

**FISIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA DE PIROFOSFATASAS
TRANSLOCADORAS DE PROTONES**

Trabajo presentado para optar al grado de
Doctor en Química por la Licenciada
Rosa Laura López Marqués

Sevilla, 15 de Abril de 2004

Directores:

Aurelio Serrano Delgado
Científico Titular
del C.S.I.C.

José Román Pérez Castiñeira
Profesor Asociado de Bioquímica
y Biología Molecular

Tutor:

Manuel Losada Villasante
Catedrático Emérito de Bioquímica y Biología Molecular

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El fósforo en los sistemas biológicos	3
1.2. El ciclo biogeológico del fósforo	3
1.3. Incorporación del fósforo al metabolismo celular	5
1.3.1. <u>Transporte de fosfato al interior celular: el regulón PHO</u>	5
1.3.2. <u>Energetización y asimilación de Pi</u>	6
1.3.3. <u>Asimilación fotosintética de Pi: ATP- y PPI-sintasas</u>	7
1.4. El enlace pirofosfato	10
1.5. Los polifosfatos (poliP)	11
1.5.1. <u>Generalidades</u>	11
1.5.2. <u>El pirofosfato inorgánico (PPI)</u>	13
1.5.2.1. <u>Características generales</u>	13
1.5.2.2. <u>Contenido celular de pirofosfato y variación de la energía de hidrólisis</u>	14
1.6. Enzimas que hidrolizan PPI: pirofosfatasas solubles y de membrana	17
1.6.1. <u>Pirofosfatasas solubles</u>	17
1.6.2. <u>Pirofosfatasas de membrana translocadoras de protones</u>	19
1.6.2.1. <u>Características generales</u>	19
1.6.2.2. <u>Las H⁺-PPasas de los organismos procariotas: la H⁺-PPasa de <i>Rhodospirillum rubrum</i></u>	19
1.6.2.3. <u>Las H⁺-PPasas de los organismos eucarióticos fotosintéticos</u>	22
1.6.2.4. <u>Las H⁺-PPasas de los protistas no fotosintéticos</u>	32
1.6.2.5. <u>Clonación molecular de H⁺-PPasas y estudio de regiones conservadas</u>	35
1.7. V-ATPasas	37
1.8. Objetivos de esta Tesis Doctoral	38

2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1. Organismos y condiciones de cultivo	43
2.1.1. <u>Bacterias fotosintéticas</u>	43
2.1.1.1. <u>Estirpes de bacterias fotosintéticas utilizadas</u>	43
2.1.1.2. <u>Cultivo de bacterias fotosintéticas en medio líquido</u>	44
2.1.1.3. <u>Cultivo de <i>Rhodospirillum rubrum</i> en medio sólido</u>	47
2.1.1.4. <u>Condiciones especiales de cultivo</u>	47
2.1.2. <u>Microalgas eucarióticas</u>	47
2.1.2.1. <u>Estirpes de microalgas eucarióticas utilizadas</u>	47
2.1.2.2. <u>Condiciones de cultivo en medio líquido</u>	50
2.1.2.3. <u>Condiciones de cultivo en medio sólido</u>	50
2.1.2.4. <u>Condiciones especiales de cultivo</u>	50
2.1.3. <u>Escherichia coli</u>	51
2.1.3.1. <u>Estirpes de <i>E.coli</i> utilizadas</u>	51
2.1.3.2. <u>Cultivo de <i>E.coli</i> en medio líquido</u>	51
2.1.3.3. <u>Cultivo de <i>E. coli</i> en medio sólido</u>	52
2.1.4. <u>Levadura</u>	52
2.1.4.1. <u>Estirpes de levadura utilizadas</u>	52
2.1.4.2. <u>Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio líquido</u>	53
2.1.4.3. <u>Condiciones especiales de cultivo en medio líquido</u>	54
2.1.4.4. <u>Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido</u>	55
2.1.5. <u>Otros microorganismos utilizados</u>	55
2.1.6. <u>Curvas de crecimiento de los cultivos</u>	57
2.2. Recogida de células	58
2.3. Preparaciones de membranas y extractos celulares	58
2.3.1. <u>Preparación de membranas y extractos celulares de <i>Rhodospirillum rubrum</i></u>	58
2.3.2. <u>Preparaciones de membranas y extractos celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	59
2.3.3. <u>Preparación de extractos celulares de <i>Escherichia coli</i></u>	61

2.4. Determinación de la actividad pirofosfatasa	61
2.4.1. <u>Actividad pirofosfatasa soluble</u>	61
2.4.2. <u>Actividad pirofosfatasa de membrana</u>	62
2.5. Métodos analíticos	63
2.5.1. <u>Medidas espectrofotométricas</u>	63
2.5.2. <u>Determinación de bacterioclorofila</u>	63
2.5.3. <u>Determinación de clorofila</u>	64
2.5.4. <u>Determinación de proteína</u>	64
2.5.5. <u>Medidas de pH</u>	65
2.6. Métodos de purificación y caracterización de proteínas	65
2.6.1. <u>Purificación de proteínas por cromatografía de ion-quelante</u>	65
2.6.1.1. <u>Cromatografía de ion-quelante en columnas cargadas con</u> <u>Cu²⁺</u>	66
2.6.1.2. <u>Cromatografía de ion-quelante en columnas cargadas con</u> <u>Ni²⁺</u>	66
2.6.2. <u>Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones</u> <u>desnaturalizantes (SDS-PAGE)</u>	67
2.6.2.1. <u>Preparación de las muestras</u>	67
2.6.2.2. <u>Desarrollo de la electroforesis mediante el método de Laemmli</u>	68
2.6.2.3. <u>Desarrollo de la electroforesis mediante el método de</u> <u>Schägger y von Jagow</u>	69
2.6.2.4. <u>Teñido de los geles</u>	69
2.6.3. <u>Extracción de proteínas de geles de acrilamida mediante electroelución</u>	70
2.6.4. <u>Extracción de proteínas de geles de acrilamida mediante "difusión</u> <u>pasiva"</u>	71
2.7. Métodos inmunológicos e inmunicitoquímicos	72
2.7.1. <u>Obtención de anticuerpos policlonales en conejo</u>	72
2.7.2. <u>Transferencia de proteína a membranas de nitrocelulosa</u>	72
2.7.3. <u>Inmunodetección por Western Blot</u>	73
2.7.4. <u>Microscopía de inmunofluorescencia</u>	74
2.8. Métodos genéticos de manipulación del DNA	75
2.8.1. <u>Plásmidos utilizados</u>	75

2.8.2. <u>Métodos de transformación genética</u>	76
2.8.2.1. <u>Preparación de células de <i>E. coli</i> para transformación por electroporación</u>	76
2.8.2.2. <u>Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación</u>	76
2.8.2.3. <u>Preparación de células de <i>E. coli</i> para transformación por choque térmico</u>	77
2.8.2.4. <u>Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico</u>	77
2.8.2.5. <u>Transformación de levaduras</u>	78
2.8.2.6. <u>Transformación de <i>Rhodospirillum rubrum</i> por choque térmico</u>	78
2.8.2.7. <u>Transformación de <i>Rhodospirillum rubrum</i> por conjugación</u>	79
2.8.2.8. <u>Transformación de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></u>	79
2.8.3. <u>Aislamiento del DNA</u>	80
2.8.3.1. <u>Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a pequeña escala</u>	80
2.8.3.2. <u>Aislamiento de DNA de plásmido de cadena simple</u>	81
2.8.3.3. <u>Aislamiento de DNA genómico de microalgas eucarióticas</u>	82
2.8.3.4. <u>Aislamiento de DNA genómico de bacterias fotosintéticas</u>	83
2.8.3.5. <u>Aislamiento de DNA genómico de levadura</u>	83
2.8.3.6. <u>Aislamiento de DNA de cianobacterias</u>	84
2.8.3.7. <u>Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</u>	85
2.8.3.8. <u>Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa</u>	86
2.8.4. <u>Análisis del DNA</u>	87
2.8.4.1. <u>Electroforesis de DNA en geles de agarosa</u>	87
2.8.4.2. <u>Determinación de la concentración y pureza del DNA</u>	88
2.8.4.3. <u>Análisis del DNA por Southern Blot</u>	88
2.8.5. <u>Tratamientos enzimáticos del DNA</u>	90
2.8.5.1. <u>Restricción del DNA</u>	90
2.8.5.2. <u>Desfosforilación de extremos del DNA</u>	91

2.8.5.3. <u>Formación de extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes</u>	91
2.8.5.4. <u>Formación de extremos romos a partir de extremos 5' protuberantes</u>	92
2.8.5.5. <u>Ligación de fragmentos de DNA</u>	92
2.8.5.6. <u>Preparación de sondas radiactivas de DNA</u>	92
2.8.6. <u>Secuenciación del DNA</u>	93
2.8.6.1. <u>Secuenciación automática del DNA mediante marcaje fluorescente</u>	93
2.8.6.2. <u>Secuenciación manual de DNA de cadena doble mediante marcaje radiactivo</u>	93
2.8.6.3. <u>Secuenciación manual de DNA de cadena simple mediante marcaje radiactivo</u>	94
2.9. Aislamiento y análisis del RNA	95
2.9.1. <u>Aislamiento de RNA</u>	95
2.9.2. <u>Aislamiento de RNA de microalgas eucarióticas</u>	95
2.9.3. <u>Aislamiento de RNA de bacterias fotosintéticas</u>	96
2.9.4. <u>Aislamiento de RNA de levadura</u>	97
2.9.5. <u>Estimación de la concentración, pureza e integridad del RNA</u>	98
2.9.6. <u>Electroforesis desnaturizante de RNA en geles de agarosa</u>	98
2.9.7. <u>Análisis de RNA mediante Northern Blot</u>	99
2.9.8. <u>Experimentos de extensión del cebador. Determinación de los puntos de inicio de la transcripción (TSPs)</u>	99
2.9.8.1. <u>Experimentos de extensión del cebador por protocolos estándar</u>	99
2.9.8.2. <u>Experimentos de extensión del cebador a alta temperatura</u>	100
2.10. Minipreparaciones de RNA y DNA genómico de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	101
2.11. Análisis de secuencias de DNA y proteínas por métodos informáticos	102

2.12. Otras técnicas utilizadas	103
2.12.1. <u>Determinación de los niveles de pirofosfato celular</u>	103
2.12.2. <u>Determinación de la actividad de bombeo de protones</u>	103
3. RESULTADOS	105
3.1. Estudio sobre la distribución de las pirofosfatasas de membrana en microorganismos fotosintéticos y heterótrofos de distintos grupos taxonómicos	107
3.1.1. <u>Identificación de posibles H⁺-PPasas</u>	107
3.1.2. <u>Análisis por Southern Blot</u>	119
3.1.3. <u>Estudios de filogenia molecular</u>	122
3.2. Generación de un mutante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> carente de actividad sPPasa y su complementación con PPasas de membrana bacterianas y de plantas	132
3.3. Regulación de la PPasa de membrana translocadora de protones de <i>Rhodospirillum rubrum</i> en condiciones de estrés	140
3.3.1. <u>Obtención de sondas de DNA: clonación del gen que codifica para la sPPasa de <i>R. rubrum</i></u>	140
3.3.2. <u>Regulación diferencial de las PPasas de <i>R. rubrum</i> en condiciones heterotróficas y fotosintéticas</u>	141
3.3.3. <u>Expresión de la H⁺-PPasa de <i>R. rubrum</i> en distintas condiciones metabólicas anaeróbicas</u>	145
3.3.4. <u>Inducción de la PPasa de membrana en condiciones aeróbicas: efecto del estrés salino</u>	147
3.3.5. <u>Clonación de las secuencias promotoras del gen <i>vpp</i>, determinación de los puntos de inicio de la transcripción (TSPs) y análisis de las posibles secuencias reguladoras</u>	148
3.3.6. <u>Intentos de obtención de un mutante de <i>R. rubrum</i> carente de H⁺-PPasa</u>	154

3.4. Regulación transcripcional de la H⁺-PPasa en las microalgas eucarióticas	
<i>Chlorella fusca</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	156
3.4.1. <u>Estudios fisiológicos sobre la regulación transcripcional de las H⁺-PPasas de <i>C. fusca</i> y <i>C. reinhardtii</i></u>	156
3.4.2. <u>Obtención de mutantes de antisentido y sobreexpresión de la H⁺-PPasa de <i>C. reinhardtii</i>: clonación del fragmento de DNA genómico correspondiente al gen para dicha proteína</u>	162
3.4.3. <u>Obtención de mutantes antisentido de las sPPasas cloroplástica y mitocondrial de <i>C. reinhardtii</i>: intentos de clonación de los fragmentos de DNA genómico que contienen los genes para dichas proteínas</u>	174
3.5. Obtención de un anticuerpo policlonal contra la H⁺-PPasa	176
3.5.1. <u>Expresión heteróloga y purificación de un polipéptido correspondiente al bucle hidrofílico de unión al PPi de la H⁺-PPasa dependiente de potasio de <i>Arabidopsis thaliana</i> (AVP1). Intento de obtención de un anticuerpo policlonal mono específico en conejo</u>	176
3.5.2. <u>Expresión heteróloga y purificación de la H⁺-PPasa de <i>Thermotoga maritima</i> (TVP). Obtención de un anticuerpo policlonal mono específico en conejo</u>	178
4. DISCUSIÓN	197
4.1. Estudio sobre la distribución de las PPasas de membrana en microorganismos fotosintéticos y heterótrofos de distintos grupos taxonómicos	199
4.2. Complementación funcional de la sPPasa citosólica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por H⁺-PPasas de bacterias y plantas	205
4.3. Regulación de la H⁺-PPasa de <i>Rhodospirillum rubrum</i> en condiciones de estrés	209
4.4. Regulación transcripcional de la H⁺-PPasa en las microalgas eucarióticas <i>Chlorella fusca</i> y <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	216

4.5. Obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra la PPasa de membrana y purificación de una H⁺-PPasa termofílica bacteriana	222
5. CONCLUSIONES	231
6. BIBLIOGRAFÍA	235

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1: Ciclo ácido-base de energetización del ortofosfato y desenergetización del metafosfato	10
Figura 1.2: Los cromatóforos de <i>Rhodospirillum rubrum</i>	20
Figura 1.3: La V-PPasa de los organismos eucarióticos fotosintéticos	24
Figura 1.4: Modelos de estructura terciara para las H ⁺ -PPasas	36

3. RESULTADOS

Figura 3.1.1: Identificación de posibles polipéptidos de H ⁺ -PPasas en microalgas eucarióticas y plantas mediante análisis por Western Blot	108
Figura 3.1.2: Diseño de oligonucleótidos degenerados contra dominios conservados en H ⁺ -PPasas de bacterias y plantas	109
Figura 3.1.3: Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos degenerados PP1 y PP2 para distintos organismos	115
Figura 3.1.4: Secuencias de nucleótidos de los fragmentos de DNA genómico amplificados por los oligonucleótidos PP1 y PP2 para la H ⁺ -PPasa de <i>Chlorella salina</i> y la isoforma IV de <i>Phaeodactylum tricorutum</i>	116
Figura 3.1.5: Análisis por Southern Blot del DNA genómico de <i>Tetraselmis chuii</i>	119
Figura 3.1.6: Análisis por Southern Blot del DNA genómico de distintas microalgas eucarióticas mediante el uso de sondas de H ⁺ -PPasas	121
Figura 3.1.7: Análisis por Southern Blot heterólogo para las microalgas <i>Dunaliella salina</i> y <i>Euglena gracilis</i>	122

Figura 3.1.8: Alineamiento de secuencias parciales de H ⁺ -PPasas para microorganismos de distintos orígenes filogenéticos	128
Figura 3.1.9: Filogenia molecular de las H ⁺ -PPasas de organismos fotosintéticos y heterotróficos de diversos grupos taxonómicos	131
Figura 3.2.1: Obtención de la estirpe mutante de levadura YPC-1	133
Figura 3.2.2: Crecimiento en distintos azúcares y caracterización molecular de la estirpe mutante YPC-1	134
Figura 3.2.3: Análisis por Northern Blot y caracterización bioquímica de la estirpe mutante YPC-1	135
Figura 3.2.4: Complementación funcional del mutante YPC-1 en función del pH externo	137
Figura 3.2.5: Análisis por Northern Blot de los niveles de transcrito de AVP1 e IPP1 en las células de YPC-1 transformadas con pRS1024 y pAVP1	137
Figura 3.2.6: Localización subcelular de AVP y CVP	139
Figura 3.2.7: Microscopía de inmunofluorescencia de células del mutante YPC-1 transformadas con el plásmido pAVP1	139
Figura 3.3.1: Cinéticas de los niveles de H ⁺ -PPasa y sPPasa durante el desarrollo de los cultivos anaeróbicos-fotosintéticos de <i>R. rubrum</i>	142
Figura 3.3.2: Cinéticas de los niveles de sPPasa y H ⁺ -PPasa durante el desarrollo de los cultivos aeróbicos-fototróficos de <i>R. rubrum</i>	144
Figura 3.3.3: Efecto de la transición desde condiciones aeróbicas en oscuridad a condiciones aeróbicas/anaeróbicas en luz/oscuridad sobre la H ⁺ -PPasa de <i>R. rubrum</i>	145

Figura 3.3.4: Análisis comparativo de los niveles de PPasa de membrana en cultivos de <i>R. rubrum</i> crecidos en distintas condiciones tróficas	146
Figura 3.3.5: Inducción por estrés salino de la H ⁺ -PPasa de <i>R. rubrum</i>	148
Figura 3.3.6: Clonación de las secuencias promotoras del gen <i>vpp</i>	150
Figura 3.3.7: Secuencia de la región promotora y análisis de extensión del cebador para el gen de la H ⁺ -PPasa de <i>R. rubrum</i>	153
Figura 3.3.8: Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras de los genes <i>vpp</i> de las bacterias púrpura fotosintéticas <i>R. rubrum</i> y <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	154
Figura 3.4.1: Efecto del estrés iónico y osmótico sobre los niveles de transcrito para la H ⁺ -PPasa de <i>Chlorella fusca</i>	157
Figura 3.4.2: Cinética de la variación de los niveles de transcrito para la H ⁺ -PPasa en cultivos de <i>C. fusca</i> suplementados con NaCl	158
Figura 3.4.3: Análisis de los niveles de transcrito de la H ⁺ -PPasa de <i>Chlorella fusca</i> en distintas condiciones nutricionales	159
Figura 3.4.4: Efecto del estrés iónico y osmótico sobre los niveles de transcrito para la H ⁺ -PPasa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	161
Figura 3.4.5: Efecto de las condiciones nutricionales en los niveles de transcrito para la H ⁺ -PPasa en la microalga <i>C. reinhardtii</i>	162
Figura 3.4.6: Obtención del plásmido pAsVPP1 para la obtención de un RNA antisentido de la H ⁺ -PPasa de <i>C. reinhardtii</i>	164
Figura 3.4.7: Obtención del plásmido pAsVPP2 para la obtención de un RNA antisentido de la H ⁺ -PPasa de <i>C. reinhardtii</i>	165
Figura 3.4.8: Obtención del plásmido pAsVPP3 para la obtención de un RNA antisentido de la H ⁺ -PPasa de <i>C. reinhardtii</i>	166
Figura 3.4.9: Clonación del fragmento de DNA genómico para la H ⁺ -PPasa de <i>C. reinhardtii</i>	168
Figura 3.4.10: Construcción de un plásmido para la sobreexpresión del gen para la H ⁺ -PPasa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	169

