aunque la inmunización subcutánea de extractos de algas condujo a la inducción de una respuesta sistémica, la inmunización oral no dio como resultado una respuesta a nivel sistémico y mucosas (He et al., 2007). En 2007, se

Artículos

Tabla 4. Productos recombinantes expresados en cloroplasto de *C. reinhardtii*. Información adaptada de Shamriz y Ofoghi, 2016.

(TSP: Proteína total soluble. Dw: peso seco).

Aplicación	Proteína recombinante	Técnica de transformación	Respuesta encontrada	Nivel de expresión	Referencia
Anticuerpo	Anticuerpo dirigido contra la glicoproteína D del virus del herpes (HsV8-Lsc)	Biolística	El anticuerpo fue capaz de unirse a la proteína D del virus del herpes <i>in vitro</i>	1% TSP	Mayfield et al. (2003)
	Anticuerpo monoclonal humano contra el antígeno protector 83 del ántrax (PA83)	Biolística	El anticuerpo fue capaz de unirse y neutralizar la toxina del ántrax	0.01% Dw	Tran et al. (2009)
Vacuna	Descarboxilasa del ácido glutámico humano (hGDA65) contra diabetes tipo I	Biolística	Reacciona con sueros de pacientes diabéticos y es inmunogénico en ratones NOD	0.25-0.3% TSP	Wang et al. (2008)
	Dominio de unión a fibronectina D2 de <i>Staphylococcus aureus</i> fusionada con CTB de la toxina del colera	Biolística	Se indujeron respuestas inmunitarias sistémicas y mucosas por vía oral. El 80% de los ratones vacunados sobrevivieron al desafío letal de <i>S. aureus</i>	0.7% TSP	Dreesen et al., (2010)
	Proteína estructural E2 del virus de la peste porcina clásica (CSFV)	Biolística	La inmunización subcutánea de ratones con extractos de algas indujo la producción de anticuerpos contra la proteína E2	1.5-2% TSP	He et al., (2007)
Enzima	Diterpeno sintasa	Perlas de vidrio	El método de transformación es adecuado para la expresión heteróloga, la proteína se expresa de forma estable	3.7% TSP	Zedler et al., (2015)
Inmunotoxina	Un anticuerpo (ssFv) que reconoce a CD22, un epítipo de superficie de células B fusionada al dominio enzimático de la exotoxina A de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biolística	Las inmunotoxinas se produjeron en las células de <i>C. reinhardtii</i> sin ser tóxicas para ellas y enzimáticamente activas, se unen a las células B diana y las matan de manera eficiente <i>in vitro</i> .	0.3-0.4% TSP	Tran et al., (2013)
Proteína terapéutica	Isoforma 121 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF)	Biolística	Activa en ensayo de unión al receptor VEGF	2% TSP	Rasala et al., (2010)
	Proteína B1 de grupo de alta movilidad (HMGB1)	Biolística	Activa en ensayo de quimiotaxis de fibroblasto	2.5% TSP	Rasala et al., (2010)

produjo una proteína amiloide sérica asociada a la mama bovina (M-SAA) y se demostró que la M-SAA se acumulaba en cloroplasto de forma soluble (>5% de la proteína total), sugiriendo que la proteína estaba correctamente plegada y era biológicamente activa. El hallazgo más importante de este estudio fue que el promotor *psbA* da como resultado un mayor nivel de acumulación de proteínas recombinantes en ausencia del gen *psbA* endógeno (Manuell et al., 2007). El gen de la descarboxilasa del ácido glutámico humano (hGAD65), un antígeno autoinmune principal para la diabetes tipo 1, se expresó bajo el control del promotor *rbcl* del cloroplasto. Wang y colaboradores (2008), demostraron que la acumulación de hGAD65 era mayor (0.25-0.3% de proteína total soluble) en comparación con el nivel obtenido de plantas transgénicas. La antigenicidad de hGAD65 expresada en *C. reinhardtii* se demostró con su inmunorreactividad a sueros diabéticos por ELISA y por su capacidad para inducir la proliferación de células del bazo de ratones diabéticos no obesos (NOD) (Wang et al., 2008).

