



OBTENCIÓN DE CLONAS DE *Chlamydomonas reinhardtii* TRANSPLASTOMICAS QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA MULTIEPÍTOPE CTB-AHC CONTRA ATEROSCLEROSIS

Dania Olivia Govea-Alonso Sergio Rosales-Mendoza, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biofarmacéuticos Recombinantes, San Luis Potosí, 78210,

dania.govea@gmail.com.

Palabras clave: aterosclerosis, multiepítotope, tolerancia.

Introducción. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de las arterias, que involucra la acumulación y oxidación de lipoproteínas en la pared vascular y que conduce a un proceso inflamatorio en el que intervienen elementos de la inmunidad innata y adaptativa. Dicha patología es la causa de altas tasas de mortalidad y morbilidad en el mundo, asociada a enfermedades cardiovasculares [1,2]. El tratamiento actual consiste en la administración de estatinas con el fin de disminuir los niveles de lipoproteínas, sin embargo el desapego al tratamiento por parte del paciente limita su efectividad por lo que es necesario el desarrollo de tratamientos más robustos, tales como la vacunación [3]. Este trabajo describe la producción y caracterización de una proteína quimérica recombinante constituida por CTB y epítotoes relevantes en inmunoterapia contra aterosclerosis empleando *Chlamydomonas reinhardtii* como hospedero de expresión, como una estrategia para el diseño de posibles vacunas contra la aterosclerosis.

Metodología. Se diseñó la proteína quimérica CTB-AHC que comprende los siguientes epítotoes; ApoB100⁶⁸⁷⁻⁷⁰⁷, HSP60¹⁵³⁻¹⁶³ y Cpn (MOMP⁶⁷⁻⁷⁴, POMPS²⁸³⁻²⁹¹) fusionados a CTB con la finalidad de emplearla como acarreador y adyuvante. La compañía Genscript sintetizó el gen que codifica para CTB-AHC, que fue clonado en el vector de expresión p463. Se transformaron células de *Chlamydomonas reinhardtii* mediante biobalística, dirigiendo la inserción del transgén al genoma de cloroplasto. Se analizó la inserción a dicho genoma mediante PCR empleando oligonucleótidos específicos tanto para el gen *aadA* como para el transgén.

Resultados.

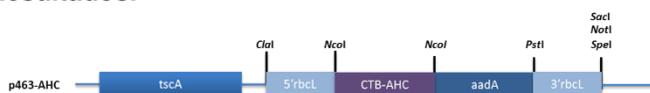


Fig. 1. Mapa físico del vector p463-AHC. El gen *AHC* se clonó río abajo del 5'rbcl. Contiene el gen *aadA* que confiere resistencia a espectinomicina.

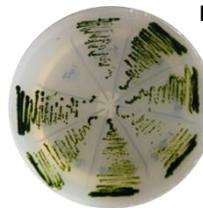


Fig. 2. Clonas candidatas de *Chlamydomonas reinhardtii* CTB-AHC. Crecimiento de clonas candidatas de *Chlamydomonas reinhardtii* en medio TAP con espectinomicina. La cepa WT no presenta crecimiento (cuadrante superior izquierdo).

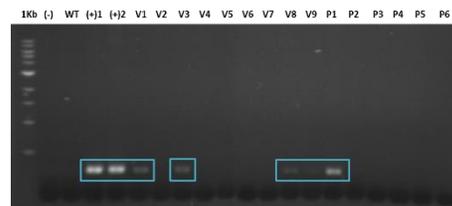


Fig. 3. Análisis de PCR clonas candidatas de *Chlamydomonas reinhardtii* CTB-AHC. Nótese la presencia de la banda esperada de 400 pb correspondiente al gen *AHC*, lo que sugiere la integración del casete de expresión en el genoma de cloroplasto. Carriles: marcador de PM 1Kb; WT, planta silvestre; (+), control positivo; (-), control negativo; V1-V9 y P1-P6, plantas candidatas.

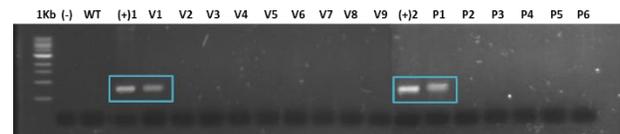


Fig. 4. Análisis de PCR clonas candidatas de *Chlamydomonas reinhardtii* CTB-AHC. Nótese la presencia de la banda esperada de 700 pb que corresponde al gen *aadA*, que sugiere la integración del casete de expresión en el genoma de cloroplasto. Carriles: marcador de PM 1Kb; WT, planta silvestre; (+1, +2), control positivo; (-), control negativo; V1-V9 y P1-P6, plantas candidatas.

Se eligieron las clonas V1 y P1 para realizar análisis de expresión de la proteína CTB-AHC mediante técnicas de Western-blot y ELISA.

Conclusiones. Es posible transformar exitosamente *Chlamydomonas reinhardtii* mediante la técnica de biobalística, a fin de insertar de forma dirigida el gen CTB-AHC en el genoma de cloroplasto, bajo eventos de recombinación homóloga.

Agradecimiento. CONACYT Beca de progrado 360422

Bibliografía. [1] Chyu KY, Shah PK (2014) Can we vaccinate against atherosclerosis? J Cardiovasc Pharmacol Ther 19:77-82. [2] Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R (2013) Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. Heart Lung Circ 22:399-411. [3] Riley E, Dasari V, Frishman WH, Sperber K (2008) Vaccines in development to prevent and treat atherosclerotic disease. Cardiol Rev 16:288-300.