Figura 3.4.11: Caracterización de los posibles mutantes de sobreexpresión de la H ⁺ -PPasa de <i>C. reinhardtii</i> (1): análisis por Northern Blot	171
Figura 3.4.12: Caracterización de los posibles mutantes de sobreexpresión de la H ⁺ -PPasa de <i>C. reinhardtii</i> (2): análisis por Southern Blot y efecto del estrés salino	172
Figura 3.4.13: Aspecto de los cultivos de un posible mutante de antisentido de la H ⁺ -PPasa de <i>C. reinhardtii</i>	173
Figura 3.4.14: Identificación de los fragmentos de DNA genómico correspondientes a las sPPasas mitocondrial y cloroplástica de <i>C. reinhardtii</i>	175
Figura 3.5.1: Purificación del polipéptido correspondiente al bucle hidrofílico <i>e</i> de unión a PPi de la H ⁺ -PPasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> AVP1 mediante unión a columnas de ion-quelante cargadas con Cu ²⁺	178
Figura 3.5.2: Expresión heteróloga en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la H ⁺ -PPasa de <i>Thermotoga maritima</i> fusionada a un grupo de seis histidinas en su extremo amino-terminal	180
Figura 3.5.3: Solubilización de TVP a distintas temperaturas y concentraciones de DDM	182
Figura 3.5.4: Solubilización de TVP a 75°C durante distintos periodos de tiempo	184
Figura 3.5.5: Solubilización de TVP en presencia de distintas concentraciones de Mg ²⁺	185
Figura 3.5.6: Solubilización de TVP en presencia de distintas combinaciones de ligandos	186
Figura 3.5.7: Efecto del lavado de las membranas totales sobre la solubilización de TVP	187
Figura 3.5.8: Enriquecimiento de membranas en TVP mediante gradientes de sacarosa en un paso y solubilización a distintas temperaturas y tiempos	189

Figura 3.5.9: Solubilización de TVP a distintos pHs	190
Figura 3.5.10: Purificación de la H ⁺ -PPasa de <i>Thermotoga maritima</i> en dos pasos	191
Figura 3.5.11: Análisis por Western Blot de la inmunodetección cruzada con el anticuerpo contra la H ⁺ -PPasa de <i>Thermotoga maritima</i> con distintas H ⁺ -PPasas dependientes e independientes de K ⁺	191
Figura 3.5.12: Eliminación parcial de la hibridación inespecífica del anticuerpo contra la H ⁺ -PPasa de <i>Thermotoga maritima</i>	192
Figura 3.5.13: Oligonucleótidos empleados en la obtención de las distintas versiones de la proteína TVP para su expresión heteróloga en levadura y purificación por unión a columnas cargadas con Ni ²⁺	193
Figura 3.5.14: Expresión heteróloga de TVP fusionada a un motivo RGS ₆ en su extremo amino terminal	195
Figura 3.5.15: Purificación de TVP por su unión a una matriz de agarosa cargada con Ni ²⁺	196

ÍNDICE DE TABLAS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

I: Relación de bacterias fotosintéticas utilizadas	43
II: Relación de otras microalgas eucarióticas utilizadas	48
III: Relación de organismos no fotosintéticos utilizados	55
IV: Relación de cianobacterias utilizadas	57
V: Plásmidos utilizados	75

3. RESULTADOS

VI: Condiciones de las reacciones de PCR para microalgas eucarióticas	110
VII: Condiciones de las reacciones de PCR para bacterias fotosintéticas	112
VIII: Condiciones de las reacciones de PCR para microorganismos no fotosintéticos	113
IX: Números de acceso de algunas de las secuencias obtenidas	117
X: Otros microorganismos utilizados	117

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACMA	Acridina 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
Apdo.	Apartado
APS	Persulfato amónico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Adenosín-trifosfato
bisacrilamida	N,N'-bis-metilén-acrilamida
BSA	Seroalbúmina bovina
CCAP	Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (Reino Unido)
CCCP	Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona
cDNA	Ácido desoxirribonucleico codificante
cm	Centímetro
CMC	Concentración micelar crítica
Conc.	Concentración
CTAB	Bromuro de hexadecil-trimetil-amonio
dATP	2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
DCCD	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
dCTP	2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
DDM	n-dodecil- β -D-glucopiranosido
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	2'-desoxirribonucleótido
DSM	Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares
dTTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitol
E	Einstein
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eV	Electrónvoltio

g	Gramo
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad
GFP	Proteína fluorescente verde (<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
h	Hora
H ⁺ -PPasa	Pirofosfatasa translocadora de protones
Hz	Herzio
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil-tio-β-galactopiranosido
kb	kilobase
kDa	kilodalton
K _m	Constante de Michaelis-Menten
l	litro
LB	Medio de Luria-Bertani
MES	Ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico
min	Minuto
ml	Mililitro
Mm	Masa molecular
mM	Milimolar
mm	Milímetro
nm	Nanometro
NAD	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NADH	Hidrógeno-nicotinamida-adenín-dinucleótido
NEM	N-etilmaleimida
nt	Nucleótido
ORF	Pauta abierta de lectura
OVO	Ovalbúmina
P	Fósforo
PEG	Polietilenglicol
Pi	Fosfato inorgánico
pol.	Polimerasa
PPasa	Pirofosfatasa
PPi	Pirofosfato

PCI	Mezcla fenol:clorofomo:alcohol isoamílico (25:24:1)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fosfato inorgánico
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PPi	Pirofosfato
PoliP	Polifosfato(s)
p/v	Relación peso/volumen
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosómico
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RVC	" <u>R</u> ibonucleoside <u>V</u> anadyl <u>C</u> omplexes"
SAG	Colección de algas de la Universidad de Göttingen
SD	Medio sintético selectivo de levadura con glucosa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SGal	Medio sintético selectivo de levadura con galactosa
sp.	Especie
sPPasa	Pirofosfatasa soluble
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina
TMAO	N-óxido de trimetilamina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSP	Punto de inicio de la transcripción
U	Unidades
UTEX	Colección de microorganismos de la Universidad de Texas
UV	Ultravioleta
V	Voltio
V-H ⁺ -ATPasa	ATPasa translocadora de protones de la membrana vacuolar
V-PPasa	Pirofosfatasa translocadora de protones de la membrana vacuolar

v/v	Relación volumen/volumen
W	Watio
YNB	Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico
YPD	Medio rico de levadura con glucosa
YPGal	Medio rico de levadura con galactosa

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El fósforo en los sistemas biológicos

De los seis bioelementos primordiales que son asimilados por los organismos vivos- H, C, O, N, P y S- el fósforo (P) es el quinto en importancia cuantitativa como componente celular. Sin embargo, este bioelemento es parte fundamental del armazón de numerosas biomoléculas (ácidos nucleicos, coenzimas y metabolitos), es un componente esencial de las membranas lipídicas y forma complejos con proteínas, carbohidratos y lipopolisacáridos. El P es, además, único entre los bioelementos primordiales y juega un papel clave en bioenergética al ser el componente fundamental del grupo químico depositario de la energía de enlace que genera y consume el metabolismo celular (Losada *et ál.* 1999). En contraste con los restantes bioelementos primordiales, el P no cambia su estado de oxidación al incorporarse a la materia viva, sino que, tras ser transportado al interior celular en forma de anión ortofosfato (H_2PO_4^- , Pi), sufre un proceso ácido-base por el que se energiza a metafosfato ($\sim\text{PO}_3^-$) al ser incorporado a esqueletos carbonados para formar nucleósidos trifosfato, fundamentalmente ATP ($\text{ADP}\sim\text{PO}_3^-$), donde forma parte de la estructura química denominada grupo pirofosfato ($\text{PO}_3^{2-}\sim\text{O}\sim\text{PO}_3^{2-}$), cuya energía de enlace es utilizada por todos los organismos. En el proceso subsiguiente de desenergización, el $\sim\text{PO}_3^-$ se hidrata directa o indirectamente y pasa de nuevo a Pi (Losada *et ál.* 1999). Una vez en el interior de las células, el Pi puede bien almacenarse en forma de compuestos de reserva en el citosol (polifosfatos en muchos procariontes), o bien acumularse en algún compartimento celular, como en las vacuolas de las células vegetales eucarióticas, en las que la concentración de Pi puede ser varios órdenes de magnitud superior a la del citoplasma (De la Rosa *et ál.* 1990, Rao *et ál.* 1985).

1.2. El ciclo biogeológico del fósforo

En su mayor parte, el fósforo se encuentra presente en la naturaleza en su forma más oxidada de ortofosfato (Pi), formando parte de diversas rocas y minerales, y se transporta al interior celular en forma de anión ortofosfato diprotonado (H_2PO_4^-), la más abundante al pH natural en los hábitats continentales y oceánicos. Sin embargo, la mayor parte del fósforo procedente de la degradación de las rocas no está disponible para los organismos autotróficos (plantas y bacterias), ya que en presencia de cationes de Ca^{2+} ,

Fe^{3+} y Al^{3+} , muy abundantes en la corteza terrestre, se convierten en sales de fosfato insolubles. De hecho, la disponibilidad de P_i es, en muchos casos, el factor limitante del crecimiento de los organismos fotosintéticos, tanto en suelos (plantas) como en medios acuáticos (algas y bacterias). La solubilización de los fosfatos insolubles es, por tanto, un proceso fundamental en el que los microorganismos juegan un papel importante al disminuir el pH de su entorno próximo mediante la producción de diversos compuestos ácidos. Otros microorganismos, en especial bacterias, han desarrollado fosfatasas extracelulares, enzimas capaces de degradar los ésteres orgánicos de fosfato de origen biológico (que en su mayoría no se transportan directamente al interior celular), consiguiendo así altas concentraciones de P_i libre alrededor de las células. Además de en forma de ortofosfato, el fósforo inorgánico también está presente en la naturaleza en otras dos formas químicas de importancia biológica: el pirofosfato (PP_i) y los polifosfatos o metafosfatos [poli(P)]. Estas formas químicas no parecen ser transportadas al interior celular y, actualmente, se desconoce si son reacciones químicas o biológicas las que producen la hidrólisis de estos compuestos que tiene lugar en el suelo. Además, aunque la mayor parte del P se encuentra en la corteza terrestre en forma de fosfatos altamente insolubles y en los seres vivos como P_i libre o como P orgánico, especialmente como ésteres de fosfato, diversos estudios han revelado la presencia en la corteza terrestre de cantidades significativas de compuestos inorgánicos de P en estado más reducido (fosfito, hipofosfito y fosfina) generados por la actividad biológica (Metcalf y Wolfe 1998; Malacinski y Konetzka 1967). Sin embargo, la significación de un posible ciclo redox biológico del P está aún por esclarecer. Además de ser incorporados por los organismos vivos, los fosfatos solubles son continuamente removidos de los ambientes terrestres por lixiviación y transferidos a los océanos. La actividad humana ha alterado este ciclo biogeológico del P: los fertilizantes de fosfato, que desempeñan un papel cada vez más importante en la agricultura, así como los polifosfatos, usados en los detergentes, afectan al medio ambiente, al propiciar, entre otros efectos, la eutrofización de los lagos (Losada *et al.* 1999).

1.3. Incorporación del fósforo al metabolismo celular

1.3.1. Transporte de fosfato al interior celular: el regulón PHO

El primer paso en la asimilación del fósforo por parte de los organismos vivos consiste en el transporte del mismo, normalmente en forma de fosfato, al interior celular. Las especies H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} ($\text{pK}_a=7$), presentes a valores de pH neutros, se pueden transportar al interior de la célula bacteriana mediante dos sistemas multiproteicos localizados en la membrana plasmática:

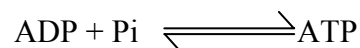
- un sistema de baja afinidad, que opera a concentraciones altas de fosfato (<0,1 mM) y se expresa de forma constitutiva;
- un sistema de baja capacidad pero de alta especificidad, que actúa a bajas concentraciones de fosfato (<10 μM) y cuya síntesis se induce en hambre de fosfato. Este sistema es un transportador de tipo ABC o multicomponente. Estos sistemas de transporte, también llamados sistemas dependientes de proteína periplásmica de unión de sustrato, son transportadores de tipo primario, dependientes de la hidrólisis de ATP (Ames *et ál.* 1990, Higgins *et ál.* 1990). Están constituidos por tres clases de proteínas: 1) proteínas periplásmicas que tienen alta afinidad por el sustrato (proteínas de unión); 2) proteínas integrales de membrana, que poseen 6 hélices α hidrofóbicas y se presentan como homo o heterodímeros; 3) proteínas citosólicas con capacidad para interactuar con los componentes de membrana y asociarse a la misma en su lado citoplásmico. Estas proteínas poseen un dominio de unión al ATP y pueden hidrolizarlo; al igual que en el caso anterior se presentan principalmente en forma de homo o heterodímeros. También se han descrito pseudodímeros, constituidos por un único polipéptido que presenta dos mitades homólogas entre sí. En este caso, representado por los sistemas de transporte de arabinosa (Scripture *et ál.* 1987), galactosa (Hogg *et ál.* 1991) y ribosa (Bell *et ál.* 1986) de *E. coli*, el gen procede probablemente de la duplicación y fusión de un gen ancestral. La proteína de unión al ATP está enormemente conservada entre distintos sistemas de transporte (Ames *et ál.* 1990). Así, existe una región de unos 200 aminoácidos que contiene dos sitios conservados, el sitio A y el sitio B. Estos sitios constituyen el dominio de unión al ATP que se denomina región ABC [de “ATP Binding Cassette” (Higgins *et ál.* 1990)].

Los genes cuya expresión se regula mediante la concentración de Pi extracelular forman parte del regulón PHO, constituido por más de veinte promotores que se regulan por la disponibilidad de Pi en el medio de cultivo. Por definición, todos los genes de un regulón están sujetos al mismo control molecular: un sistema de dos componentes, constituido por una proteína sensora y una proteína activadora de la transcripción, en este caso, PhoR y PhoB. En *E. coli*, se han caracterizado 38 genes pertenecientes al regulón PHO (Wanner 1993). El regulón PHO interacciona con otros sistemas de regulación y participa no sólo en la inducción del sistema de transporte de Pi de alta afinidad, sino también en la inducción de las enzimas extracelulares (fosfatasas y esterases); estas enzimas hidrolizan los ésteres orgánicos de fosfato que, en general, no pueden ser transportados a través de la membrana citoplásmica (Wanner y Chang 1987). Sin embargo, en *E. coli* se han descrito al menos 6 enzimas periplásmicas con actividad fosfatasa, distintas de la fosfatasa alcalina, cuyos genes no se encuentran sujetos al regulón PHO (Wanner 1996).

1.3.2. Energetización y asimilación de Pi

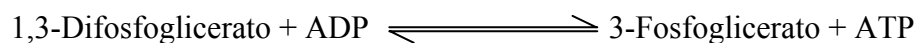
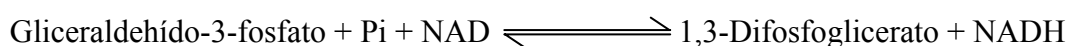
Actualmente está bien establecido que una vez transportado al interior celular, el Pi se incorpora a nucleósidos trifosfato, fundamentalmente ATP, mediante un proceso ácido-base conocido como fosforilación (esterificación del Pi como grupo γ -fosfato de los nucleótidos), que conlleva la energetización del fosfato sin que se produzcan cambios en el estado redox (Losada *et ál.* 1999). La incorporación de Pi o de un grupo fosforilo de otro compuesto de P alternativo en la molécula de ATP se produce a través de una serie de reacciones del metabolismo central:

I) fosforilación oxidativa o fotosintética (la más importante cuantitativamente), que se produce a nivel de membrana.

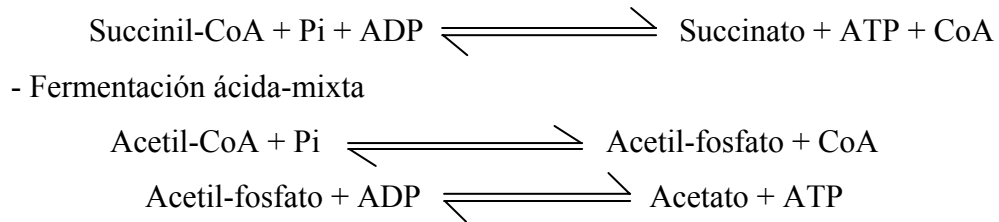


II) fosforilaciones a nivel de sustrato (catalizadas por las enzimas solubles).

- Glicólisis



- Ciclo de los ácidos tricarbónicos



La ruta metabólica predominante para la incorporación del fosfato depende de la fuente de carbono disponible, así como de las condiciones y fase de crecimiento del cultivo (Wanner 1993). El uso del isótopo radiactivo ^{32}P ha permitido establecer que, en los organismos fotosintéticos, el primer producto de la incorporación del fosfato al material celular (fotofosforilación) es un nucleósido trifosfato (principalmente ATP, después UTP) y que, a continuación, aparece secuencialmente en los nicotinamida-adenín-dinucleótidos (NADP y NAD), azúcares fosfato (G6P,PG), fosfolípidos y, finalmente, ácidos nucleicos (DNA y RNA).

1.3.3. Asimilación fotosintética de Pi: ATP- y PPI-sintasas

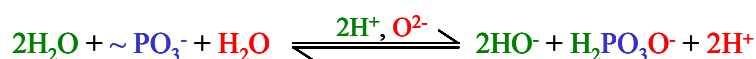
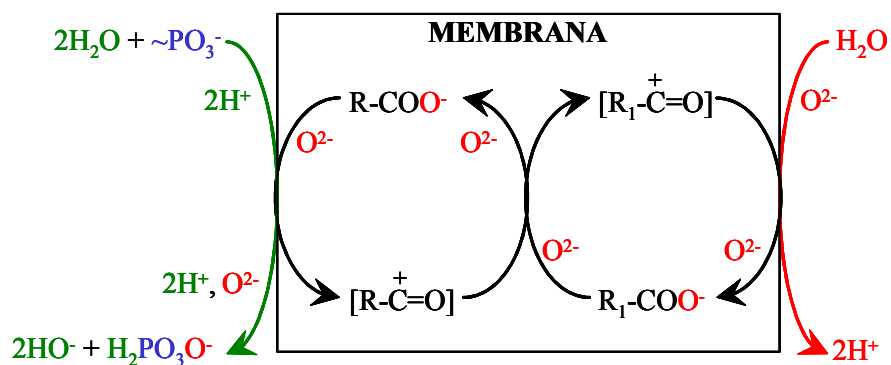
En la década de los 50, Daniel I. Arnon propuso que la síntesis del ATP se podía acoplar directamente con el flujo fotoinducido de electrones en los organismos fotosintéticos para dar cuenta de la fotofosforilación cíclica y no cíclica (Arnon 1977). Más tarde, en la década de los 60, la hipótesis quimiosmótica de Mitchell representó un gran avance para explicar el mecanismo de la fosforilación a nivel de membrana, tanto en la fotosíntesis como en la respiración, al postular que la energía liberada durante el transporte fotosintético o respiratorio de electrones se emplea para la generación de un gradiente electroquímico de protones que es utilizado por las ATP-sintasas embebidas en las membranas tilacoidales y mitocondriales para la síntesis de ATP (Mitchell 1961).

Las ATP-sintasas o F_0F_1 -ATPasas (EC 3.6.3.14) son proteínas de membrana que catalizan la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi (fosforilación) a expensas de un gradiente electroquímico de H^+ , o su hidrólisis operando en sentido inverso (Rosing *et al.* 1977, Carafoli y Scarpa 1982; Ernster 1984). Su masa molecular es del orden de 500 kDa y constan de dos partes separables: una cabeza hidrofílica, denominada F_1 , y una pieza basal hidrofóbica llamada F_0 . La mitad F_1 está integrada por cinco tipos diferentes de subunidades polipeptídicas, designadas por las letras α , β , γ , δ y ϵ , que se asocian con una

estequiometría $\alpha_3:\beta_3:\gamma:\delta:\epsilon$ para catalizar la síntesis de ATP. La mitad F_0 consiste en un grupo de proteínas integrales de membrana, que forma un canal iónico para el paso de los protones a través de la membrana. El número de subunidades que forman la mitad F_0 depende del organismo. En *E. coli* se han encontrado 3 tipos distintos de subunidades (a, b, c), que se asocian para formar un complejo $a:b_2:c_{10}$.