Así mismo, en el cloroplasto de *C. reinhardtii* se expresó un anticuerpo monoclonal humano de longitud completa contra una proteína de *Bacillus anthracis*. Los resultados demostraron que el anticuerpo expresado tenía una estructura funcional y también una actividad de unión a antígeno similar a la expresada en el sistema de células animales CHO (Tran et al., 2009). En 2010, Rasala y colaboradores evaluaron la expresión de siete proteínas terapéuticas en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Cuatro de las proteínas se acumularon a niveles superiores al 2% y fueron biológicamente activas, mientras que, para las tres proteínas restantes, no se detectó expresión debido a que estas proteínas se expresaban mal y eran muy inestables o sus regiones codificantes impidieron de alguna manera la traducción de los ARNm quiméricos (Rasala et al., 2010). También, se demostró por primera vez, que ciertas inmunotoxinas en su forma monomérica y dimerica pueden producirse en el cloroplasto de *C. reinhardtii* sin ser tóxicas, debido a que están secuestradas en el compartimento del cloroplasto (Tran et al., 2013).

Aunque el cloroplasto proporciona un entorno adecuado para la formación de enlaces disulfuro y el plegamiento adecuado de proteínas, la glicosilación deseable no se realiza en este compartimento. Sin embargo, el estado de glicosilación de las microalgas

está aún más cerca de los patrones humanos en comparación con la glicosilación en bacterias y levaduras. Los avances recientes en la glicoingeniería de microalgas modelos (*C. reinhardtii*, *P. tricornutum*) han mostrado que tienen un gran potencial para producir productos biofarmacéuticos no inmunogénicos en microalgas (Barolo et al., 2020). En 2013, Gregory y colaboradores, explotaron esta característica y expresaron con éxito las proteínas Pfs25 y Pfs28 pero sin glicosilar de *Plasmodium falciparum* en el cloroplasto de *C. reinhardtii*. Por otra parte, se expresó la proteína E7 en *C. reinhardtii* con el propósito de generar una vacuna oral contra cáncer por VPH. La infección por el virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16) es la principal causa del desarrollo del cáncer de cuello uterino. Los resultados mostraron que en comparación con plantas de tabaco transplastómicas (0.1% PTS), el rendimiento obtenido de E7 fue mayor a 0.12% en fracción soluble. Así mismo, se lograron altos niveles de protección después de inyecciones subcutáneas con la proteína E7 generada en *C. reinhardtii* recombinante (Demurtas et al., 2013). El éxito de todos estos resultados para producir proteínas recombinantes basados en el cloroplasto de *C. reinhardtii* demuestra el potencial de esta plataforma para competir con los sistemas de producción actuales.

Desafíos futuros en la ingeniería del genoma del cloroplasto

La expresión exitosa de muchas proteínas recombinantes bioactivas (como enzimas y proteínas terapéuticas) en el cloroplasto de *C. reinhardtii* han demostrado el potencial de esta especie como plataforma para competir con los sistemas de producción actuales. Sin embargo, para la explotación comercial de *C. reinhardtii* se requerirá un mayor avance en la ingeniería del genoma del cloroplasto para abordar sus limitantes de tal forma que su uso industrial sea factible. Debido a que el sistema de expresión de las algas está todavía en investigación y desarrollo, existen muchas estrategias moleculares que aún se deben probar o mejorar para aumentar la acumulación de proteínas recombinantes. Por ejemplo: el desarrollo de marcadores adicionales para manipular cepas de tipo silvestre (fototróficas) que no se basan en la selección de antibióticos y, por lo tanto, lograr una mejor aceptación pública. La combinación de

ingeniería nuclear y cloroplasto permite obtener cepas en las que la síntesis del producto esté bajo control nuclear, o cepas que produzcan metabolitos nuevos (como: terpenoides o lípidos) a través de las vías biosintéticas localizadas en cloroplasto y citosol (Fuentes et al., 2018).