Además de la ATP-sintasa, algunas bacterias, como la bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodospirillum rubrum*, poseen una segunda enzima para la que, según se ha propuesto, podría fijar fosfato durante la fotosíntesis: la pirofosfatasa de membrana translocadora de protones o H^+ -PPasa (Baltscheffsky H *et ál.* 1966, Nyrén *et ál.* 1986a y 1986b). La H^+ -PPasa de *Rhodospirillum rubrum* ha sido ampliamente caracterizada en cromatóforos (vesículas cerradas donde se localiza la maquinaria fotosintética en las bacterias púrpuras) y se ha demostrado que en estas vesículas es capaz de sintetizar pirofosfato (PPi) *in vitro* a expensas del gradiente de protones generado por una ATPasa (Strid *et ál.* 1987). Por ello, algunos autores han sugerido que, en condiciones de alta iluminación, en las que el flujo de electrones de la cadena fotosintética es intenso y el gradiente de protones generado es elevado, la H^+ -PPasa podría estar funcionando como una pirofosfato sintasa, fijando de este modo el Pi incorporado en la célula (Nore *et ál.* 1990, Baltscheffsky M y Nyrén 1984). Se ha demostrado que esta enzima está constituida por un único polipéptido que posee las dos actividades catalíticas, de hidrólisis de PPi y de bombeo de protones (Nyrén *et ál.* 1991), y su estado oligomérico está aún por determinar.

Basándose, entre otras razones, en la inhibición de la ATP-sintasa por N,N'-d ciclohexilcarbodiimida (DCCD), que reacciona con los grupos carboxílicos en las regiones hidrofóbicas de las proteínas, el grupo del Prof. Manuel Losada ha venido proponiendo desde mediados de los 80, la siguiente secuencia de reacciones para explicar el mecanismo de transducción de la energía ácido-base del gradiente electroquímico de protones en energía metafosfato-ortofosfato a través de pares transductores catión acilio-anión carboxilato (Losada *et ál.* 1999):



Según esta teoría, las ATP-sintasas, así como también las llamadas P-ATPasas translocadoras de protones de la membrana plasmática de las células vegetales (Carafoli y Scarpa 1982, Scarborough 1985, Serrano R 1984, Slayman 1987), las transhidrogenasas dependientes de piridín nucleótidos de mitocondrias (Boyer 1988, Ernster 1984) y las H^+ -PPasas (Yang *et ál.* 1999, Zhen *et ál.* 1997), podrían ser realmente translocadoras de aniones óxido, que utilizan reversiblemente el par catión acilio-anión carboxilato como sistema intermediario para la transferencia de dicho anión.

El par metafosfato-ortofosfato es un sistema ácido-base muy peculiar (Fig 1.1), puesto que ambas especies son capaces de actuar secuencialmente de manera anfotérica en sentido opuesto, es decir, primero el metafosfato (PO_3^{2-}) actúa como ácido fuerte al fijar un anión óxido y desenergetizarse a ortofosfato (PO_4^{3-}). Éste, a continuación, se comporta como una base fuerte, fijando dos protones ($H_2PO_4^-$). Por otro lado, el ortofosfato protonado es una base muy débil que se energetiza a metafosfato por pérdida de un anión óxido ($H_2PO_3^{2-}$), convirtiéndose en un ácido más fuerte, que disocia sus dos protones cerrando el ciclo.

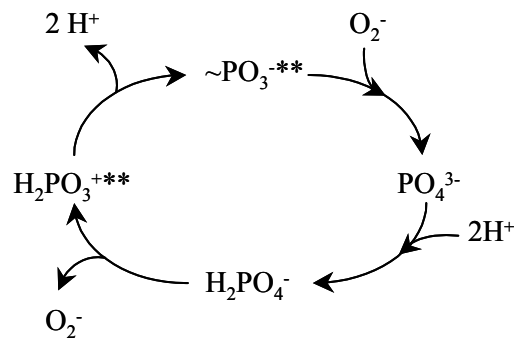


Figura 1.1: Ciclo ácido-base de energización del ortofosfato y desenergización del metafosfato. El ortofosfato (H_2PO_4^-) actúa primero como base débil, al energizarse a metafosfato ($\text{H}_2\text{PO}_3^{+**}$) por pérdida de un anión óxido (O_2^-) y, a continuación, como ácido fuerte, al disociar sus dos protones (2H^+). Análogamente, el metafosfato ($\sim\text{PO}_3^{-**}$) actúa primero como un ácido fuerte, fijando un anión óxido (O_2^-) y desenergizándose a ortofosfato (PO_4^{3-}) y, a continuación, como base muy fuerte, fijando dos protones.

El profundo conocimiento de la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante ha permitido proponer que el mecanismo de la energización del ortofosfato/desenergización del metafosfato, podría ser básicamente el mismo tanto en la fosforilación a nivel de sustrato como a nivel de membrana, puesto que en ambos procesos parece actuar el par catión acilio-anión carboxilato. El ciclo metafosfato-ortofosfato es, por tanto, uno de los ciclos más simples y fundamentales de la bioenergética (Losada *et ál.* 1999).

1.4. El enlace pirofosfato

En los organismos vivos, prácticamente todo el fósforo se encuentra como ortofosfato, bien libre (Pi), bien esterificado mediante un grupo carboxilo a una cadena hidrocarbonada (C-O-P), como en los azúcares-fosfato y los fosfolípidos, o bien unido a otro fosfato por un puente pirofosfato (R-P-O-P-R'), como en los polifosfatos y los nucleósidos di- y tri-fosfato. Una característica relevante del enlace éster fosfato -bien como pirofosfato o asociado a un grupo carboxilo o enol- es la de poseer una relativa estabilidad cinética a temperatura y pH fisiológicos y una elevada energía libre de hidrólisis. La principal característica de los compuestos de fosfato ricos en energía radica precisamente en la estabilidad cinética que el fosfato les confiere, protegiéndolos de su

labilidad en solución acuosa y evitando, en consecuencia, la rápida descomposición a que naturalmente tienden por su inestabilidad energética. Así, aunque los compuestos ricos en energía anhídrido acético, acetil-fosfato y PPi tienen una energía libre de hidrólisis similar, su estabilidad cinética en disolución acuosa aumenta enormemente por la presencia de Pi en sus moléculas, siendo de segundos para el anhídrido acético, horas para el acetil-fosfato y años para el PPi (Losada *et ál.* 1999). La energía almacenada en el fosfato energizado (~P) puede ser utilizada por la célula para múltiples funciones fisiológicas, entre ellas para dirigir los procesos anabólicos (Lahti *et ál.* 1988).

1.5. Los polifosfatos (poliP)

1.5.1. Generalidades

Los polímeros inorgánicos de Pi, también llamados polifosfatos (poliP), están formados por cadenas de grupos metafosfato, cuyo número oscila entre tres y varios cientos de residuos de pirofosfato (P-O-P) unidos por enlaces fosfoanhídrido ricos en energía. Los poliP, que industrialmente se obtienen por deshidratación del ortofosfato a altas temperaturas, están presentes en organismos muy diversos -bacterias, hongos, protozoos, plantas y animales- y son sintetizados por enzimas específicas (Kulaev 1979, Wood y Clark 1988, Kornberg 1994). Los poliP existen en muchos organismos como grandes masas cristalinas (gránulos metacromáticos) de cadenas largas (cientos de residuos de longitud) muy insolubles, y presumiblemente también como agregados de menor tamaño: una mezcla de poliP de alto peso molecular y de moléculas más pequeñas (de 4 a 20 residuos de metafosfato) en solución. Los poliP son abundantes en muchos organismos, especialmente en la vacuola de la levadura donde pueden representar entre un 10 y un 20% del peso seco (Harold 1967, Kulaev 1987, Wood y Clark 1988) y en los acidocalcisomas de diversos parásitos (vesículas ácidas que sirven de reservorios de calcio) [Docampo y Moreno 2001]. En la actualidad se atribuyen varias funciones a los polifosfatos:

- Sustitutos del ATP como fuente de energía: la presencia de enlaces fosfoanhídrido ricos en energía sugiere un papel en el metabolismo energético. Estos polímeros se pueden considerar sustratos susceptibles de reaccionar con AMP, ADP, glucosa o agua en reacciones catalizadas respectivamente por la polifosfato-ADP fosfotransferasa (polifosfato quinasa, PPK), polifosfato glucoquinasa y endo- o exopolifosfatasas.

- Reserva de Pi: las cadenas de poliP pueden servir como una reserva de fosfato fácilmente disponible para ser usada en condiciones de deficiencia en P (Kornberg 1957, Kulaev 1979, Gillies *et ál.* 1981, Kulaev y Vagavov 1983). Este polímero forma agregados con cationes multivalentes que ofrecen una gran ventaja sobre el Pi libre por ser osmóticamente inertes. Se sabe que las levaduras disminuyen la cantidad de poliP en situaciones de estrés de fosfato y acumulan grandes cantidades cuando son transferidas a un medio rico en fosfato (Kulaev y Vagavov 1983). Algunos protozoos parásitos humanos poseen vacuolas, denominadas acidocalcisomas, donde acumulan grandes cantidades de poliP, que pueden ser movilizadas en situaciones de estrés (Docampo y Moreno 2001).

- Agente quelante de iones metálicos: como un intercambiador polianiónico, el poliP es capaz de quelar Ca^{2+} y otros cationes divalentes y de esta forma actuar como un regulador metabólico. El poliP presente en las vacuolas de las levaduras se ha propuesto como un regulador de la concentración de Ca^{2+} celular (Dunn *et ál.* 1994). En *E. coli* también parece estar involucrado en la tolerancia a metales pesados como Cd^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} y Co^{2+} (Keasling y Hupf 1996).

- Regulador de la supervivencia ante el estrés: dado que es un polianión al igual que los ácidos nucleicos, se ha propuesto un papel regulador de el poliP por su capacidad de interaccionar con el material nuclear, dado que puede afectar a la actividad de proteínas básicas como las histonas que interaccionan con el DNA, o con los dominios básicos de proteínas como las polimerasas (Offenbacher y Kline 1984).

- Papel prebiótico de los polifosfatos inorgánicos (PPi y poliP): aunque se ha postulado que el RNA precedió al DNA y a las proteínas en la evolución prebiótica, parece probable que los polifosfatos inorgánicos aparecieran en la tierra antes incluso que todos estos biopolímeros, dado que son productos de la deshidratación y condensación del Pi a alta temperatura, procesos químicos que se producen naturalmente por la

actividad geotérmica (Yamagata *et ál.* 1991). Se ha propuesto que los enlaces ricos en energía y el Pi presente en las cadenas de poliP pudieron ser en la Tierra primitiva fuentes posibles de nucleósidos di- y trifosfato, componentes imprescindibles del DNA y el RNA (Waehneltd y Fox 1967, Kulaev y Skryabin 1974). El papel del pirofosfato y otros poliP, también presentes en las arqueas, como compuestos que precedieron al ATP en una bioenergética primordial está ahora comenzando a ser estudiado en profundidad ya que una búsqueda sistemática entre organismos con caracteres ancestrales podría revelar la presencia de enzimas responsables de reacciones de biosíntesis basadas en los polímeros inorgánicos del Pi.

1.5.2. El pirofosfato inorgánico (PPi)

1.5.2.1. Características generales

De todos los poliP existentes, el de menor tamaño es el pirofosfato inorgánico (difosfato, PPi). El pirofosfato es una molécula sencilla constituida por dos grupos metafosfato unidos por un puente de oxígeno (o dos de ortofosfato unidos por un enlace fosfoanhídrido) y es el polímero de fosfato más pequeño. La estructura P-O-P que la caracteriza, conocida como puente pirofosfato, constituye el grupo químico en el que se almacena la energía de enlace fundamental para la energética celular. El PPi es una molécula rica en energía ($\Delta G^{\circ} = -22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ó $-0,22 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) que industrialmente se obtiene por deshidratación del ortofosfato por calor, de ahí su nombre. Su potencial químico es de hecho muy similar al del ATP ($\Delta G^{\circ} = -31 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ó $-0,31 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) por lo que en teoría podrían llevar a cabo funciones similares en bioenergética. Un gran número de reacciones biosintéticas (p.e., las polimerizaciones de aminoácidos y nucleótidos para dar proteínas y ácidos nucleicos, respectivamente) hidrolizan nucleósidos trifosfato generando PPi. En consecuencia, se ha considerado durante mucho tiempo a este compuesto como un producto de desecho del anabolismo celular cuya hidrólisis posterior permite que las reacciones anabólicas procedan eficientemente en la dirección correcta (Lahti *et ál.* 1988).

Además de haber sido propuesto como un predecesor del ATP como moneda energética en las primeras etapas de la evolución (Lipmann 1965, Baltscheffsky H 1993),

el pirofosfato parece regular el equilibrio entre la síntesis de sacarosa y de almidón en plantas (Stitt 1998). Ciertos organismos como *Entamoeba histolytica* o *Propionibacterium shermanii* contienen enzimas (p.e., quinasas implicadas en la glicólisis) que pueden usar PPi como fuente de energía y fosfato, en lugar del ATP (Reeves y Guthrie 1975). En *E. coli*, se ha sugerido que este metabolito está implicado en la regulación del transporte de hierro al interior celular y en la inhibición de la síntesis de glucógeno (Preiss y Greenberger 1983, Perotte-Piquemal *et ál.* 1999). En humanos y otros animales, donde no se han encontrado enzimas dependientes de PPi, la variación en los niveles extracelulares de este metabolito se ha asociado con distintas enfermedades y desórdenes metabólicos. En estos organismos, los niveles de fosfato intracelular estimulan la actividad de las ATPasas (Jault *et ál.* 1994, Kalashnikova *et ál.* 1988), inhiben algunas actividades enzimáticas (Hakki y Sitaramayya 1990), afectan a la absorción de hierro (Coward *et ál.* 1986) y tienen efectos no bien caracterizados sobre la replicación del DNA, la síntesis de proteínas y la liberación de calcio mitocondrial (Terkeltaub 2001). Por otra parte, como se ha expuesto antes, el PPi también podría formarse durante la fotosíntesis y la fosforilación oxidativa en ciertas bacterias (Baltscheffsky H 1966, Nishikawa 1973), acumulándose en “gránulos de reserva” (Nyrén y Strid 1991). Recientemente, se ha propuesto que, en plantas como el maíz, la fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa pirofosfato dependiente podría sintetizar este metabolito para mantener un nivel adecuado en el citoplasma, que permita obtener energía suficiente para el bombeo de protones al interior de la vacuola (ver apartado 1.6.2.3).

1.5.2.2. Contenido celular de pirofosfato y variación de la energía de hidrólisis

Las primeras medidas de la concentración de PPi en células se llevaron a cabo en los años ochenta. El descubrimiento de enzimas dependientes de pirofosfato como la UDP-Glucosa pirofosforilasa (EC 2.7.7.9) y la fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa pirofosfato dependiente (EC 2.7.1.90) en el citosol, así como las primeras pruebas de la existencia de pirofosfatasas de membrana capaces de bombear protones de forma acoplada a la hidrólisis de PPi, despertaron dudas sobre la hipótesis propuesta por Kornberg y aceptada hasta el momento, de que todo el PPi producido en el citosol era hidrolizado por la pirofosfatasas solubles, con el fin de desplazar el equilibrio de muchas

reacciones anabólicas (Kornberg 1957). Para dilucidar si el PPi puede actuar *in vivo* como una fuente de energía para las reacciones catalizadas por las enzimas anteriores, era necesario realizar medidas de las concentraciones de PPi en el citosol en las condiciones metabólicas en que operan fisiológicamente dichas enzimas. En 1984, dos artículos casi simultáneos se ocuparon de este problema. Edwards *et ál.* (1984) realizaron estimaciones de la concentración de PPi en extractos sin fraccionar de distintos tejidos de la planta *Pisum sativum* L., y encontraron cantidades de $9,4 \pm 1,19$ y $8,9 \pm 0,47$ nmol por g de peso fresco en cotiledones en fase de desarrollo y en raíces apicales, respectivamente. Asumiendo que todo el PPi celular se encontrara en el citosol y que el volumen de éste fuera aproximadamente el 10% del volumen celular total, la concentración de PPi en ambos tejidos estaría en torno a 90 μ M. Por otro lado, Smyth y Black (1984) realizaron estimaciones de los contenidos tanto en PPi como en ATP de distintos tejidos de *Pisum sativum* L. y de *Zea mays* L. En plántulas de guisante de 4 días, las cantidades de PPi encontradas fueron de 16, 14 y 9 nmol por g de peso fresco en tallos, raíces y cotiledones, respectivamente, mientras las de ATP fueron 113, 98 y 249 nmol por g de peso fresco. En plántulas de maíz de 6 días, los tallos, raíces y escutelos contenían, respectivamente, 39, 23 y 15 nmol de PPi por g de peso fresco y 158, 33 y 391 nmol ATP por g de peso fresco. Ambos grupos propusieron de acuerdo con los resultados encontrados, que en el citosol de las células de plantas existían cantidades suficientes de PPi como para que este metabolito pudiera actuar como donador de energía para las distintas enzimas dependientes de pirofosfato. Weiner *et ál.* (1987) llevaron a cabo un estudio sistemático en distintos orgánulos celulares de hojas de espinaca, encontrando que el 90% del PPi celular se encuentra localizado en el citosol. La concentración citosólica de PPi se estimó en 0,2-0,3 mM. Las concentraciones milimolares de PPi y Pi fueron determinadas por RMN en distintas condiciones de iluminación del tejido fotosintético, lo que permitió observar que así como la concentración de Pi se reducía de 25 a 10 mM cuando la planta pasaba de la oscuridad a la luz, en el caso del PPi no se producía ninguna variación. La energía libre de hidrólisis (ΔG) del PPi, a las concentraciones celulares estimadas de ATP, ADP, PPi y Pi, se calculó entre -14 y -20 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,14$ y $-0,20$ $\text{eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$, respectivamente), y la del ATP en torno a -50 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,50$ $\text{eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$). Este valor de energía libre de hidrólisis para el PPi sería suficiente para producir *in vivo* una translocación electrogénica de protones (Weiner *et ál.* 1987). Dancer y ap Rees (1989)

estudiaron las variaciones en los contenidos de PPi y ATP en las inflorescencias de *Arum maculatum* y en raíces apicales de *Pisum sativum* cuando las plantas eran sometidas a anoxia o eran tratadas con 2,4-dinitrofenol, un desacoplante de la cadena respiratoria. Aunque ambos procesos provocaron grandes variaciones en la tasa respiratoria y también grandes disminuciones en la cantidad de ATP en las células, el contenido de PPi permaneció inalterado.

En la misma época, se llevaron a cabo también medidas en el contenido en PPi del alga *Chara corallina*, encontrándose que en este organismo fotosintético el PPi se encuentra en su mayoría acumulado en el citosol, donde presenta una concentración en torno a 190 μM , frente a los valores de 2 y 1 μM encontrados para la vacuola y el cloroplasto, respectivamente. El ΔG para el PPi en el citoplasma se calculó en torno a $-19 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,19 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) (Takeshige y Tazawa 1989). Concentraciones de PPi hasta 43 mM se han medido en la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* en condiciones de alta iluminación (Salih y Nyrén 1990).

En organismos no fotosintéticos como el hígado de rata, la concentración de PPi se ha estimado en torno a 6 μM y la energía de hidrólisis de este metabolito estaría en torno a $-17 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,17 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$). En la ameba parásita *Entamoeba histolytica*, que contiene una concentración 200 μM de PPi en el citosol, el ΔG calculado es de $-25,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,25 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) (Reeves 1976). En *E. coli*, la concentración de PPi está en torno a 500 μM y parece ser independiente del nivel de actividad pirofosfatasa (Kukko-Kalske *et ál.* 1989).