Actualmente, casi todos los informes de ingeniería del cloroplasto de *C. reinhardtii* involucran transgenes únicos (Purton et al., 2013; Young y Purton, 2018), y sólo hay un par de informes en los que dos transgenes se han co-transcrito con éxito o se han dirigido a loci separados (Dyo y Purton, 2018). Sin embargo, el avance en la ingeniería metabólica del cloroplasto en plantas abre nuevas oportunidades para la explotación del cloroplasto en microalgas (Saxena et al., 2014). A medida que se establezcan los métodos para la manipulación molecular y de ingeniería de procesos, se puede esperar que la producción aumente y los costos disminuyan, lo que podría hacer que la producción de proteínas recombinantes en microalgas sea un sistema económicamente rentable y de uso rutinario en un futuro próximo, para producir una amplia variedad de proteínas recombinantes. Actualmente, las empresas biotecnológicas interesadas en el uso comercial de *C. reinhardtii*, son pocas. Mera Pharmaceuticals, Inc. (<http://www.merapharma.com>), esta compañía cultiva algas transgénicas que expresan proteínas recombinantes dentro del cloroplasto. Phycotransgenics, (<http://www.phycotransgenics.com>), donde han desarrollado algas transgénicas para aplicaciones en el área de la salud animal y la biorremediación. Triton Algae Innovations (<https://www.tritonai.com>); Microsynbiotix (<https://www.microsynbiotix.com>) y Axitan (<http://www.axitan.com>), realizan investigaciones para usar el cloroplasto de *C. reinhardtii* como una plataforma para fabricar compuestos de alto valor, tales como vacunas y proteínas de calostro.

Conclusiones

Las estrategias moleculares en la ingeniería del genoma del cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* han demostrado ser un campo importante en la producción de proteínas recombinantes de alto valor comercial. Sin embargo, es necesario optimizar el uso de la ingeniería del genoma

del cloroplasto de *C. reinhardtii* para posicionar a esta especie como una nueva plataforma de expresión para la industria biotecnológica. Hasta la fecha, la mayoría de los productos recombinantes de *C. reinhardtii* se encuentran en las primeras etapas de investigación y solo algunos de ellos se han probado en experimentos con animales. No obstante, *C. reinhardtii* tiene el potencial de ser uno de los principales modelos de investigación básica y aplicada en microalgas con fines de producción de proteínas de valor agregado con diferentes aplicaciones.

Referencias

- Almaraz-Delgado AL, Flores-Urbe J, Pérez-España VH, Salgado-Manjarrez E, Badiillo Corona JA (2014) Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB express*, 4(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0057-4>
- Barolo L, Abbriano RM, Commault AS, et al. (2020) Perspectives for glyco-engineering of recombinant biopharmaceuticals from microalgae. *Cells*, 9(3), 633. <https://doi.org/10.3390/cells9030633>
- Bateman JM, Purton S (2000) Tools for chloroplast transformation in *Chlamydomonas*: Expression vectors and a new dominant selectable marker. *Mol Gen Genet*, 263:404–410. <https://doi.org/10.1007/s004380051184>
- Bertalan I, Munder MC, Weiß C, Kopf J, Fischer D, Johanningmeier U (2015) A rapid, modular and marker-free chloroplast expression system for the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol*, 195:60–66. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.017>
- Blowers AD, Klein U, Ellmore GS, Bogorad L (1993) Functional *in vivo* analyses of the 3' flanking sequences of the *Chlamydomonas* chloroplast *rbcL* and *psaB* genes. *Mol Gen Genet*, 238(3):339–349. <https://doi.org/10.1007/BF00291992>
- Bock R (2015) Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology. *Annu Rev Plant Biol*, 66:211–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040212>