Al contrario de lo que ocurre para el ATP, la energía libre de hidrólisis del PPi se hace más negativa al disminuir el pH. Así, Davies *et ál.* (1992), mediante la medida experimental de constantes de equilibrio de la reacción de hidrólisis a las concentraciones estimadas para ATP, ADP, PPi, Pi, Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} en el citoplasma, realizaron un estudio sistemático de la variación del valor de ΔG para ATP y PPi al disminuir el pH. Estas medidas se hicieron tanto en condiciones que simulaban el estado respiratorio normal de la célula (alta relación de concentraciones $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$), como en condiciones de estrés anaeróbico ($[\text{ADP}]>[\text{ATP}]$). Los valores estimados de ΔG a pH 7,3 para el ATP fueron de $-50,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,51 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) y $-42,9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,43 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$), en condiciones normales y en anaerobiosis, respectivamente. Por su parte, la hidrólisis del PPi liberaría, a este pH, $27,3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($0,28 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) en ambas condiciones. La

disminución del pH del medio de reacción se tradujo en un ligero aumento en el ΔG_{ATP} hasta ser de $-49,2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,49 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) y $-40,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,41 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$), en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente, a pH 6,0. El ΔG_{PPi} se calculó, sin embargo, en $-35,8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,36 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) en las dos condiciones, lo que suponía una variación de energía libre de $-8,5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($-0,09 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}$) para el PPI, al producirse una disminución de pH de algo más de una unidad. Según estos datos, la hidrólisis del PPI sería más favorable en condiciones de pH citoplásmico bajo. Esta hipótesis también había sido propuesta por de Meis (1984), que calculó una variación de la constante de equilibrio de hidrólisis desde algo más de 200 M a pH 7 hasta 4000 M a pH 6.

1.6. Enzimas que hidrolizan PPI: pirofosfatasas solubles y de membrana

Las enzimas encargadas de hidrolizar el pirofosfato celular, regenerando así Pi, se denominan pirofosfatasas inorgánicas y pueden dividirse en dos grandes grupos en función de su estructura y actividad catalítica: pirofosfatasas solubles y pirofosfatasas de membrana translocadoras de protones. Ambas se engloban bajo la misma identificación, EC 3.6.1.1, a pesar de no ser enzimas homólogas, aunque poseen motivos similares en las secuencias de aminoácidos correspondientes al sitio catalítico (Rea y Poole 1993). La necesidad de que sean identificadas como proteínas con actividades catalíticas distintas ha sido discutida recientemente (Serrano A 2001).

1.6.1. Pirofosfatasas solubles

Las pirofosfatasas solubles (sPPasas, PPI hidrolasas) catalizan eficientemente la hidrólisis de PPI liberando calor. Debido a la necesidad de hidrolizar el PPI producido en las reacciones anabólicas, con el fin de desplazar dichas reacciones y reciclar la reserva de Pi intracelular, las sPPasas son enzimas ubicuas, presentes en todos los organismos vivos conocidos (Kukko-Kalse y Heinonen 1985, Chen *et ál.* 1990). Así, estas enzimas se han identificado en organismos procarióticos, en orgánulos celulares de diversos eucariotas y en el citosol de las células animales y de hongos. Algunas de estas sPPasas poseen un dominio que les permite anclarse a la membrana interna de los orgánulos en que se

encuentran (cloroplasto, mitocondria) (Baykov *et ál.* 1993b, Lundin *et ál.* 1992). Existen dos grandes familias de sPPasas (Cooperman *et ál.* 1992; Shintani *et ál.* 1998). La familia I abarca la mayoría de las sPPasas conocidas y poseen el motivo PROSITE que típicamente las ha venido definiendo (DXDPXD); estas enzimas tienen un sitio activo estructuralmente muy conservado (Cooperman *et ál.* 1992) y se encuentran en organismos procariotas (bacterias y arqueas), tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas y en el citosol de animales y hongos. Curiosamente, las de tejidos no fotosintéticos de plantas presentan más similitudes con las bacterianas que con las de los otros organismos eucarióticos. Las sPPasas de los plástidos fotosintéticos se han caracterizado recientemente en nuestro grupo (Gómez-García, Tesis Doctoral) y presentan especial interés dado que los tejidos fotosintéticos no presentan sPPasas citosólicas. Las enzimas de la familia I presentan un pH óptimo alcalino, entre 8 y 9, son dependientes de Mg^{2+} como cofactor y activador- de hecho, el sustrato es realmente un complejo $MgPPi$ - y presentan una especificidad absoluta por PPi (Salminen *et ál.* 1995). Una interesante excepción es la enzima del protozoo parásito *Leishmania major*, recientemente descrita por nuestro grupo como una sPPasa primitiva de la familia I y la única Ca^{2+} -dependiente (Gómez-García *et ál.* 2004). Un segundo grupo o familia II de sPPasas, que presentan similitud con algunas exopolifosfatasa, ha sido recientemente establecido (Shintani *et ál.* 1998) e incluye la sPPasa de *Bacillus subtilis* así como las sPPasas de algunas estirpes bacterianas gram positivas y arqueas. La sPPasa de *B. subtilis* se activa con Mn^{2+} y Co^{2+} , pero no con Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} o Ni^{2+} . Las dos familias no presentan una relación evidente, ni en su estructura ni en su secuencia de aminoácidos, pero la disposición espacial de los 13 residuos catalíticos esenciales para la sPPasas de la familia I se encuentra conservada en las enzimas de la familia II (Gómez-García *et ál.* 2001). En consecuencia, actualmente se consideran un ejemplo de evolución convergente durante el proceso de sustitución funcional de sPPasas arquetípicas ancestrales ocurrido en la evolución de algunos procariotas (Gómez-García y Serrano 2002).

1.6.2. Pirofosfatasa de membrana translocadora de protones

1.6.2.1. Características generales

Diversas investigaciones han demostrado que en plantas, bacterias y protistas muy diversos, el PPi puede usarse en muchas reacciones en lugar del ATP. En estos organismos se ha encontrado una PPasa translocadora de protones (H^+ -PPasas, o V-PPasas cuando se localizan en el tonoplasto), una proteína integral de membrana no relacionada directamente con la sPPasa, capaz de aprovechar la energía del enlace PPi para la bioenergética celular acoplando la hidrólisis de este metabolito a la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana en la que se encuentran (Baltscheffsky M *et ál.* 1999, García-Donas *et ál.* 1998, Rea y Poole 1993). Estas proteínas se describieron por primera vez en los cromatóforos de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky M 1967) y posteriormente fueron identificadas actividades de hidrólisis de PPi en el tonoplasto de diversas células vegetales. Hasta el momento, se han descrito H^+ -PPasas en diferentes grupos de eubacterias y arqueas, plantas y diversos protistas fotosintéticos y no fotosintéticos, pero hasta el momento no se han encontrado en membranas de células animales o de hongos, aunque sí en sus protistas parásitos (Rea y Poole 1993, Baltscheffsky M *et ál.* 1999, Maeshima 2000, Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002, McIntosh y Vaidya 2002). Todas las H^+ -PPasas conocidas presentan actividad de hidrólisis de PPi *in vitro*, su perfil hidrofóbico demuestra que poseen entre 14 y 16 segmentos transmembranales y su sustrato es un complejo MgPPi. Según requieran o no potasio para desarrollar su actividad máxima, pueden dividirse en dos grandes subgrupos: independientes de K^+ y estimuladas por K^+ .

1.6.2.2. Las H^+ -PPasas de los organismos procariotas: la H^+ -PPasa de *Rhodospirillum rubrum*

La primera H^+ -PPasa descrita en la bibliografía y la mejor caracterizada es la de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky M 1967). Esta pirofosfatasa se halla asociada a la membrana de los cromatóforos, vesículas cerradas originadas por invaginación de la membrana plasmática a las que se encuentra asociada toda la

maquinaria fotosintética, incluida la F_0F_1 ATP-sintasa, encargada de sintetizar ATP a expensas de la disipación del gradiente electroquímico de protones generado por el flujo fotosintético de electrones.

La H^+ -PPasa de *R. rubrum* ha sido solubilizada, purificada y caracterizada a partir de los cromatóforos, donde constituye un 1% de la proteína total (Randahl 1979, Shakov *et ál.* 1982, Nyrén *et ál.* 1984 y 1991). La enzima análoga de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris* ha sido también solubilizada y caracterizada después de ser sometida a una purificación parcial (Schwarm *et ál.* 1986). La H^+ -PPasa también se ha caracterizado bioquímicamente en preparaciones de membrana plasmática de la bacteria fermentativa degradadora de benzoato *Syntrophus gentianae* (Schocke y Schink 1998). Por otra parte, la expresión heteróloga en levadura ha permitido caracterizar bioquímicamente la H^+ -PPasa independiente de potasio de la arquea *Pyrobaculum aerophilum* (Drozdowicz *et ál.* 1999). Estas proteínas, al igual que las F_0F_1 -ATPasas, son sensibles a inhibición por DCCD.

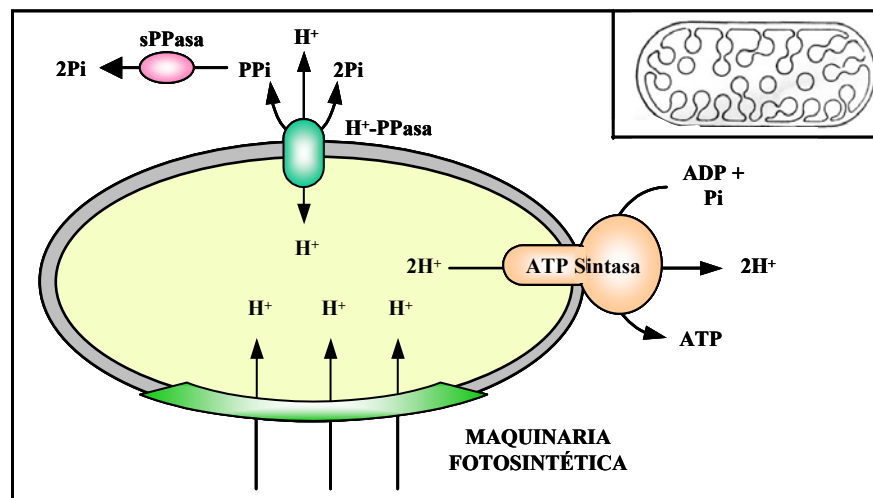


Figura 1.2: Los cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum*. Esquina superior derecha: esquema de una célula de *R. Rubrum*, mostrando las invaginaciones de la membrana interna que forman los cromatóforos. En estas vesículas cerradas está presente toda la maquinaria fotosintética, incluida la F_0F_1 ATP-sintasa. Asociada a la membrana se encuentra también la H^+ -PPasa (PPi-sintetasa), que competiría por el PPi con la sPPasa presente en el citoplasma.

La proteína aislada de *R.rubrum* consiste en un único polipéptido con una masa molecular aparente de 56 kDa, capaz de llevar a cabo tanto la actividad hidrolítica de PPi como la actividad translocadora de protones, según se demuestra por reconstitución en liposomas (Shakov *et ál.* 1982, Nyrén *et ál.* 1984 y 1991). Su masa molecular teórica, deducida de la secuencia del gen, es de 71,6 kDa y algunos datos apuntan a que podría actuar como un dímero *in vivo*. Esta proteína posee un marcado carácter hidrofóbico, por lo que requiere la presencia de fosfolípidos o detergentes para ser activa una vez purificada. De los diferentes fosfolípidos probados, la cardiolipina es el activador más potente, aumentando de actividad hasta 10 veces. La actividad específica de la enzima purificada y reconstituida es de 20 $\mu\text{mol PPi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ a pH 7,5 y 20°C (Nyrén *et ál.* 1991). Mediante medidas cinéticas en cromatóforos aislados, Sosa y Celis (1995) han propuesto una estequiometría H^+/PPi cercana a 2.

Se ha demostrado que esta H^+ -PPasa es completamente reversible *in vitro*, pudiendo tanto hidrolizar como sintetizar PPi (Strid *et ál.* 1987); ésto podría ser una característica general de las H^+ -PPasas procarióticas, dado que también se ha demostrado una actividad de síntesis de PPi para la enzima de *Syntropus gentianae*. De este modo, se han propuesto diferentes funciones fisiológicas para la H^+ -PPasa en *Rhodospirillum rubrum*. Por una parte, Baltscheffsky y Baltscheffsky (1992) han propuesto que esta enzima actuaría *in vivo* como una PPi-sintasa, de manera análoga a la ATP-sintasa, ya que se ha demostrado que, cuando el flujo no cíclico de electrones de la cadena fotosintética se inhibe con antomicina, el flujo cíclico de electrones es suficiente para mantener una cierta síntesis de PPi (Nyrén *et ál.* 1986b). Por otra parte, también se ha sugerido que esta H^+ -PPasa podría hidrolizar o sintetizar PPi *in vivo* según los requerimientos celulares en cada instante (Nyrén y Strid 1991). De este modo, en oscuridad o en condiciones de baja intensidad de luz en que el flujo de electrones no es abundante, la H^+ -PPasa estaría bombeando protones al interior del cromatóforo, contribuyendo así a la síntesis de ATP, mientras que en condiciones de alta intensidad de luz, en que existe un bombeo abundante de protones acoplado a la cadena de transporte de electrones de la maquinaria fotosintética, la proteína estaría sintetizando PPi, que se acumularía en “gránulos de reserva” para ser utilizado en condiciones de deficiencia energética.

Además de en *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodopseudomonas palustris*, también se ha demostrado la presencia de actividad PPasa asociada a membrana en otras bacterias fotosintéticas, como *Chromatium vinosum* (Knaff *et ál.* 1979), *Rhodobacter sphaeroides* (Sherman y Clayton 1972) y *Rhodopseudomonas viridis* (Jones y Saunders 1972).

En año 2001 se publicó la caracterización de la primera H⁺-PPasa procariótica dependiente de potasio, la de la bacteria hipertermofílica *Thermotoga maritima* (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001); hasta entonces todas las PPasas de membrana procarióticas caracterizadas presentaban una actividad independiente de la presencia de este ion (Randahl 1979, Schwarm *et ál.* 1986, Drozdowicz 1999), por lo que durante años se consideró que esta característica era un rasgo distintivo de estas proteínas frente a sus homólogas eucarióticas. Más recientemente, y mediante análisis de comparación de secuencias con otras H⁺-PPasas, se ha sugerido la existencia de una H⁺-PPasa potasio-dependiente en la arquea *Methanosarcina mazei*. Este organismo presentaría dos H⁺-PPasas que tendrían distintos requerimientos de potasio para su actividad (Bäumer 2002), en contraste con *Pyrobaculum aerophilum*, para la que también se ha sugerido la existencia de dos PPasas de membrana, pero ambas independientes de potasio (McIntosh *et ál.* 2001). En *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* se ha descrito también una H⁺-PPasa estimulada por K⁺ y, mediante mutagénesis dirigida, se ha identificado un residuo de alanina que parece estar implicado en esta propiedad catalítica (Belogurov y Lahti 2002).

1.6.2.3. Las H⁺-PPasas de los organismos eucarióticos fotosintéticos

En las células fotosintéticas, las sPPasas parecen encontrarse limitadas a los plástidos (Weiner 1987, Gómez-García Tesis doctoral), de tal modo que en estas células las H⁺-PPasas junto a otras enzimas citosólicas que usan pirofosfato, como la PFK-PPi (fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa pirofosfato dependiente) o la UDP-glucosa pirofosforilasa, serían las encargadas de mantener los niveles de PPi en el citosol (Rea *et ál.* 1992b, Costa dos Santos *et ál.* 2003). De hecho, estas enzimas parecen ser ubicuas en plantas, ya que se han descrito, hasta el momento, actividades de bombeo de protones asociadas a hidrólisis de PPi en membranas de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas, C3, C4 y CAM, y en muy diversos tejidos y órganos, como en hojas, raíces, cotiledones,

coleoptilos, hipocotilos, plántulas, el tejido de la aleurona, inflorescencias, frutos, polen y el floema (Karlsson 1975, Walker y Leigh 1981, Chanson *et ál.* 1985, Bremberger y Lüttge 1992, Maeshima y Yoshida 1989, Long *et ál.* 1995, Millner y Hall 1995, Swanson y Jones 1996, Müller *et ál.* 1996, Shirakate *et ál.* 1997, Smart *et ál.* 1998, Suzuki *et ál.* 1999, Ratajczak *et ál.* 1999, Marsh *et ál.* 2000, Wang *et ál.* 2001, Terrier *et ál.* 2001, Mitsuda *et ál.* 2001b, Langhans *et ál.* 2001). También se han descrito en algas y microalgas, como *Acetabularia acetabulum*, *Chara corallina*, *Chlamydomonas reinhardtii* o *Chlorococcum littorale* (Ikeda *et ál.* 1991, Nakanishi *et ál.* 1999, Robinson *et ál.* 1998, Sasaki *et ál.* 1998). La estructura primaria de las H⁺-PPasas de los eucariotas fotosintéticos no presenta similitud con las sPPasas, excepto en cierta medida con el pequeño dominio que corresponde al bucle hidrofílico del sitio catalítico (Rea *et ál.* 1992b).

Las H⁺-PPasas de organismos fotosintéticos más estudiadas han sido, por su posible interés agrobiológico, las de plantas. La actividad PPasa asociada a membrana se describió por primera vez en plantas en los años 70 (Karlsson 75) y en la década de los 80 se describió su asociación con la membrana vacuolar o tonoplasto (Rea y Poole 1985, Chanson *et ál.* 1985). Aunque la mayor parte de las H⁺-PPasas de plantas descritas se han hallado asociadas al tonoplasto (y por ello denominadas genéricamente V-PPasas) (Maeshima 2000), se han descubierto también asociadas a membranas del Golgi (Chanson y Pilet 1987, Mitsuda *et ál.* 2001a) y a la membrana plasmática (Petel y Gendraud 1989, Williams *et ál.* 1990, Robinson *et ál.* 1996, Langhans *et ál.* 2001). Algunos autores han sugerido que las H⁺-PPasas localizadas en la membrana plasmática no son activas, sino que se encuentran allí en una etapa de transición desde/hacia la membrana vacuolar (Robinson *et ál.* 1996 y 1998).

Debido a que el descubrimiento de H⁺-PPasas en plantas no asociadas a la membrana vacuolar se ha producido muy recientemente (Mitsuda *et ál.* 2001a), la mayor parte de la información existente en la bibliografía respecto a las características, función fisiológica y regulación de estas proteínas en dichos organismos se refiere a las V-PPasas.

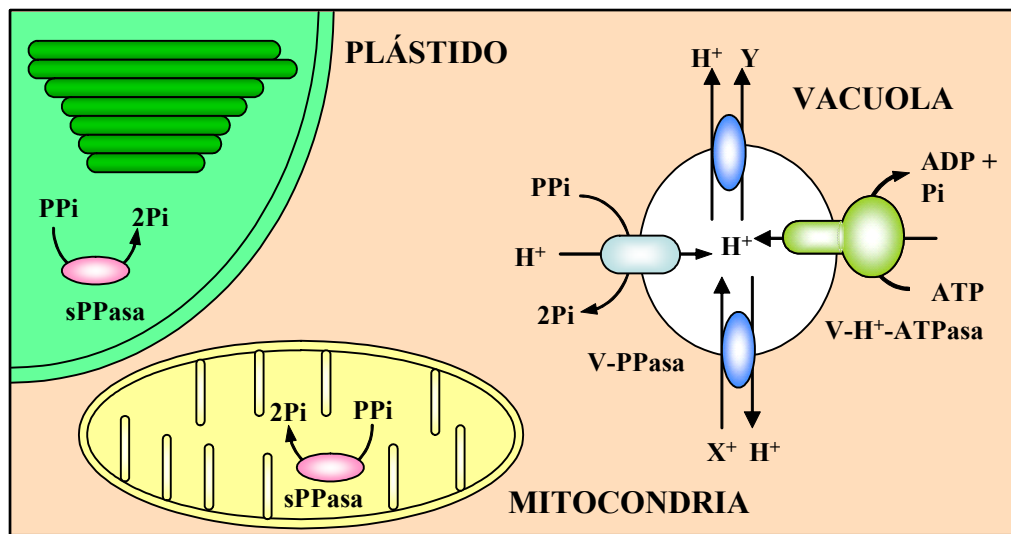


Figura 1.3: La V-PPasa de los organismos eucarióticos fotosintéticos. En los tejidos fotosintéticos, las pirofosfatasa solubles se encuentran en el interior de los plástidos y las mitocondrias. La pirofosfatasa translocadora de protones localizada en el tonoplasto (V-PPasa) sería la encargada de hidrolizar el PPi producido en el citoplasma. En la membrana vacuolar, esta V-PPasa coexiste con otra proteína que bombea protones, la V-H⁺-ATPasa. Los gradientes de protón generados por ambas bombas se usan para el simporte y antiporte de distintos solutos desde la vacuola. Además de la V-PPasa, algunos tejidos pueden presentar H⁺-PPasas asociadas a las membranas de otras estructuras celulares.

Diversos autores han demostrado que las V-PPasas conviven en el tonoplasto con la otra bomba de protones de la vacuola, la V-H⁺-ATPasa (EC 3.6.1.3), que utiliza la hidrólisis del ATP como fuente de energía para la acidificación vacuolar (esta proteína se describe en más detalle en el apartado 1.7). Se ha demostrado que el gradiente de protones producido por la V-PPasa es de igual magnitud o incluso mayor que el producido por la V-H⁺-ATPasa. Ambas contribuyen a generar la acidificación del compartimento vacuolar y en la mayor parte de los casos, el gradiente de pH producido por ellas no es aditivo (Rea y Poole 1993). En frutos de *Vitis vinifera*, sin embargo, la acidificación de la vacuola por la acción simultánea de ambas bombas de protones es mayor que la producida por cada una de ellas por separado (Terrier *et ál.* 1998). En general, no parece existir ningún tipo de interacción directa entre las dos bombas de protones vacuolares; sin embargo, en *Kalanchoë blossfeldiana*, Fischer-Schliebs *et ál.* (1997) observaron que el transporte de protones por parte de la V-H⁺-ATPasa en membranas vacuolares aisladas de esta planta era estimulado cuando dichas vesículas era pre-energetizadas mediante la actividad de una V-PPasa. Este efecto no era recíproco: la pre-energetización de las vesículas mediante

el bombeo de protón de la V-H⁺-ATPasa no ejercía ningún efecto sobre la actividad V-PPasa. De este modo, los autores propusieron que la V-PPasa modula la acción de la V-H⁺-ATPasa, posiblemente mediante la interacción de la primera con la subunidad A de la ATPasa. También se ha demostrado en membranas de *Acer pseudoplatanus* que la inhibición específica de la V-H⁺-ATPasa produce un efecto negativo sobre la actividad de la V-PPasa, lo que parece indicar la existencia de algún tipo de interacción entre ambas proteínas (Fraichard *et ál.* 1994).

Características bioquímicas. Las primeras purificaciones de V-PPasas se publicaron en 1989 (Maeshima y Yoshida 1989, Sarafian y Poole 1989, Britten *et ál.* 1989). El uso de tejidos jóvenes fue fundamental para llevar a cabo dicha purificación, ya que la proteína se encuentra en menor proporción en los tejidos maduros. La V-PPasa de plantas consiste en un único polipéptido de 67 ó 73 kDa, que una vez reconstituido en liposomas es capaz de catalizar tanto la actividad hidrolítica como la de bombeo de protones (Britten *et ál.* 1992, Kim *et ál.* 1994b, Sato *et ál.* 1994). La mayor parte de las H⁺-PPasas y V-PPasas de plantas son dependientes de potasio; sin embargo, recientemente se ha caracterizado bioquímicamente una isoforma independiente de potasio en *Arabidopsis thaliana* (Drozdowicz *et ál.* 2000).

Diversos autores han propuesto que la estequiometría H⁺/PPi de la V-PPasa es de 1 y el pH generado en el interior de la vacuola en el estado estacionario, 3,2 (Schmidt y Briskin 1993a, Maeshima *et ál.* 1994a). El sustrato de la enzima, al igual que para la sPPasa, es un complejo MgPPi (Rea y Poole 1993, Leigh *et ál.* 1992, Baykov *et ál.* 1993, Gordon-Weeks *et ál.* 1996) y la proteína purificada requiere fosfolípidos para su actividad catalítica (Maeshima y Yoshida 1989, Sarafian y Poole 1989, Britten *et ál.* 1989). Los valores típicos de la actividad específica se encuentran entre 0,2 y 1,6 $\mu\text{mol PPi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ en preparaciones purificadas de membrana vacuolar (Maeshima y Yoshida 1989, Sarafian y Poole 1989, Britten *et ál.* 1989, Becker *et ál.* 1995, Schmidt y Briskin 1993a, Maeshima *et ál.* 1994b, Ikeda *et ál.* 1991) y entre 3 y 8,5 $\mu\text{mol PPi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para la proteína purificada reconstituida (Becker *et ál.* 1995). El análisis cinético ha demostrado que la K_m para MgPPi está en el rango micromolar (Maeshima 2000). La V-PPasa requiere Mg²⁺ libre como cofactor, ya que la unión de Mg²⁺ estabiliza y activa la enzima, aunque el número exacto de sitios de unión para este catión no está claro. Baykov

et ál. (1993a) han propuesto la existencia de dos tipos de sitios de unión para la H⁺-PPasa de *Vigna radiata*: de alta afinidad ($K_m = 23-31 \mu\text{M}$) y de baja afinidad ($K_m = 0,25-0,46 \mu\text{M}$). La concentración citosólica de Mg²⁺ libre en tejido fotosintético de plantas se ha estimado alrededor de 0,4 mM (Yazaki *et ál.* 1988) y en estas condiciones la H⁺-PPasa presenta más del 90% de su actividad máxima. La unión del Mg²⁺ a la enzima también evita su inactivación por calor (Gordon-Weeks *et ál.* 1996, Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001). El valor de K_m para el potasio se ha estimado en alrededor de 1,27 mM, aunque la máxima actividad de hidrólisis se consigue con concentraciones de 30 mM y en algunos tipos celulares, como las células guarda de *Vicia faba*, la K_m para el potasio llega hasta 51 mM (Gordon-Weeks *et ál.* 1997, Darley *et ál.* 1998). Gordon-Weeks *et ál.* (1997) describieron un efecto inhibitor del Tris sobre la activación de la proteína por potasio en concentraciones superiores a 25 mM. Este efecto inhibitor es especialmente importante a bajas concentraciones de KCl (en torno a 10 mM). Otros tampones orgánicos, como el Bis-Tris-propano, producen también un efecto inhibitor similar, aunque se desconoce actualmente el mecanismo bioquímico de este efecto. En algunos casos, el sulfato potásico permite obtener mayores actividades de hidrólisis y de bombeo de protón que el correspondiente cloruro (Maeshima y Yoshida 1989, Sarafian y Poole 1989, Britten *et ál.* 1989), lo que podría deberse a la permeabilidad del ion Cl⁻ a través de las membranas, que perturbaría la componente electrónica del gradiente electroquímico generado por la bomba de protones.

Algunos autores han propuesto que la V-PPasa podría bombear potasio al interior de la vacuola e incluso realizar un simporte H⁺/K⁺ (Davies *et ál.* 1992, Obermeyer *et ál.* 1996), basándose en la técnica de “patch-clamp” y en razonamientos termodinámicos. Sin embargo, a pesar de lo atractivo de esta proposición, existen también pruebas en contra. Mediante el uso del isótopo radiactivo ⁴²K⁺, Sato *et ál.* (1994) demostraron que la proteína reconstituida en liposomas es incapaz de transportar potasio al interior de la vacuola. Mediante medidas con sondas fluorescentes, Ros *et ál.* (1995) también mostraron que no existía un transporte activo de potasio a través de la V-PPasa. Sin embargo, todos estos experimentos se llevaron a cabo en presencia de tampón Tris, que, como se ha expuesto anteriormente, puede afectar a la activación de la proteína por potasio. Ello llevó a Gordon-Weeks *et ál.* (1997) a sugerir la necesidad de re-evaluar el transporte de K⁺ usando otro tipo de tampón de pH más adecuado.

Reversibilidad de las V-PPasas. Todas las pirofosfatasa de membrana de organismos fotosintéticos caracterizadas hasta el momento (la gran mayoría de plantas) presentan actividad de hidrólisis de PPi (Rea y Poole 1993, Maeshima 2000) y su importancia en la acidificación vacuolar, especialmente en condiciones de deficiencia energética, parece clara. Sin embargo, diversos autores han demostrado la reversibilidad de esta enzima. Así, mediante el uso de isótopos de O y P marcados radiactivamente, Baykov y col (1994) y Façaña y de Meis (1998), respectivamente, demostraron que la V-PPasa puede llevar a cabo la síntesis de PPi *in vitro*, cuando el gradiente de pH entre el exterior y el interior de las vesículas y la concentración de Pi externo son adecuadas. De este modo, se ha propuesto la posibilidad de que las V-PPasas pudieran actuar bajo determinadas condiciones metabólicas en el sentido de síntesis de PPi, con el fin de mantener los niveles de este metabolito dentro de los rangos adecuados para la actuación de las distintas enzimas citosólicas dependientes de PPi.

Estado oligomérico. Diversos autores han propuesto que la V-PPasa es un homodímero. Mediante experimentos de inactivación por radiación y por descompresión de la muestra tras ser sometida a alta presión hidrostática (Chanson y Pilet 1989, Tzeng *et ál.* 1996), se estimó una masa molecular en torno a 140-160 kDa para la unidad funcional capaz de la hidrólisis de PPi y la translocación de protones dependiente de esta hidrólisis. Por otra parte, experimentos de filtración en gel permitieron estimar un valor de 135 kDa como la masa nativa de la proteína (Sato *et ál.* 1991). Estos valores de masa molecular sugerirían que las V-PPasas de plantas actúan *in vivo* como dímeros de subunidades idénticas. Sin embargo, otros autores han descrito una masa de 446 kDa, que correspondería a seis polipéptidos de V-PPasa, para la unidad funcional capaz de realizar transporte de H⁺ dependiente de PPi (Sarafian *et ál.* 1992b). Ensayos de electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) tras “cross-linking” de una fracción purificada de la V-PPasa con dimetilsuberimidato mostraron una banda de 158 kDa, pero en electroforesis nativa esta enzima migró como un complejo detergente-proteína de 480 kDa en presencia de Tritón X-100, lo que sugería la posibilidad de que la enzima fuese un trímero de dímeros (Maeshima 1990a). Aunque está claro que una única subunidad catalítica no es suficiente ni para la hidrólisis de PPi ni para el bombeo de protones, el estado de oligomerización de esta enzima *in vivo* permanece sin determinar.

Isoformas y patrones de expresión. La localización celular y expresión diferencial en distintos tejidos de las diferentes isoformas de la H^+ -PPasa, ha sido estudiada en distintas plantas. El caso mejor investigado es el de las dos isoformas clonadas hasta el momento en *Arabidopsis thaliana* (AVP1, dependiente de potasio, y AVP2, independiente de potasio), aunque se ha sugerido la posibilidad de la existencia de una tercera isoforma potasio-independiente (Drozdowicz 2001). Ambas isoformas parecen expresarse de igual modo en raíces, tallos y hojas, pero mientras que para AVP1 se ha sugerido un papel específico en polen, AVP2 no parece estar presente en este tejido (Mitsuda *et ál.* 2001b). Además, AVP1 se ha descrito asociada al tonoplasto celular (Rea *et ál.* 1992b), mientras que AVP2 se encuentra localizada en el Golgi, según experimentos de inmunocitocalización con partículas de oro (Mitsuda *et ál.* 2001a). Para tabaco, Lerchl *et ál.* (1995) encontraron patrones de expresión diferenciados para cada una de las tres isoformas distintas identificadas (TVP5, TVP9, TVP31), todas ellas dependientes de potasio, en tejidos y órganos como el parénquima fotosintético, nervios foliares, tallos, raíces, sépalos y pétalos. Así, TVP5 se expresa en todos los tejidos, mientras que TVP9 es una isoforma específica de la raíz. Por su parte, TVP31 se expresa principalmente en raíces, pétalos y sépalos. Para *Beta vulgaris*, se han identificado dos isoformas distintas, BVP1 y BVP2 (Kim *et ál.* 1994a). El análisis de *Northern Blot* en hojas y raíces indicó que BVP2 está presente casi exclusivamente en la raíz, mientras que BVP1 se expresa en ambos órganos. También se ha demostrado que las dos isoformas identificadas hasta el momento en arroz (OVP1 y OVP2) presentan diferentes patrones de expresión en callos y plántulas, de modo que el transcrito de OVP2 parece acumularse en mayor proporción en callos, mientras que OVP1 se expresa con igual intensidad en callos y en tallos y raíces de plántulas (Sakakibara *et ál.* 1996).

Hasta el momento no existe ninguna información clara sobre los factores que regulan la expresión de las distintas isoformas temporal y/o espacialmente, pero la idea generalizada es que dicha expresión estaría regulada de acuerdo a las demandas de la célula con respecto al transporte de iones y metabolitos y la acidificación de la vacuola y también por las necesidades de hidrólisis del PPi citosólico (Maeshima 2000).

Función fisiológica y regulación de la V-PPasa. Implicación en la respuesta a estrés. Como se ha mencionado anteriormente, la mayor parte de la actividad sPPasa en las células fotosintéticas se encuentra localizada en los plástidos y no parece existir ninguna actividad sPPasa citosólica en este tipo de tejido. De este modo, una función fisiológica clave propuesta para la V-PPasa ha sido la hidrólisis del PPi citosólico con el fin de desplazar los equilibrios de las reacciones anabólicas celulares (Rea *et ál.* 1992b, Rea y Poole 1993, Maeshima 2000). La implicación de esta bomba de protones en el desarrollo de la planta parece clara, ya que diversos autores han demostrado la existencia de una mayor actividad V-PPasa en tejidos jóvenes en crecimiento que en tejidos maduros (Chanson y Pilet 1987, Maeshima 1990b, Millner y Hall 1995, Shirakate *et ál.* 1997, Terrier *et ál.* 1998 y 2001, Lerchl *et ál.* 1995). Los niveles de actividad disminuyen a lo largo del desarrollo (la mayor parte de las veces acompañados de una disminución en los niveles de proteína), mientras que la actividad y la cantidad de proteína permanecen prácticamente constantes para la V-H⁺-ATPasa. De este modo, se propuso que la V-PPasa sería la enzima responsable de la hidrólisis de las grandes cantidades de PPi producidas durante el intenso metabolismo celular en los tejidos jóvenes, siendo por tanto la enzima más importante para la acidificación vacuolar en las primeras etapas del desarrollo de la planta (Chanson y Pilet 1987, Matsumoto y Chung 1988, Maeshima 1990b, Maeshima *et ál.* 1996). De este modo, la energía contenida en el enlace pirofosfato puede reciclarse mediante el intenso bombeo de protones a la vacuola, necesario en tejidos en crecimiento para la expansión vacuolar. Aunque ambas enzimas permanecen activas en los tejidos maduros, la V-H⁺-ATPasa pasa a ser en estos tejidos la principal bomba de protones de la vacuola (Chanson *et ál.* 1985, Maeshima 1990b, Maeshima *et ál.* 1996). Algunos autores han sugerido también la posibilidad de que en tejidos maduros, en que el ritmo metabólico y en consecuencia los niveles de PPi son bajos, la V-PPasa podría estar sintetizando PPi a expensas del gradiente de protones generado a través del tonoplasto por la V-H⁺-ATPasa, manteniendo, de este modo, la concentración de PPi citosólica en los niveles óptimos para el funcionamiento de enzimas como la PFK:PPi (fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa PPi-dependiente) o la UDP-glucosa pirofosforilasa (Chanson *et ál.* 1985). El bajo nivel metabólico celular y la baja producción de PPi asociado se ha usado también como argumento para justificar la disminución en actividad V-PPasa en la planta *Mesembryanthemum crystallinum* tras la inducción del metabolismo CAM, tanto por

envejecimiento como por NaCl (Bremberger y Lüttge 1992).

Sin embargo, Smart *et ál.* (1998) encontraron un comportamiento distinto para la enzima durante el desarrollo de las fibras de algodón. La síntesis de estas fibras comienza con una etapa de rápida expansión celular, seguida de la deposición de una pared celular secundaria y, por último, de una etapa de maduración. Tanto la V-PPasa como la V-H⁺-ATPasa parecen participar en la acidificación vacuolar en la primera etapa; sin embargo, mientras que los niveles de transcrito para la ATPasa disminuyen durante la segunda etapa, el transcrito de la V-PPasa parece estar expresado de forma constitutiva, de modo que los autores proponen que esta última proteína estaría implicada en la formación de la pared celular secundaria. Marsh *et ál.* (2000, 2001) propusieron, la V-H⁺-ATPasa y no la V-PPasa es la enzima responsable de la acidificación vacuolar en frutos cítricos en proceso de maduración. En este caso, se propone que el papel de la V-PPasa es conservar energía mediante la síntesis de PPi durante la deacidificación de dichos frutos. Además, al contrario de lo observado para *M crystallinum*, en *Kalanchoë diagremoniana*, la V-PPasa parece estar involucrada en la energetización de la vacuola para el transporte de malato al interior de la misma en el estado CAM (Smith *et ál.* 1984).

Los estreses salino y osmótico han sido ampliamente estudiados debido a su interés desde el punto de vista agrobiológico. Se ha observado una activación de la V-PPasa por NaCl en cultivos celulares de *Daucus carota* (Colombo y Cerana 1993), en células adaptadas de *Acer pseudoplatanus* (Zingarelli *et ál.* 1994) y en raíces de girasol (Ballesteros *et ál.* 1994). En plantas halofíticas, se ha medido una mayor actividad de bombeo de protones asociada a hidrólisis de PPi en hojas de *Suaeda salsa* (Wang *et ál.* 2001) y en raíces de *Salicornia bigelovii* (Parks *et ál.* 2002) cultivadas con altas concentraciones de sal, con respecto a las cultivadas en baja sal. Sin embargo, también existen datos que demuestran una inhibición de la V-PPasa bajo condiciones de estrés salino en raíces de *Vigna radiata* (Nakamura *et ál.* 1992), centeno (Matsumoto y Chung 1988) y trigo (Wang *et ál.* 2000), hipocotilos de *Vigna unguiculata* (Otoch *et ál.* 2001) y en hojas de *M crystallinum* (Rockel *et ál.* 1994). También se ha descrito la ausencia de efectos de este tipo de estrés en la planta halofítica *S. maritima* (Leach *et ál.* 1990) y en cultivos celulares de tabaco (Reuveni *et ál.* 1990). Algunos autores han sugerido la posibilidad de que estas diferencias en la respuesta de la V-PPasa puedan deberse a diferencias en las condiciones experimentales (Colombo y Cerana 1993), aunque no es

descartable que las respuestas sean específicas del tipo de planta y no puedan, por tanto, generalizarse (Wang *et ál.* 2001). En la mayor parte de los casos, no parece existir ningún efecto del polietilenglicol o el sorbitol en la actividad V-PPasa, por lo que la regulación por sal no parece deberse a un efecto osmótico, sino a un efecto iónico *per se*. La sobreexpresión de AVP1 en el mutante *ena⁻* de *Saccharomyces cerevisiae*, que carece del antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática, ha permitido obtener mutantes que presentan tolerancia a la sal y para los que se demostró una acumulación de Na^+ en la vacuola (Gaxiola *et ál.* 1999). La sobreexpresión de la misma proteína en *Arabidopsis* permitió obtener plantas tolerantes a la sal. Al poseer un mayor contenido iónico vacuolar, estas plantas eran capaces de acumular una mayor cantidad de agua para compensar el efecto osmótico, lo que les confirió además mayor resistencia a la sequía (Gaxiola *et ál.* 2001).

También se ha estudiado la regulación de la V-PPasa en presencia de otros iones como el K^+ y el Cl^- en raíces de centeno (Kasai *et ál.* 1993). En este tejido, se produjo un importante descenso en la actividad de hidrólisis de PPi por tratamiento con K^+ , mientras que el tratamiento con Cl^- produjo un aumento de dicha actividad. En los pelos radicales de *Limnobium stoloniferum*, se había demostrado que el tratamiento con potasio provoca alcalinización citoplasmática, mientras que el Cl^- produce una acidificación (Ullrich y Novacky 1990). Basándose en estas pruebas, los autores propusieron que las variaciones de la actividad V-PPasa en las raíces de centeno están asociadas a cambios en el pH citoplásmico y no directamente a la presencia de los iones. Este tipo de regulación debida al pH citoplásmico se había propuesto anteriormente para explicar la activación de la V-PPasa en plántulas de centeno sometidas a estrés por aluminio, en las que la presencia de este ion en el citoplasma produciría una acidificación del mismo (Kasai *et ál.* 1992).