- Borowitzka MA (1999) Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol.* 70:313-321. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
- Boynton J, Gillham N, Harris E, et al. (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240(4858):1534–1538. <https://doi.org/10.1126/science.2897716>
- Boynton JE, Gillham NW (1993) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas*. *Methods Enzymol*, 217:510–536. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17087-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17087-1)
- Castellanos-Huerta I, Bañuelos-Hernández B, Téllez G, et al. (2016) Recombinant hemagglutinin of avian influenza virus H5 expressed in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* and evaluation of its immunogenicity in chickens. *Avian Dis*, 60(4):784–791. <https://doi.org/10.1637/11427-042816-Reg>
- Changko S, Rajakumar PD, Young R, Purton S (2020) The phosphite oxidoreductase gene, *ptxD* as a bio-contained chloroplast marker and crop-protection tool for algal biotechnology using *Chlamydomonas*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 104(2):675–686. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10258-7>
- Chen HC, Melis A (2013) Marker-free genetic engineering of the chloroplast in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J*, 11:818–828. <https://doi.org/10.1111/pbi.12073>
- Coll J (2006) Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: A review. *Spanish J Agri Res*, 4:316–330. <https://doi.org/10.5424/sjar/2006044-209>
- Daniell H (2006) Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J*; 1:1071-9. <https://doi.org/10.1002/biot.200600145>
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* 6:219–226. [doi:10.1016/S1360-1385\(01\)01922-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01922-7)
- de Morais, MG, Vaz B, de Morais EG, Costa JA (2015) Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed Res Int*, 2015:835761. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>
- Demain AL, Vaishnav P (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv*, 27:297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Demurtas OC, Massa S, Ferrante P, Venuti A, Franconi R, Giuliano GA (2013) *Chlamydomonas*-derived human papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS ONE*, 8(4):e61473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061473>
- Dreesen IAJ, Hamri GC-E, Fussenegger M (2010) Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J Biotechnol*, 145:273–280. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.006>
- Dyo YM, Purton S (2018) The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology*, (Reading), 164:113–121. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000599>
- Dove A (2002) Uncorking the biomanufacturing bottleneck. *Nat. Biotechnol.* 20, 777–779. <https://doi.org/10.1038/nbt0802-777>
- Economou C, Wannathong T, Szaub J, Purton S (2014) A simple, low-cost method for chloroplast transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. In *Chloroplast biotechnology: Methods and protocols* (pp. 401–411). New York, NY: Springer Science, Business Media.
- Esland L, Larrea-Alvarez M, Purton S (2018) Selectable markers and reporter genes for engineering the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biology*, 7(4), 46. <https://doi.org/10.3390/biology7040046>
- Fernández I, Ación FG, Fernández JM, Guzmán JL, Magán JJ, Berenguel M (2012) Dynamic model of microalgal production in tubular photobioreactors. *Bioresour Technol.*, 126:172-181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.087>