Un mecanismo similar parece estar involucrado en la regulación de la V-PPasa en condiciones de estrés por frío y anoxia. Ambos tipos de estrés generan una deficiencia energética causada por la interrupción de la fosforilación oxidativa y la ruptura mitocondrial, respectivamente. Esto produce una dramática reducción en los niveles de ATP en la célula, que se alivia en parte por la inducción de un metabolismo fermentativo, produciéndose una disminución del pH citoplásmico. Como una medida adicional de adaptación al estrés energético, algunas de las reacciones metabólicas que consumen ATP pueden sustituirse por otras que consuman PPi (Carystinos *et ál.* 1995). En contraste con

la dramática disminución en los niveles de ATP, los niveles de PPi se mantienen prácticamente constantes durante cambios en la tasa respiratoria o el estado metabólico celular (ver apartado 1.5.2.2), lo que parece confirmar esta idea. Del mismo modo, se ha observado un aumento en la actividad V-PPasa en hipocótilos de *Vigna radiata* en condiciones de estrés por frío (Darley *et ál.* 1995) y en semillas de arroz tanto en frío como en anoxia (Carystinos *et ál.* 1995).

Otro tipo de regulación estudiada con respecto a estas proteínas ha sido la debida a deficiencias nutricionales, aunque la información existente es muy poco abundante. Palma *et ál.* (2000) describieron una estimulación de la actividad V-PPasa en cultivos celulares en suspensión de *Brassica napus* bajo hambre de Pi. Esta condición es similar a la anoxia en el sentido de que los niveles de ATP celulares se reducen significativamente sin que se afecten los niveles de PPi. Kasai *et ál.* (1998) estudiaron el comportamiento de las dos bombas de protones del tonoplasto en condiciones de deficiencia de nutrientes minerales. La actividad V-PPasa aumentó tres veces mientras que sólo se produjo un pequeño cambio en la actividad ATPasa. Algunos autores han propuesto que el aumento del bombeo de protones al interior de la vacuola provoca un aumento en transporte de solutos hacia el interior celular (González-Reyes *et ál.* 1994). Sin embargo, en este caso, los niveles de PPi celular eran mucho menores en las plantas crecidas en condiciones de deficiencia de nutrientes que en los controles. Estos autores han propuesto que este bajo contenido en PPi citoplásmico se produce por la alta actividad hidrolítica de la V-PPasa en estas condiciones.

Se han llevado a cabo algunos intentos para identificar los factores que regulan la actividad de la V-PPasa *in vivo* con el fin de clarificar los resultados aparentemente contradictorios obtenidos en condiciones de estrés. Se ha demostrado que la V-PPasa es inhibida reversiblemente por Ca^{2+} mediante la formación del complejo CaPPi, muy insoluble, y que es también un potente inhibidor de las sPPasas (Maeshima 1991). La K_m para CaPPi está alrededor de 17 μM . Otros autores, sin embargo, propusieron que es el ion Ca^{2+} libre el que produce el efecto inhibidor (Rea *et ál.* 1992a) y postularon que este ion es un posible modulador de la actividad de esta proteína *in vivo*. La regulación negativa de la actividad H^+ -PPasa por Ca^{2+} libre se ha propuesto también en células guarda de *Vigna radiata* (Darley *et ál.* 1998) y en las células de la aleurona de cebada (Swanson y Jones 1996). Además, se ha descrito una inhibición *in vitro* de la H^+ -PPasa por Na^+ en

membranas vacuolares aisladas de remolacha (Rea y Poole 1985).

Se ha probado asimismo el efecto sobre la actividad V-PPasa de distintas sustancias que actúan como hormonas en plantas. Se ha descrito una inhibición de la enzima por el tratamiento *in vivo* con citoquinina (BA) [Kasai *et ál.* 1993b]. En protoplastos del tejido de la aleurona de cebada, se observó una estimulación de la actividad por tratamiento con ácido giberélico (Swanson y Jones 1996). En los tratamientos con ácido abscísico (ABA), se ha demostrado una activación por tratamiento *in vivo* (Kasai *et ál.* 1993b) y una inhibición por tratamiento de protoplastos (Swanson y Jones 1996). En *Chenopodium rubrum*, la actividad V-PPasa parece estar regulada por el lípido esfingosina (Bille *et ál.* 1992).

1.6.2.3. Las H⁺-PPasas de los protistas no fotosintéticos

Recientemente, se han descrito H⁺-PPasas similares a las de plantas en dos grupos de protozoos parásitos que producen graves enfermedades en humanos: kinetoplástidos y apicomplejos. Estas H⁺-PPasas de protozoos parásitos han sido las últimas cuya identificación ha sido publicada en eucariotas, demostrándose que la distribución de estas enzimas parece ser más amplia de lo que se creía hasta hace poco (McIntosh y Vaidya 2002). Dado que dichas proteínas no se encuentran presentes en células animales, la presencia de las mismas en parásitos, como *Toxoplasma gondii* (Rodrigues *et ál.* 2000), *Plasmodium falciparum* (Luo *et ál.* 1999, McIntosh *et ál.* 2001), *Leishmania donovani* (Rodrigues *et ál.* 1999a), *Trypanosoma cruzi* (Scott *et ál.* 1998) y *Trypanosoma brucei* (Rodrigues *et ál.* 1999b), que causan, respectivamente, toxoplasmosis, malaria, leishmaniasis, la enfermedad de Chagas y la enfermedad del sueño africana, ha abierto nuevas puertas en la búsqueda de fármacos que permitan combatir dichas enfermedades. Además de en los parásitos tripanosomátidos humanos, también se han encontrado H⁺-PPasas en parásitos tripanosomátidos de insectos y otros animales, como *Leptomonas ctenocephali*, *Herpetomonas muscarum* y *Endotrypanicum schaudinni*, y de plantas, como *Phytomonas* sp, y en diversos protozoos ciliados y flagelados de vida libre (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002). Las primeras pirofosfatasa identificadas en estos organismos eran dependientes de potasio, pero, aunque no se hayan caracterizado bioquímicamente, también se han identificado isoformas potasio-independientes en varios organismos

parásitos mediante comparaciones de secuencia con otras H⁺-PPasas de este tipo (McIntosh *et ál.* 2001, Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002). Diversos experimentos de inmunolocalización han demostrado que las H⁺-PPasas de distintos parásitos se encuentran asociadas a la membrana plasmática y a los acidocalcisomas, vesículas acídicas de reserva de Ca²⁺ y polifosfato (Docampo y Moreno 2001). Aunque la orientación de la H⁺-PPasa en estas membranas no ha sido determinada para ningún protozoo parásito, parece probable que se encuentren localizadas en la membrana plasmática bombeando protones hacia el exterior celular, contribuyendo así al mantenimiento del gradiente electroquímico transmembranal y del pH citosólico. En algunas etapas del desarrollo de la enfermedad, las células del parásito se encuentran rodeadas de una membrana adicional procedente de la célula hospedadora, con lo que la H⁺-PPasa de la membrana plasmática podría estar generando un gradiente de protones usando el correspondiente espacio intermembranal (McIntosh y Vaidya 2002). Las enzimas asociadas a la membrana acidocalcisomal se encontrarían bombeando protones hacia el interior, contribuyendo a la acidificación vacuolar y al mantenimiento del pH citosólico. De acuerdo con esto, se ha propuesto un papel de la H⁺-PPasa en el almacenamiento de calcio en los acidocalcisomas (Docampo y Moreno 2001).

El posible papel fisiológico de estas enzimas en protozoos parásitos está todavía por esclarecer. Una característica común de los organismos que presentan estas proteínas es que están adaptados a distintos tipos de estrés frecuentes en su hábitat natural: escasez de nutrientes (por ejemplo, fosfato en plantas), fotosíntesis anaeróbica en baja luz (proteobacterias fotosintéticas) o ambientes extremos (arqueas y bacterias hipertermofílicas). Este podría ser también el caso de los protozoos parásitos, que se encontrarían en situaciones de estrés continuo al tener que defenderse de la respuesta del hospedador. En estas condiciones, la existencia de una proteína como la H⁺-PPasa que permite generar gradientes de protones (una forma de energía muy versátil y útil en bioenergética) en las membranas usando una forma de energía abundante y “barata” como el PPI, podría ser una ventaja adaptativa, al permitir conservar las reservas de ATP para otras funciones (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002). En *Leishmania major*, por ejemplo, se ha demostrado que el nivel de PPI intracelular aumenta en condiciones de estrés (anaerobiosis o escasez de fuente de carbono), paralelamente a la disminución de polifosfatos de cadena larga (Blum 1989).

Dado que se han encontrado H⁺-PPasas tanto en protozoos de vida libre como en parásitos tripanosomátidos de plantas y de insectos y otros animales, la presencia de esta proteína no parece estar necesariamente asociada a la patogenicidad o al carácter parasítico de estos microorganismos.

1.6.2.5. Clonación molecular de H⁺-PPasas y estudio de regiones conservadas

El primer cDNA que se clonó para una pirofosfatasa de membrana fue el de la V-PPasa estimulada por potasio de *Arabidopsis thaliana* (AVP1, Sarafian *et ál.* 1992a) mediante búsquedas por métodos inmunocitoquímicos en una librería de genes (genoteca) de expresión usando el anticuerpo contra la V-PPasa de *Vigna radiata*. Posteriormente, se han clonado varios cDNAs de plantas como la cebada (*Hordeum vulgare*, Tanaka *et ál.* 1993), remolacha (*Beta vulgaris*, Kim *et ál.* 1994a), tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN, Lerchl *et ál.* 1995), arroz (*Oryza sativa*, Sakakibara *et ál.* 1996), calabaza (*Curcubita moschata* cv. Kurokawa Amaguri, Maruyama *et ál.* 1998) y frijol negro (*Mung bean*, Nakanishi y Maeshima 1998). Todas ellas contienen entre 761 y 771 aminoácidos y su punto isoeléctrico teórico está en torno a 5,0 (Maeshima 2000). Sus masas moleculares calculadas están en torno a 79841 y 80800 kDa y las secuencias de aminoácidos presentan entre sí identidades entre el 86 y el 91%. La región menos conservada son los primeros 60 residuos de la zona amino-terminal. Más recientemente, se ha publicado la clonación de una segunda isoforma más divergente, independiente de potasio, de *Arabidopsis thaliana* (AVP2, Drozdowicz *et ál.* 2000).

Asimismo, se han clonado H⁺-PPasas correspondientes a otros organismos fotosintéticos, incluida la de la bacteria *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky M *et ál.* 1998) y las de las algas *Acetabularia acetabulum* (Ikeda *et ál.* 1991) y *Chara corallina* (Nakanishi *et ál.* 1999), algas verdes marina (primitiva) y talofítica, respectivamente. Las identidades existentes entre estas tres pirofosfatasas de organismos muy distantes filogenéticamente son bajas (35-46%). La H⁺-PPasa de *R. rubrum*, que consta de 660 residuos de aminoácidos, presenta una identidad del 36-39% con las V-PPasas de plantas terrestres y del 40% con la H⁺-PPasa de *Acetabularia*. Esta última presenta una identidad del 47% con las V-PPasas de plantas. La H⁺-PPasa de *Chara corallina* (793 residuos) presenta una identidad del 71% con las enzimas correspondientes de plantas (Maeshima

2000).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las pirofosfatasa mencionadas anteriormente ha puesto de manifiesto la existencia de tres regiones muy conservadas entre todas ellas, a pesar de su distinto origen filogenético (Maeshima 2000) (Figura 1.4). El primer segmento, situado en el bucle hidrofílico *e*, correspondería al dominio de unión del sustrato, que se ha confirmado que se encuentra expuesto al citosol. Basándose en la estructura tridimensional resuelta para las pirofosfatasa solubles, se ha propuesto que la secuencia consenso (E/D)(X)7KXE podría coincidir con el sitio catalítico y de unión de Mg^{2+} de todas las pirofosfatasa tanto solubles como translocadoras de protones. En las H^+ -PPasas esta secuencia de aminoácidos correspondería a DVGADLVGKVE. En algunas enzimas como la de *Acetabularia* o AVP1, existen sustituciones de algún aminoácido de esta secuencia consenso. En *Acetabularia*, la tercera glicina se sustituye por alanina y en AVP1 el décimo residuo de valina se sustituye por isoleucina. La importancia de esta secuencia para la catálisis se ha confirmado mediante inhibición por unión de anticuerpos y mutagénesis dirigida.

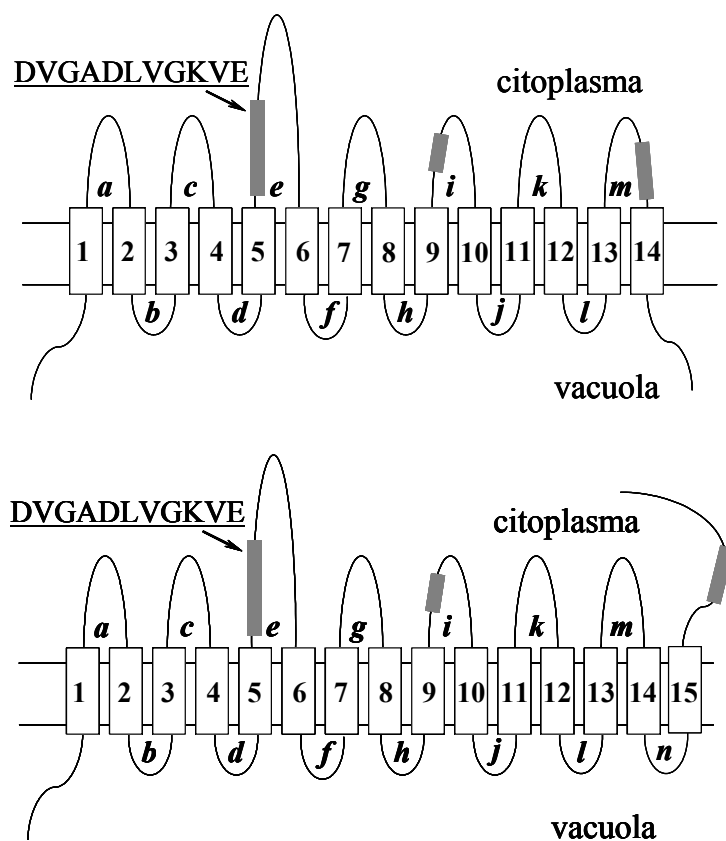


Figura 1.4: Modelos de estructura terciaria para las H^+ -PPasas. Los distintos modelos propuestos para la estructura terciaria de las H^+ -PPasas se distinguen por el número de segmentos transmembranales (de 14 a 16). Las regiones más conservadas se muestran en gris. La posición del posible dominio de unión de PP_i se indica con una flecha. Los números corresponden a los segmentos transmembranales y las letras a los correspondientes bucles hidrofílicos.

El segundo motivo conservado se localiza en el bucle hidrofílico *i*. El tercero, que se encuentra en la región amino-terminal, contiene una docena de residuos cargados. Experimentos preliminares han demostrado que la sustitución de los tres residuos de glutámico en este tercer segmento conservado implican la pérdida de la actividad enzimática, lo que sugeriría que podría estar expuesto también al citosol y jugar un papel fundamental en la actividad catalítica mediante su interacción con los dos segmentos conservados anteriores. Diversos experimentos de mutagénesis dirigida y al azar y el uso de inhibidores, como la N-etilmaleimida (NEM), el DCCD (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) y los bifosfonatos, han permitido identificar residuos esenciales para la hidrólisis y el acoplamiento al bombeo de protones (revisado en Maeshima 2000).

1.7. V-H⁺-ATPasas

Como se ha mencionado anteriormente, las V-PPasas coexisten en el tonoplasto con otra bomba de protones, la V-H⁺-ATPasa (EC 3.6.1.3). Estas proteínas son complejos multi-proteicos que poseen una estructura similar a la de las F₀F₁-ATPasas, con una cabeza hidrofílica (V₁) y un canal iónico altamente hidrofóbico embebido en la membrana (V₀). Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en las F-ATPasas, las dos mitades V₀ y V₁ no poseen actividad catalítica de hidrólisis de ATP o bombeo de protones, respectivamente, cuando se encuentran aisladas. Se ha propuesto que este hecho favorecería la regulación de la V-H⁺-ATPasa en distintas condiciones de estrés, mediante la disociación de las dos mitades. La mitad V₁ está compuesta de entre cinco y ocho subunidades polipeptídicas, que se asocian formando un complejo de 500-600 kDa, y es responsable de la hidrólisis del ATP. El complejo hidrofóbico V₀, de entre 250 y 300 kDa, posee de tres a cinco subunidades distintas y es la responsable de la translocación de protones al interior vacuolar. En plantas, se ha propuesto la existencia de subunidades adicionales, que podrían estar involucradas en la modulación del acoplamiento entre el bombeo de protón y la hidrólisis de ATP. En otros organismos, como la levadura, las subunidades adicionales de la mitad V₀ juegan un papel adicional en el bombeo de protón. Además de asociadas a la vacuola, estas enzimas se han localizado en varias membranas del aparato secretor, incluyendo el retículo endoplásmico, el Golgi, vesículas membranosas, provacuolas, vacuolas y la membrana plasmática (Forgac 1998, Grüber

2003). El término V-H⁺-ATPasa se aplica, por tanto, a todo un grupo de bombas de protones que comparten características bioquímicas y moleculares, independientemente de su localización subcelular y podrían estar involucradas en procesos tales como el tráfico de membrana, la distribución de diversas proteínas y su secreción, además de en la acidificación vacuolar (Stevens y Forgac 1997, Forgac 1998).

En plantas, existen datos que sugieren la existencia de distintas isoformas, que difieren en el número y tipo de subunidades, sus propiedades de bombeo de protón y su regulación. En *Arabidopsis thaliana*, existen al menos cuatro genes que codifican polipéptidos prácticamente idénticos de la mitad V_o y que se expresan diferencialmente en distintos tejidos (Perera *et ál.* 1995). Esta situación se da también en algodón, donde dos genes distintos codifican la subunidad c de V_o y también presentan distintos patrones de expresión (Hasenfratz *et ál.* 1995). Estos resultados sugieren la existencia de distintas isoformas, algunas de las cuales se expresarían de forma constitutiva, mientras que otras se inducirían en condiciones de estrés. Factores como el hambre o exceso de nitrato, la salinidad o el cambio del estado C3 a CAM en algunas plantas afectan al diámetro del poro V_o o al ensamblaje de distintas subunidades de la V-H⁺-ATPasa (Lüttge *et ál.* 2000, Wang *et ál.* 2001).

1.8. Objetivos de esta Tesis Doctoral

Al comienzo de este trabajo de Tesis Doctoral, varios aspectos de las PPasas de membrana habían sido poco estudiados. Por una parte, el grupo de los Profesores Baltscheffsky, en la Universidad de Estocolmo (Suecia), había analizado la síntesis de pirofosfato *in vitro* por parte de la H⁺-PPasa de *Rhodospirillum rubrum* en cromatóforos aislados a partir de células crecidas bajo distintas intensidades de luz, lo que permitió demostrar que esta pirofosfatasa presenta una mayor capacidad de síntesis en condiciones de alta iluminación. Sin embargo, no se habían llevado a cabo experimentos fisiológicos que permitieran conocer la regulación *in vivo* de esta H⁺-PPasa o de las de otros organismos procarióticos. Por ello, se planteó como uno de los objetivos de esta Tesis la realización de estudios fisiológicos encaminados a la obtención de datos acerca de la regulación *in vivo* de las H⁺-PPasa procarióticas, tomando como ejemplo la proteína de

Rhodospirillum rubrum.

Por otra parte, aunque la presencia generalizada de la H⁺-PPasa en plantas parecía bien establecida, no se conocía la distribución de estas pirofosfatasas en las distintas familias de organismos fotosintéticos (en especial microalgas). La identificación de H⁺-PPasas en distintos organismos fotosintéticos podría ayudar a discernir las relaciones evolutivas existentes entre distintos grupos filogenéticos. Además, el estudio mediante comparación de las secuencias de las distintas isoformas (parálogos) que pudieran identificarse en algunos organismos y el análisis de las condiciones naturales de crecimiento de los mismos, podría permitir, hasta cierto punto, esclarecer las funciones fisiológicas asociadas a estas proteínas.

Por último, a pesar de que todas las H⁺-PPasas presentan actividad de hidrólisis de PPi, los recientes experimentos sobre la reversibilidad de las mismas plantean dudas sobre la función fisiológica de las mismas. El estudio de la actividad *in vivo* de hidrólisis de PPi de esta proteína fue otro de los objetivos planteados para este trabajo de Tesis Doctoral. El problema se abordó, fundamentalmente, mediante la realización de experimentos fisiológicos de complementación funcional con diferentes PPasas y el intento de obtención de mutantes de H⁺-PPasas de distintos organismos.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido comunicados a diversos congresos nacionales e internacionales o han sido publicados en los siguientes artículos en libros y revistas de ámbito internacional:

Pérez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Losada M y Serrano A. 2001. A thermostable K⁺-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett* 496, 6-11.

López-Marqués RL, Pérez-Castiñeira JR, Losada M y Serrano A. 2001. Expression studies on proton-translocating pyrophosphatases of photosynthetic bacteria and algae. En A Serrano (Ed), *New Trends in Inorganic Pyrophosphatases Research. Proceedings of the*

Second International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases, pp 144-146, Universidad de Sevilla-CSIC, ISBN 84-699-4960-8.

Pérez-Castiñeira JR, López-Marqués RL, Losada M y Serrano A. 2001. Genetic, biochemical and physiological evidence of the widespread distribution of K⁺-dependent and K⁺-independent proton-translocating pyrophosphatases. En A Serrano (Ed), *New Trends in Inorganic Pyrophosphatases Research. Proceedings of the Second International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases*, pp 129-135, Universidad de Sevilla-CSIC, ISBN 84-699-4960-8.

Pérez-Castiñeira JR, Gómez-García R, López-Marqués RL, Losada M y Serrano A. 2001. Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remains or metabolic cornerstones? *International Microbiology (Protistology today: Advances in the microbial eukaryotic world)* 4, 135-142.

Pérez-Castiñeira JR, López-Marqués RL*, Villalba JM, Losada M y Serrano A. 2002. Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphate by bacterial and plant H⁺-translocating pyrophosphatases. *Proc Nat Acad Sci USA* 99, 15914-15919.

López-Marqués RL, Pérez-Castiñeira JR, Losada M y Serrano A. 2004. Differential regulation of soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* provides insights into pyrophosphate-based stress bioenergetics. *J Bacteriol* (aceptado).

López-Marqués RL, Schjoett M, Jakobsen MK y Palmgren MG. 2004. A pump for every purpose. Structure, function and regulation of primary active plant transporters pumping protons and calcium. En: *Annual Plant Reviews: Membrane Transport in Plants*, en prensa

* Contribución equivalente a la del primer autor

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Organismos y condiciones de cultivo

2.1.1. Bacterias fotosintéticas

2.1.1.1. Estirpes de bacterias fotosintéticas utilizadas

Para este trabajo se utilizaron dos estirpes distintas de la bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodospirillum rubrum*. La procedencia de estas estirpes, así como las de otras bacterias fotosintéticas utilizadas en este trabajo se recogen en la tabla I.

TABLA I: Relación de bacterias fotosintéticas utilizadas

Organismo	Procedencia	Tipo de organismo
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Estirpe S1: Profesora Margareta Baltscheffsky, Universidad de Estocolmo, Suecia. Estirpe UR2 (mutante espontáneo resistente a estreptomicina de la estirpe ATCC11170 [Fitzmaurice <i>et ál.</i> 1989]): Doctor Gary P. Roberts, Universidad de Wisconsin, Madison, EE.UU.	Bacteria púrpura no sulfurosa
<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	Dr. André Vermeglio, DPVE/SBC, Caradache, Francia	Bacteria púrpura no sulfurosa
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Dr. André Vermeglio, DPVE/SBC, Caradache, Francia	Bacteria púrpura no sulfurosa
<i>Rhodothalassium salexigens</i> DSM 2132	Prof. D. Zanoni, Departamento de Biología ambiental, Universidad de Bolonia, Italia	Bacteria fotosintética halofílica
<i>Rhodovibrio salinarum</i>	Prof. D. Zanoni, Departamento de Biología ambiental, Universidad de Bolonia, Italia	Bacteria fotosintética halofílica

<i>Roseobacter denitrificans</i>	Prof. D. Zanoni, Departamento de Biología ambiental, Universidad de Bolonia, Italia	Bacteria fotosintética salina
<i>Thermochromatium tepidum</i>	Profesor Michael T. Madigan, Department of Microbiology, Southern Illinois University, Illinois, EE.UU.	Gammaproteobacteria termofílica
<i>Chromatium vinosum</i>	Dr. André Vermeiglio, DPVE/SBC-CE, Caradache, Francia	Gammaproteobacteria normofílica
<i>Amoebobacter roseus</i>	Prof. Jordi Mas, Departamento de Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona	Gammaproteobacteria normofílica
<i>Chlorobium limicola</i>	Prof. Jordi Mas, Departamento de Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona	Bacteria verde sulfurosa
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Dr. Carl Bauer, Indiana University, Bloomington, IN, EE.UU.	Bacteria verde anoxigénica
<i>Heliobacterium chlorum</i> DSM 3682	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Alemania	Heliobacteria fotosintética

2.1.1.2. Cultivo de bacterias fotosintéticas en medio líquido

Para los experimentos fisiológicos, la estirpe S1 de *Rhodospirillum rubrum* se creció a 25°C en el medio descrito por Bose *et ál.* (1961), cuya composición es la siguiente:

Ácido málico (pH 6,8)	5,36 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75 mg/l

KH ₂ PO ₄	600 mg
K ₂ HPO ₄	900 mg
Na ₂ EDTA	20 mg
Citrato férrico	12 mg/l
Biotina	32 µg/l
NH ₄ Cl	1 g/l
Disolución de trazas	1 ml/l

La disolución de trazas contiene:

H ₃ BO ₃	2,85 g/l	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81 g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g/l	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079 g/l	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,049 g/l

Los cultivos fototróficos se crecían en botellas de 100 ml completamente llenas con iluminación de luz incandescente de 85 µE·m⁻²·s⁻¹. Los cultivos aeróbicos se desarrollaron en oscuridad en matraces erlenmeyer sometidos a una intensa agitación (250 rpm). La relación volumen del cultivo:volumen del matraz fue de 1:10. Para los cultivos fermentativos y en condiciones de respiración anaeróbica, se suplementaba el medio basal con una concentración de fructosa 11 mM y bicarbonato sódico 0,05% (p/v) para aumentar el pH inicial del medio hasta 7,1-7,2. Este aumento del pH inicial era imprescindible para el crecimiento en condiciones fermentativas y producía una reducción del periodo de latencia en el caso de la respiración anaeróbica (Schultz y Weaver 1982). La anaerobiosis se consiguió burbujeando los cultivos con dinitrógeno en frascos cerrados de vidrio de 100 ml. Los cultivos en condiciones de respiración anaeróbica se suplementaron además con dimetilsulfóxido (DMSO) 80 mM, que actúa como aceptor electrónico de la cadena respiratoria. Los inóculos se realizaron a partir de cultivos crecidos hasta saturación en las condiciones de cultivo en cada caso.

Los cultivos fototróficos y aeróbicos de la estirpe S1, en algunos casos, se desarrollaron en medio Hutner modificado (Hutner *et al.* 1967), que consiste en una

mezcla rica en sales minerales, con malato, glutamato y acetato como fuentes de carbono y suplementado con extracto de levadura y distintas vitaminas.

Para la mayor parte de los experimentos fisiológicos, los cultivos se crecían en las condiciones adecuadas hasta la mitad de la fase exponencial y, a continuación, se dividía el cultivo inicial en diferentes fracciones que se sometían a cada una de las nuevas condiciones, tal como se indica en el capítulo de Resultados.

Para la transformación de la estirpe mutante UR2 por conjugación, los cultivos se inocularon en condiciones aeróbicas (volumen matraz:volumen cultivo 10:1, 30°C, 250 rpm), en el medio MN (Lehman y Roberts 1991), rico en sales minerales, cuya composición es la siguiente:

MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico)	10,5 g/l
Ácido málico	4 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
H ₃ BO ₄	2,8 mg/l
EDTA (sal disódica)	20 mg/l
Citrato férrico	4 mg/l
Na ₂ MoO ₄	1 mg/l
KH ₂ PO ₄	600 mg/l
K ₂ HPO ₄	900 mg/l
MgSO ₄	250 mg/l
CaCl ₂	100 mg/l
Biotina	1 µg
Extracto de levadura	0,3% (p/v)

El pH final del medio es 7,0. El medio SMN, también usado en estos experimentos, es análogo al antes descrito, pero suplementado con 0,3% (p/v) de extracto de levadura.

2.1.1.3. Cultivo de *Rhodospirillum rubrum* en medio sólido

Para la transformación de la estirpe UR2 de *Rhodospirillum rubrum* fue necesario cultivar este organismo en medio sólido. Para ello, se preparaba, por una parte, una disolución 2x del medio de cultivo deseado (típicamente, MN ó SMN) y, por otra, una mezcla de agar en agua al 4% (p/v) en un volumen igual al del medio preparado. Tras autoclavar ambas disoluciones por separado, se mezclaban bien y el resultado se extendía en placas de Petri.

2.1.1.4. Condiciones especiales de cultivo

Para los experimentos fisiológicos que implicaban algún cambio respecto a las condiciones iniciales de cultivo (paso de aerobiosis a anaerobiosis o viceversa, adición de sal...), las células se inoculaban y se dejaban crecer en las condiciones iniciales hasta la mitad de la fase exponencial, tras lo cual, el cultivo se dividía en fracciones idénticas, cada una de las cuales se sometía a una de las nuevas condiciones, que se mantuvieron durante los tiempos que se indican en el correspondiente capítulo de resultados. Una de las fracciones se mantuvo siempre en las condiciones iniciales y se consideró el control del experimento fisiológico. Cuando se requería la adición de una sal, ésta se añadía en el menor volumen posible desde una disolución concentrada y el control se suplementaba con un volumen idéntico de agua MilliQ estéril.

2.1.2. Microalgas eucarióticas

2.1.2.1. Estirpes de microalgas eucarióticas utilizadas

Los experimentos fisiológicos se llevaron a cabo con las clorofíceas *Chlamydomonas reinhardtii* estirpe SAG 21-gr (silvestre) y *Chlorella fusca* (*Scenedesmus vacuolatus*), estirpe SAG 211-8b. Durante el transcurso de esta Tesis se llevaron a cabo experimentos de transformación génica de *Chlamydomonas reinhardtii* sobre el mutante sin pared 704 (Ohreser *et ál.* 1997).

Para el estudio de la distribución de las pirofosfatasa de membrana en distintos organismos fotosintéticos, se obtuvieron preparaciones de DNA a partir de cultivos celulares en placa de distintas microalgas eucarióticas, provenientes en su mayoría del Servicio de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, excepto en el caso de *Porphyra purpurea* y *Nephroselmis olivacea*, cuyas preparaciones de DNA fueron generosamente donadas por el Doctor Agustín Vioque del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Cultivos líquidos de *Tetraselmis suecica*, *Amphydinium* sp., *Rhodomonas baltica* y *Heterocapsa* sp. se obtuvieron del Instituto de Ciencias Marinas del CSIC (Cádiz). En la tabla II se detallan las microalgas utilizadas, agrupadas según la clasificación de Van der Hoek *et ál.* (1995).

Tabla II: Relación de otras microalgas utilizadas

Especie	Clase
<i>Amphydinium</i> sp. (Amphy)	Pirrofícea
<i>Astasia longa</i> SAG 1204-17a	Euglenofícea
<i>Chlamydomonas euryale</i> 25-89	Clorofícea
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 21-gr	Clorofícea
<i>Chlorella fusca</i> SAG 211-8b	Clorofícea
<i>Chlorella salina</i> SAG 8-86	Clorofícea
<i>Chlorella sorokiniana</i> SAG 211-32	Clorofícea
<i>Chlorella stigmatofora</i> SAG 9.86	Clorofícea
<i>Chlorococcum citrifforme</i> SAG 62.80	Clorofícea
<i>Cryptomonas</i> sp. (Crypto B)	Criptofícea
<i>Cyanidium caldarium</i> SAG 16-91	Rodofícea
<i>Cyanophora paradoxa</i> LB55	Glaucocistofícea
<i>Dunaliella salina</i> var. <i>viridis</i> (DUNA)	Clorofícea
<i>Euglena gracilis</i> SAG 1024-5/15	Euglenofícea
<i>Haematococcus pluvialis</i> SAG 34-1b	Clorofícea
<i>Heterocapsa</i> sp. (Hetero)	Dinofícea

<i>Isochrysis galbana</i> (Iso)	Haptofícea
<i>Micromonas pusilla</i>	Prasinofícea
<i>Nanochloris maculata</i> (MACU)	Clorofícea
<i>Nannochloropsis oculata</i> (OCU66)	Eustigmatofícea
<i>Nannochloropsis gaditana</i> (B-3)	Eustigmatofícea
<i>Nannochloropsis salina</i> (Monosal)	Eustigmatofícea
<i>Navicula pelliculosa</i> 1050-3	Bacillarofícea
<i>Nephroselmis olivacea</i>	Prasinofícea
<i>Ochromonas danica</i> SAG 933-7	Heterocontofícea
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX1090-1a	Bacillarofícea
<i>Porphyra purpurea</i>	Rodofícea
<i>Porphyridium purpureum</i> SAG 1380-1a	Rodofícea
<i>Poterioochromonas malhamensis</i> CCAP 933/1C	Crisofícea
<i>Rhodomonas baltica</i> (Rhodo Balt)	Criptofícea
<i>Rhodomonas salina</i> (Rhodo USA)	Criptofícea
<i>Skeletomonas costata</i> (Skel)	Bacillarofícea
<i>Tetracystis</i> sp. SAG 20.87	Clorofícea
<i>Tetraselmis chuii</i> SAG 8-6	Clorofícea- Prasinofícea
<i>Tetraselmis suecica</i> (TSH)	Clorofícea- Prasinofícea

En algunos casos, se usaron como molde para las reacciones de PCR preparaciones de cDNA. Los cDNAs de *Cyanophora paradoxa* y *Euglena gracilis* fueron donados por el Prof. Wolfgang Löffelhardt, de la Universidad de Viena, Austria. Las preparaciones de *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella fusca*, *Ochromonas Danica* y *Cyanidium caldarium* fueron obtenidas en nuestro grupo por el Dr. Federico Valverde (Gómez-García, Tesis Doctoral), usando el "TimeSaver cDNA Synthesis Kit" (Pharmacia Biotech).

2.1.2.2. Condiciones de cultivo en medio líquido

Los cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella fusca* (*Scenedesmus vacuolatus*) se crecieron en el medio descrito por Sueoka *et ál.* (1967) con NH₄Cl. Los cultivos con las estirpes silvestres se desarrollaron en condiciones de esterilidad en 100 ml de medio líquido en tubos de 200 ml de capacidad, que se gasearon con una mezcla de aire y CO₂ al 2% (v/v) y se iluminaban con luz fluorescente ("daylight") constante de 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ a una temperatura de 25°C.

Para los experimentos fisiológicos en presencia y ausencia de acetato, los cultivos de *C. reinhardtii* se crecían en medio Sueoka suplementado con acetato potásico (pH 6,8) a concentración final 14,7 mM (Gillham *et ál.* 1970).

Los cultivos de *C. fusca* con glucosa como fuente de carbono se desarrollaron en medio Sueoka con amonio como fuente de nitrógeno, suplementado con una concentración final de glucosa 17 mM.

2.1.2.3. Condiciones de cultivo en medio sólido

Para el mantenimiento de los transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii* obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral, se realizaban cultivos en medio TAP amonio (Harris 1988), suplementado con un 2% de agar (p/v).

2.1.2.4. Condiciones especiales de cultivo

Para los experimentos fisiológicos sobre el estudio del efecto de distintas sales en la expresión de la H⁺-PPasa en *C. reinhardtii* y *C. fusca*, las microalgas se cultivaron en medio Sueoka con amonio como fuente de carbono hasta una concentración de clorofila de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En este punto, los cultivos se suplementaron con la sal adecuada o sorbitol a las concentraciones finales que se indican en el capítulo correspondiente de Resultados. Los controles se obtuvieron añadiendo a uno de los cultivos un volumen de agua estéril idéntico al volumen de disolución salina o de osmolito usada para los demás cultivos.

Los transformantes de *C. reinhardtii* obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral se crecieron en 10-12 ml de medio líquido Sueoka con NH₄Cl o KNO₃ como fuente de carbono a una concentración final de 10 mM. Estos cultivos se desarrollaron en tubos estériles de vidrio de 15 ml de capacidad con ligera agitación (50 rpm) en las mismas condiciones de temperatura e iluminación expuestas anteriormente.

2.1.3. *Escherichia coli*

2.1.3.1. Estirpes de *E.coli* utilizadas

Los distintos plásmidos usados en este trabajo se extendieron en la estirpe de *E. coli* XL1-Blue [*supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac*]. Para la transformación de *Rhodospirillum rubrum* por conjugación se usó la estirpe S17-1 [RecA thi pro hrd (R-M+) RP4:2-Tc:Mu_Km::Tn7(Tp^rSm^r)], cedida por el Profesor Conrado Moreno-Vivián de la Universidad de Córdoba.

2.1.3.2. Cultivo de *E.coli* en medio líquido

Los cultivos de *Escherichia coli* se realizaban en medio Luria-Bertani (Sambrook *et ál.* 1989), cuya composición es la siguiente:

NaCl 10 g/l
Bactotriptonas 10 g/l
Extracto de levadura 6 g/l

Para la preparación de DNA de cadena simple, las bacterias transformadas con las construcciones adecuadas se cultivaban en medio 2xYT, cuya composición era:

16 g/l bacto-triptona
10 g/l Extracto de levadura
5 g/l NaCl

Cuando era necesario los cultivos se suplementaban con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

El cultivo de *E. coli* en medio líquido se realizaba en tubos estériles de 10 ml que contenían 2 ml de medio, que se incubaban en agitadores orbitales a 37°C y 200 rpm.

Para la preparación de extractos celulares, las bacterias se cultivaron en matraces de 100 ml de capacidad con 50 ml de volumen de medio LB con antibiótico y se incubaron en las condiciones expuestas anteriormente.

Para la sobreexpresión de proteínas en células de *E. coli* transformadas con el plásmido pQE9, los cultivos crecidos hasta densidad óptica a 600 nm en torno a 0,5 se suplementaban con 1,8 g/l de IPTG y se dejaban crecer durante 8 h antes de añadir una cantidad adicional de IPTG de 1,6 g/l e incubar durante 14 h más.

2.1.3.3. Cultivo de *E. coli* en medio sólido

Para el cultivo en medio sólido se utilizó el mismo medio LB descrito en el apartado anterior, solidificado con agar de grado bacteriológico (Aplichem) al 1,5% (p/v). La ampicilina se incorporaba a partir de una disolución concentrada esterilizada por filtración, que se añadía a 55°C a una concentración final de 100 µg por mililitro, justo antes de extender el medio en cajas de Petri.

2.1.4. Levadura

2.1.4.1. Estirpes de levadura utilizadas

Para los trabajos de expresión heteróloga se usaron levaduras de la estirpe haploide W303-1A (MATa, ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1) de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1.4.2. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio líquido

Para la obtención de células competentes, las levaduras de la estirpe W303 se crecían en medio rico YPD (Sherman *et ál.* 1985), cuya composición es la siguiente:

Extracto de levadura	10 g/l
Proteosa peptona	20 g/l
Glucosa	20 g/l

Para los experimentos de inducción por galactosa o para el crecimiento en medio rico del mutante YPC-1 obtenido durante la realización de esta Tesis Doctoral, se usó el medio YPGal cuya composición es análoga a la del medio anterior, con la salvedad de que la glucosa es sustituida por una cantidad idéntica de galactosa.