- Franklin S, Ngo B, Efuet E, et al (2002) Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J*, 30:733–744. <https://doi.org/10.1046/j.1365313x.2002.01319.x>
- Fuentes P, Armarego-Marriott T, Bock R (2018). Plastid transformation and its application in metabolic engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 49, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.004>
- Fukusaki E, Nishikawa T, Kato K, Shinmyo A, Hemmi H, Nishino T, Kobayashi A (2003). Introduction of the archaeobacterial geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene into *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *J Biosci Bioeng*; 95:283–287. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(03\)80030-0](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(03)80030-0)
- Gallaher SD, Fitz-Gibbon ST, Strenkert D, Purvine SO, Pellegrini M, Merchant SS (2018) High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *Plant J*, 93:545–565. <https://doi.org/10.1111/tpj.13788>
- Gangl D, Zedler JAZ, Włodarczyk A, Jensen PE, Purton S, Robinson C (2015) Expression and membrane-targeting of an active plant cytochrome P450 in the chloroplast of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 110, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.006>
- Goldschmidt-Clermont M (1991) Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: A selectable marker for site-directed transformation of *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res*, 19:4083–4089. <https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4083>
- Gregory JA, Shepley-McTaggart A, Umpierrez M, et al. (2016) Immunotherapy using algal-produced Ara h 1 core domain suppresses peanut allergy in mice. *Plant Biotechnol J*, 14:1541–1550. <https://doi.org/10.1111/pbi.12515>
- Gregory JA, Topol AB, Doerner DZ, Mayfield S (2013) Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Appl Environ Microbiol*, 79:3917–3925. <https://doi.org/10.1128/AEM.00714-13>
- Harris EH (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52:363–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363>
- Harris EH (2009) The *Chlamydomonas* sourcebook: introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use, Second Edition. Oxford: Academic Press.
- He DM, Qian KX, Shen GF, Zhang ZF, Yi-Nü L, Su ZL, Shao HB (2007) Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 55:26–30. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.10.042>
- Hirschl S, Ralser C, Asam C, et al. (2017) Expression and characterization of functional recombinant Bet v 1.0101 in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int Arch Allergy Immunol*, 173:44–50. <https://doi.org/10.1159/000471852>
- Janssen M, de Bresser L, Baijens T, Tramper J, Mur LR, Snel JFH, Wijffels RH (2000). Scale-up aspects of photobioreactors: effects of mixing-induced light/dark cycles. *J App Phycol* 12:225–237. <https://doi.org/10.1023/A:1008151526680>
- Jones CS, Luong T, Hannon M, et al. (2013) Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97:1987–1995. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4071-7>
- Kanda K, Ishida T, Hirota R, et al. (2014) Application of a phosphite dehydrogenase gene as a novel dominant selection marker for yeasts. *J Biotechnol*, 182:68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.04.012>
- Kang S, Odom OW, Malone CL, Thangamani S, Herrin DL (2018) Expression of a synthetic gene for the major cytotoxin (Cyt1Aa) of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis in the chloroplast of wild-type *Chlamydomonas*. *Biology (Basel)*, 7(2):29. <https://doi.org/10.3390/biology7020029>

- Kwon YM, Kim KW, Choi TY, Kim SY, Kim J (2018) Manipulation of the microalgal chloroplast by genetic engineering for biotechnological utilization as a green biofactory. *World J Microbiol Biotechnol*; 34:183. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2567-8>
- Lapina T, Zalutskaya Z, Anikina A, Ermilova E (2013) Accumulation and export of glycerol in unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biol Commun*, 2:36–40. <https://biocomm.spbu.ru/article/view/2638>
- Larosa V, Remacle C (2013). Transformation of the mitochondrial genome. *Int J Dev Biol*, 57:659–665. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130230cr>
- Maikova A, Zalutskaya Z, Lapina T, Ermilova E (2016) The HSP70 chaperone machines of *Chlamydomonas* are induced by cold stress. *J Plant Physiol*, 204:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.07.012>
- Manuell AL, Beligni MV, Elder JH, et al. (2007) Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast. *Plant Biotechnol J*; 5:402-12. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00249.x>
- Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA (2003) Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100:438–442. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237108100>
- Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Marin-Navarro J (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotechnol*, 18:126–133. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.001>
- Mayfield SP, Schultz J (2004) Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J*; 37:449–458. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01965.x>
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318:245–250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Moazami N, Ashori A, Ranjbar R, Tangestani M, Eghtesadi R, Nejad AS (2012) Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass Bioenergy*, 39:49–453. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.01.046>
- Moazami N, Ranjbar R, Ashori A, Tangestani M, Nejad AS (2011) Biomass and lipid productivities of marine microalgae isolated from the Persian Gulf and the Qeshm Island. *Biomass Bioenergy*, 35:1935–1939. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.039>
- Moazez Y, Memari HR, Ofoghi H, Roayaei M, Ahmadi DN (2013) Evaluation of *Spirulina platensis* resistance to different antibiotics to find a selectable marker for genetic transformation. *Jundishapur J Microbiol*, 7:e5456. <https://doi.org/10.5812/jjm.4556>
- Moon M, Kim CW, Park WK, Yoo G, Choi YE, Yang JW (2013) Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res*, 2:352–357. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.003>
- Murbach TS, Glávits R, Endres JR, Hirka G, Vértési A, Béres E, Szakonyiné IP (2018) A toxicological evaluation of *Chlamydomonas reinhardtii*, a Green Algae. *Int J Toxicol*, 37:53–62. <https://doi.org/10.1177/1091581817746109>
- Mussgnug JH (2015) Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99:5407–5418. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6698-7>
- Nickelsen J (2003). Chloroplast RNA-binding proteins. *Curr Genet*; 43:392–399. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0425-0>
- Ofoghi H, Mironova R, Moazami N, Domonsky N, Ivanov I (1999) Human calcitonin tetrameric gene: comparative expression in yeast and transgenic potato plants. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 13:20–24. <https://doi.org/10.1080/13102818.1999.10819012>
- Palomares LA, Estrada-Moncada S, Ramírez OT (2004) Production of recombinant proteins In P. Balbas, A. Lorence (Eds.), *Reviews and Protocols: Recombinant Gene Expression* (pp. 15–51). Springer.

- Papaefthimiou D, Diretto G, Demurtas OC, Mini P, Ferrante P, Giuliano G, Kanellis AK (2019). Heterologous production of labdane-type diterpenes in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry*; 167:112082. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112082>
- Peters J, Stoger E (2011) Transgenic crops for the production of recombinant vaccines and anti-microbial antibodies. *Hum Vaccin* 7:367-374. doi:10.4161/hv.7.3.14303
- Pulz O (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57:287–293. <https://doi.org/10.1007/s002530100702>
- Purton S, Szaub J, Wannathong T, Young R, Economou C (2013). Genetic engineering of algal chloroplasts: Progress and prospects. *Russ J Plant Physiol*; 60:491–499. <https://doi.org/10.1134/S1021443713040146>
- Purton S (2007) Tools and techniques for chloroplast transformation of *Chlamydomonas*. *Adv Exp Med Biol*; 616:34–45. https://doi.org/10.1007/978-0-387-75532-8_4
- Randolph-Anderson B, Boynton JE, Dawson J, Dunder E, Eskes R, Gillham NW, Heiser WC (2015). Sub-micron gold particles are superior to larger particles for efficient biolistic transformation of organelles and some cell types. *US/EG Bulletin (BIO-RAD)*. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2015.pdf. Consultado julio de 2021.
- Rasala BA, Muto M, Lee PA, et al. (2010) Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J*; 8:719-733. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00503.x>
- Remacle C, Cline S, Boutaffala L, Gabilly S, Larosa V, Barbieri MR, Hamel PP (2009) The ARG9 gene encodes the plastid-resident N-acetyl ornithine aminotransferase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*; 8:1460–1463. <https://doi.org/10.1128/EC.00108-09>
- Richter LV, Yang H, Yazdani M, Hanson MR, Ahner BA (2018) A downstream box fusion allows stable accumulation of a bacterial cellulase in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Biotechnol Biofuels*; 11:133. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1127-7>
- Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LM, Soria-Guerra RE (2012) *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Rep*. 31:479–494. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1186-8>
- Rott R, Liveanu V, Drager RG, Stern DB, Schuster G (1998) The sequence and structure of the 3'-untranslated regions of chloroplast transcripts are important determinants of mRNA accumulation and stability. *Plant Mol Biol*; 36:307–314. <https://doi.org/10.1023/a:1005943701253>
- Sakamoto W, Kindle KL, Stern DB (1993) In vivo analysis of *Chlamydomonas* chloroplast *petD* gene expression using stable transformation of beta-glucuronidase translational fusions. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:497-501. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.497>
- Salehzadeh A, Ofoghi H, Roohvand F, Aghasadeghi MR, Parivar K (2012) Human calcitonin (hCT) gene expression and secretion by *Pichia pastoris*. *Rom Biotechnol Lett*; 17:7036–7042.
- Salvador ML, Suay L, Anthonisen IL, Klein U (2004) Changes in the 5'-untranslated region of the *rbcL* gene accelerate transcript degradation more than 50-fold in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*; 45:176–182. <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0470-8>
- Saxena B, Subramaniyan M, Malhotra K, Bhavesh, NS, Potlakayala, SD, Kumar S (2014) Metabolic engineering of chloroplasts for artemisinic acid biosynthesis and impact on plant growth. *J Biosci*. 39:33–41. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9402-z>
- Schötz F, Bathelt H, Arnold CG, Schimmer O (1972) The architecture and organization of the *Chlamydomonas* cell. Results of serial-section electron microscopy and a three-dimensional reconstruction. *Protoplasma*; 75:229-54. <https://doi.org/10.1007/BF01279818>

- Shamriz S, Ofoghi H, Amini-bayat Z (2016) Soluble expression of recombinant nerve growth factor in cytoplasm of *Escherichia coli*. Iran J Biotechnol, 14:16–22. <https://doi.org/10.15171/ijb.1331>
- Shamriz S, Ofoghi H (2016). Outlook in the application of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast as a platform for recombinant protein production. Biotechnol Genet Eng Rev; 32:92–106. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1307673>
- Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H (1998). High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Genetics; 148:1821–1828.
- Stern DB, Radwanski ER, Kindle KL (1991). A 3' stem/loop structure of the *Chlamydomonas* chloroplast *atpB* gene regulates mRNA accumulation in vivo. Plant Cell; 3:285–297. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.3.285>
- Su Z, Qian K, Tan C, et al. (2005) Recombination and heterologous expression of allophycocyanin gene in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. Acta Biochim Biophys Sin: 37:709–712. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00092.x>
- Suay L, Salvador ML, Abesha E, Klein U (2005) Specific roles of 5' RNA secondary structures in stabilizing transcripts in chloroplasts. Nucleic Acids Res; 33:4754–4761. <https://doi.org/10.1093/nar/gki760>
- Sun M, Qian K, Su, N, Chang H, Liu J, Shen G (2003) Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Biotechnol Lett; 25:1087–1092. <https://doi.org/10.1023/a:1024140114505>
- Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, et al. (2009) Factors effecting expression of vaccines in microalgae. Biologicals; 37:133-8. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.005>
- Taunt HN, Stoffels L, Purton S (2018) Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals. Bioengineered; 9:48–54. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1377867>
- Tevatia R, Payne S, Allen J, et al. (2019). A synthetic *cdo/csad* taurine pathway in the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Algal Research; 40:101491. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101491>
- Tran M, Van C, Barrera DJ, Pettersson PL, Peinado CD, Bui J, Mayfield SP (2013) Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. Proc Natl Acad Sci USA; 110:E15–E22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214638110>
- Tran M, Zhou B, Pettersson PL, Gonzalez MJ, Mayfield SP (2009) Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. Biotechnol Bioeng; 104:663–673. <https://doi.org/10.1002/bit.22446>
- Valledor L, Furuhashi T, Hanak AM, Weckwerth W (2013) Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Cell Proteomics; 12:2032–2047. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.026765>
- Walker TL, Purton S, Becker DK, Collet C (2005) Microalgae as bioreactors. Plant Cell Rep; 24:629–641. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0004-6>
- Wang X, Brandsma M, Tremblay R, Maxwell D, Jevnikar AM, Huner N, Ma S (2008) A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). BMC Biotechnol; 8:87. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-87>
- Wang SK, Stiles AR, Guo C, Liu CZ (2014) Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. Eng. Life Sci. 14:550-559. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300170>

Artículos

Wannathong T, Waterhouse JC, Young REB, Economou CK, Purton S (2016) New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 100:5467–5477. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7354-6>

Yan N, Fan C, Chen Y, Hu Z (2016) The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *Int J Mol Sci*. 17:962. <https://doi.org/10.3390/ijms17060962>

Young R, Purton S (2018) CITRIC: cold-inducible translational readthrough in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* using a novel temperature-sensitive transfer RNA. *Microb Cell Fact*; 17:186. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1033-5>

Zedler JA, Gangl D, Hamberger B, Purton S, Robinson C (2015) Stable expression of a bifunctional diterpene synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol*; 27:2271–2277. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0504-2>