Las levaduras se cultivaban desde placas de medio sólido en tubos de 15 ml que contenían 2 ml de medio, donde se dejaban crecer a 30°C y con agitación (150-200 rpm) hasta fase estacionaria, tras lo cual, 0,5 ó 1 ml se reinoculaban en 100 ml de medio final en matraces Erlenmeyer de 250 ml o en 200 ml de medio en matraces de 500 ml de volumen, respectivamente.

Para los experimentos que requerían medios selectivos, se usó medio sintético SD, que contiene un 0,17 % de Base Nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico (YNB), como fuente de nitrógeno, fósforo, potasio, sulfato, magnesio, calcio, vitaminas y oligoelementos, y un 2% de glucosa. Este medio era suplementado con aminoácidos, según el requerimiento de las levaduras transformadas en las siguientes proporciones:

Triptofano (t)	0,1 mg/ml
Histidina (h)	0,03 mg/ml
Adenina (a)	0,03 mg/ml
Leucina (l)	0,1 mg/ml
Uracilo (u)	0,03 mg/ml

Este medio se obtenía a partir de disoluciones 100x concentradas y esterilizadas de cada uno de sus componentes y agua de calidad MilliQ estéril. La esterilización se llevaba a cabo mediante autoclavado, excepto en el caso del triptófano y el YNB que, al ser inestables, se filtraban. Cuando las levaduras debían seleccionarse en galactosa, se empleaba el medio SGal, análogo al medio SD, pero en que la glucosa es sustituida por la misma cantidad de galactosa. Caso de ser necesario, el medio se tamponaba con una concentración final 50 mM de una disolución tampón MES-Tris a pH adecuado, que se añadía, una vez más, de una disolución 100x esterilizada por filtración. Los cultivos se realizaban de modo análogo a lo expuesto anteriormente para los medios ricos.

Para los experimentos de complementación se usó un medio sintético rico, análogo al medio SD, pero con un aporte adicional de aminoácidos y nucleótidos (Ausubel *et ál.* 1995)

2.1.4.3. Condiciones especiales de cultivo en medio líquido

Para la obtención de grandes cantidades de biomasa en los experimentos de expresión heteróloga de la pirofosfatasa de *Thermotoga maritima*, las levaduras se cultivaban desde placa de medio sólido en 100 ml de medio líquido SD_{thal} (suplementado con triptofano, histidina, adenina y uracilo) en matraces de 250 ml hasta fase estacionaria (24-48 h), tras lo cual las células se recogían por centrifugación, se lavaban dos veces con agua estéril y se transferían a matraces de 2 l de capacidad, que contenían 1 l de medio YPGal. Tras crecer las levaduras durante 13 h, el medio se suplementaba con 100 ml de galactosa al 20% y se dejaba crecer durante 4 h más antes de proceder a su centrifugación.

Para los experimentos de complementación funcional del mutante YPC-1 en placa, las levaduras se crecían desde medio sólido en 2 ml de medio líquido selectivo con galactosa hasta fase estacionaria, tras lo cual, 100 µl se reinoculaban en 2 ml de medio selectivo con glucosa durante 18 h antes de proceder a la realización de los goteos sobre placa de medio con glucosa, con el fin de eliminar toda la posible actividad sPPasa residual.

2.1.4.4. Cultivo de *S. cerevisiae* en medio sólido

Las placas de medio rico YPD o YPGal se obtenían suplementado con un 2% de agar bacteriológico los medios preparados según el apartado anterior.

Para la obtención de placas de medio selectivo, se autoclavaba la cantidad de agua necesaria a la que se añadía una cantidad de agar suficiente para que la concentración final fuera del 2%. Tras dejar enfriar hasta 55°C, el medio se suplementaba con los distintos componentes necesarios según los protocolos antes expuestos y se extendía en cajas de Petri.

2.1.5. Otros microorganismos utilizados

Para los estudios filogenéticos llevados a cabo durante esta Tesis Doctoral, se obtuvieron muestras de DNA, tanto genómico como preparaciones y genotecas de cDNA, de distintos microorganismos no fotosintéticos. Las características de cada microorganismo y la procedencia de las distintas muestras se recogen en la tabla III.

TABLA III: Relación de microorganismos no fotosintéticos utilizados

Especie	Procedencia del DNA	Tipo de organismo
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	Dr. J. Pérez Serrano, Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Univ. Alcalá de Henares	Ameba de vida libre
<i>Dyctiostelium discoideum</i> AX4	Dr. Ricardo Escalante y Prof. Juan. J. Aragón, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM, Madrid	Ameba de vida libre (Dictiostélidos)

<i>Physarum polycephalum</i>	Dra. Gabriel Werner-Felmayer, Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Univ. of Insbruck, Austria (DNA genómico y cDNA); Dr. Akio Nakamura, Department of Molecular and Cellular Pharmacology, Gunma University Scholl of Medicine, Japón (genoteca de cDNA)	Ameba de vida libre (Micetozoos)
<i>Entamoeba histolytica</i>	Dr. E. Villalobos, Dpto. Microbiología, Facultad Biología, Universidad de Sevilla	Entamoévido parásito de humanos
<i>Giardia lamblia</i> SLP-111	Dr. W.L. Homan, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Blithoven, Holanda	protozoo parásito de vertebrados
<i>Plasmodium falciparum</i>	Servicio de Parasitología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.	parásito apicomplejo
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Dra. Pilar Sancho García, Dpto. Microbiología y Genética, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca.	parásito apicomplejo
<i>Toxoplasma gondii</i>	Servicio de Parasitología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.	parásito apicomplejo
<i>Monosiga brevicollis</i>	Dra. Nicole King, Department of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley.	Coanoflagelado
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , estirpes D44 y C58	Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.	Bacteria del suelo
<i>Azospirillum brasiliensis</i>	Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.	Bacteria del suelo (Rhodospirillaceas)
<i>Frankia</i> sp. (estirpes BCU110501 y GL020603)	Dr. E. Cervantes, IRNA-CSIC, Salamanca	Bacteria fijadora de nitrógeno (Frankia)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> HH103	Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.	Bacteria fijadora de nitrógeno (Rhizobios)

<i>Mesorhizobium loti</i> USDA3471	Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.	Bacteria fijadora de nitrógeno (Rhizobios)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> USDA4894	Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.	Bacteria fijadora de nitrógeno (Rhizobios)
<i>Halobacterium</i> sp.	Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.	Arquea halofílica
<i>Halococcus</i> sp.	Dpto. Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.	Arquea halofílica

Para la búsqueda de H⁺-PPasas en distintos organismos se usaron también distintas cianobacterias, que se obtuvieron del Servicio de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis en que se desarrolló esta Tesis Doctoral, y que se recogen en la tabla IV.

TABLA IV: Relación de cianobacterias utilizadas

Especie	Clase*
<i>Anabaena</i>	IV
<i>Pseudoanabaena</i> PCC6903	III
<i>Synechocystis</i> PCC 6803	I
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC7120	IV

*Según la clasificación de Rippka *et ál.* (1979)

2.1.6. Curvas de crecimiento de los cultivos

Para la confección de las curvas de crecimiento de los distintos organismos, las células se cultivaban según se indica en los apartados anteriores y, a distintos tiempos, se tomaban muestras que permitían determinar la densidad óptica (a 600 nm para microalgas y *E. coli*, 680 nm para *Rhodospirillum rubrum* y 660 nm para levadura), la cantidad de pigmentos (para los organismos fotosintéticos) y la cantidad de proteína en el cultivo (ver

Apdo. 2.5.4). Los tiempos de generación de los cultivos se calcularon como el tiempo necesario para la duplicación de la densidad óptica en la fase exponencial de crecimiento.

2.2. Recogida de células

La recogida de células para la mayoría de los trabajos de experimentación se realizaba por centrifugación en centrífugas refrigeradas Sorvall™ usando rotores SS34 o GSA a 8000xg y temperatura constante de 4°C.

Las levaduras se centrifugaban en tubos estériles de 50 ml de capacidad que se centrifugaban a 2000xg en una centrífuga de rotor basculante (Heraeus, Alemania) a temperatura ambiente. Para el cambio de medio desde glucosa a galactosa en los experimentos de inducción, las células se centrifugaban del mismo modo, se lavaban dos veces con agua estéril y se resuspendían posteriormente en el medio nuevo. Para la centrifugación de grandes cantidades de cultivo, se usaron centrífugas refrigeradas Sorvall™ con rotores GSA a 2000xg durante 5 min.

2.3. Preparaciones de membranas y extractos celulares

Todas las centrifugaciones para las preparaciones de membranas se llevaban a cabo en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-80 usando los rotores 60Ti a 40000 rpm durante 30 min.

En el caso de los fraccionamientos de membranas de levadura en gradientes de sacarosa, las muestras se centrifugaban en la ultracentrífuga Beckman antes descrita a 28500 rpm durante al menos 6 h usando el rotor SW41.

2.3.1. Preparación de membranas y extractos celulares de *Rhodospirillum rubrum*

Las muestras destinadas a experimentos fisiológicos y medida de actividades enzimáticas se recogían por centrifugación, se lavaban dos veces con 50 mM Tris-HCl a pH 7,5 y se resuspendían en **tampón de rotura** (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 2mM, MgCl₂ 4 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, glicerol 10% (v/v), DTT 2 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM y ácido ε-aminocaproico 2 mM) a razón de tres ml de tampón por

cada gramo de peso fresco. Si las células no iban a ser usadas inmediatamente después de su centrifugación, se congelaban en nitrógeno líquido y se guardaban a -80°C hasta su uso. Las suspensiones celulares se trataban con ultrasonidos, usando un sonicador Branson modelo B-12. Estas suspensiones se mantenían en vasos de vidrio reforzados inmersos en un baño de hielo-agua a $0-4^{\circ}\text{C}$ y se sometían a tres pulsos de 1 min de rotura alternados con 1 min de descanso para evitar un excesivo calentamiento de las muestras. La frecuencia de oscilación fue de 20 kHz y la potencia aproximada 50 W. Tras la rotura por ultrasonidos, el extracto se centrifugaba a $2000\times g$ durante 5 min para eliminar restos de células enteras y el sobrenadante se ultracentrifugaba a 40000 rpm (rotor Beckman 60Ti) durante 30 min. El sobrenadante de esta centrifugación se guardaba como extracto crudo y las membranas precipitadas se homogeneizaban en 5 ml de tampón de rotura usando una homogeneizadora de mano, se diluían hasta 20 ml en el mismo tampón suplementado con 3M KCl, para eliminar contaminaciones de pirofosfatasa soluble, y se sometían a una nueva ultracentrifugación. Las membranas se lavaban dos veces más con tampón de rotura sin KCl y se homogeneizaban en 1 ml del mismo tampón. Los extractos y preparaciones de membranas se usaron directamente para la determinación de actividades enzimáticas o se guardaron congelados a -20°C para las determinaciones inmunológicas.

2.3.2. Preparaciones de membranas y extractos celulares de *Saccharomyces cerevisiae*

Para la preparación de membranas y extractos de levadura para los experimentos con el mutante YPC-1, las células recogidas por centrifugación se lavaban con agua y se resuspendían en 5 ml de **tampón A** (Tris-HCl 25 mM [pH 8], glicerol 10%, β -mercaptoetanol 4mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM, MgCl_2 10 mM, benzamidina 1 mM, ácido ϵ -aminocaproico 2 mM, PSMF 1 mM, leupeptina $1\mu\text{g/ml}$) a 0°C , tras lo cual se procedía a su rotura por agitación en presencia de 10 ml de perlas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma chemicals). El homogeneizado se diluía hasta 20 ml con **tampón B** (Tris-HCl 10 mM [pH 7,6], glicerol 10%, DTT 2 mM, EDTA 1 mM) y se centrifugaba 10 min a 2400 rpm (rotor Sorvall SS-34), para eliminar las perlas de vidrio y los restos de células enteras. El sobrenadante se centrifugaba a 40000 rpm (rotor Beckman 60Ti)

durante 30 min para sedimentar la fracción total de membranas. El sobrenadante de esta ultracentrifugación constituyó el extracto crudo soluble, mientras que el precipitado de membranas se homogeneizó con una homogeneizadora de mano en 20 ml de tampón B y se centrifugó una vez más para eliminar posibles contaminaciones de pirofosfatasa soluble. El precipitado lavado se resuspendió y homogeneizó en 2 ml de tampón B y se aplicó a un gradiente discontinuo de sacarosa constituido por cojines de 2,5 ml con concentraciones de sacarosa del 27%, 35%, 43,5% y 53,5% en tampón B sin glicerol. Después de centrifugar al menos 6 h en una ultracentrífuga Beckman (rotor SW41) a 28500 rpm, las distintas fracciones de membranas se recogieron de las interfases, se diluyeron 20 veces con tampón B y se centrifugaron una vez más en rotor 60Ti (40000 rpm, 30 min). Finalmente, los precipitados se resuspendían en 1 ml de tampón B y se usaban en las determinaciones directamente o se guardaban a -80°C .

Para la purificación de la H^+ -PPasa de *Thermotoga maritima*, las células de la estirpe W303 transformadas se crecían como se indica en el apartado 2.1.4.3 y los cultivos se recogían por centrifugación y se lavaban dos veces con agua. A continuación, las células se resuspendían en **tampón de homogeneización** (30 ml Tris-HCl 0,5M [pH 7,5], 6 ml EDTA 0,5M [pH 8,0], 34,5 ml glicerol 87%, 30 μl PMSF 100 mM, 30 μl Pepstatina 1mg/ml y 70,5 μl DTT 0,5M) a razón de 1 ml por cada 2 g de células. Fracciones de 8 ml se llevaban a tubos de centrifuga de 30 ml, se les añadían 10 ml de perlas de vidrio de 0,4-0,6 mM de diámetro (Sigma chemicals) y se sometían a 8 ciclos de 1 min de agitación en vórtex seguido de 1 min en hielo. A continuación, se añadía KCl hasta una concentración final de 250 mM y se aumentaba el volumen hasta 30 ml con **GTED20** (Tris-HCl 10 mM [pH 7,6], EDTA 1 mM [pH 8,0], glicerol 20% [v/v], DTT 1 mM). Tras centrifugar a 10000 rpm durante 10 min, los sobrenadantes se ultracentrifugaban y el precipitado de membranas totales se resuspendía en **tampón de dilución** (Tris-HCl 50 mM [pH 7,5], glicerol 20% [v/v], EDTA 1 mM [pH 8,0], KCl 1,34 mM, PPi 1,34 mM, MgCl_2 1,34 mM, DTT 1,34 mM, PMSF 1,5 mM, Pepstatina 1 mM) a razón de 5 ml por cada litro de cultivo inicial. La preparación de membranas totales se procesaba inmediatamente o se dividía en fracciones de 1 ml, que se congelaban en nitrógeno líquido y se almacenaban a -80°C hasta su uso.

2.3.3. Preparación de extractos celulares de *Escherichia coli*

Los cultivos de *E. coli* se recogían por centrifugación y los precipitados celulares se resuspendían en tampón de rotura y se sometían a rotura por ultrasonidos, tal como se indica en el apartado 2.3.1. Las muestras se centrifugaban a 40000 rpm (rotor Bekman 60Ti) durante 20 min y el sobrenadante, que se consideró el extracto celular libre de células, se procesó inmediatamente o se conservó a -80°C .

2.4. Determinación de la actividad pirofosfatasa

Los ensayos de actividad pirofosfatasa, tanto soluble como de membrana, se realizaron espectrofotométricamente midiendo la producción de fosfato. En su mayoría, estas determinaciones se llevaron a cabo mediante el método de Ames (Ames, 1966). En disolución ácida y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo de fosfomolibdato amónico que, reducido con ácido ascórbico u otro reductor orgánico, presenta una coloración azul, cuya absorbancia se mide a 660 nm. En este caso, el reductor usado fue el reactivo de Fiske-Subbarrow (Sigma Chemical co. EEUU).

Una unidad de actividad pirofosfatasa se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de PPI en las condiciones que se detallan en los apartados siguientes. La concentración de fosfato se interpolaba de una recta de calibrado previamente establecida con ortofosfato sódico.

Para todos los experimentos, se realizaban tres medidas de actividad PPasa independientes y los resultados se obtenían como la media de todos los datos.

2.4.1. Actividad pirofosfatasa soluble

Las medidas de actividad pirofosfatasa soluble se realizaban en una mezcla de ensayo, que contenía tampón Tris-HCl 10 mM [pH 8], MgCl_2 200 mM, Na_2PPI 100 mM y una cantidad adecuada de la preparación de extracto crudo hasta un volumen total de 200 μl . La reacción enzimática se dejaba transcurrir durante 10 min a 30°C y a continuación se añadían 550 μl agua y 250 μl de disolución ácida de molibdato amónico (Sigma), de

forma que se paraba la reacción. Finalmente, se añadían 50 µl de reactivo de Fiske-Subbarow y se esperaba 10 min para el desarrollo del color. En todas las determinaciones se realizaban medidas control en ausencia del correspondiente sustrato y de la preparación enzimática.

2.4.2. Actividad pirofosfatasa de membrana

Las medidas de actividad pirofosfatasa de membrana se realizaban en una mezcla que contenía Tris-HCl 10 mM [pH 8], MgCl₂ 2 mM, Na₂PPi 0,3 mM y una cantidad adecuada de la preparación de membranas en un volumen final de 200 µl. En todos los casos, se añadía una concentración de NaF 0,5 mM para inhibir posibles restos de actividad sPPasa y se realizaban medidas control en ausencia de sustrato y con membranas carentes de actividad pirofosfatasa. En el caso de las determinaciones de actividad para H⁺-PPasas dependientes de potasio, la mezcla de reacción se suplementaba con una concentración de KCl 30 mM y se realizaban controles para cada una de las muestras enzimáticas en ausencia de esta sal. Las reacciones enzimáticas se incubaban a 37°C durante 30 min y, a continuación, la reacción se paraba mediante la adición de 14 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 100% (p/v) y 24 µl de ácido perclórico comercial, manteniéndose durante 2 minutos en hielo antes de centrifugar en una centrífuga Eppendorf a 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se trasladaba a tubos limpios que contenían 510 µl de agua y 250 µl de la disolución ácida de molibdato amónico antes mencionada. A continuación, se añadían 50 µl de reactivo de Fiske-Subbarow y se esperaba 10 min para el desarrollo del color.

En el caso de la H⁺-PPasa de *Thermotoga maritima* expresada heterológamente, la medida de actividad PPasa se realizó mediante una modificación del método de Baginsky *et ál.* (1967). En este caso, no se añadía NaF para inhibir las sPPasas, sino que las muestras, preparadas como se ha descrito anteriormente pero sin PPI añadido, se incubaban a 70°C durante 5 min antes de proceder a la adición de este sustrato. La reacción enzimática se dejaba proceder entonces a la misma temperatura durante 10 min. A continuación, las muestras se mantenían en hielo durante 2 min exactos y se les añadían 300 µl de **disolución de stop**, que se obtenía a partir de otras dos disoluciones. Por un

lado, se disolvían 1,5 g de ácido ascórbico en 50 ml de HCl 0,5 M, a los que se añadían, a continuación, 500 µl de SDS al 10% (p/v) y, por otro lado, 350 mg de heptamolibdato amónico en 5 ml de agua. Tras mantener estas dos disoluciones en hielo durante 1 h, al menos, y justo antes de empezar el ensayo, se mezclaban ambas para dar la **disolución de stop**. La adición de ésta a las muestras del ensayo provoca la desnaturalización de las proteínas, con la consiguiente pérdida de la actividad enzimática, y, al mismo tiempo, la formación de un complejo de fosfomolibdato de color verde-azulado. Las mezclas de ensayo se incubaban entonces en hielo durante 10 min exactos y, finalmente, se les añadían 450 µl de arseniato sódico al 2% (p/v), que compleja el Pi no producido por la actividad enzimática. Las muestras se incubaban a temperatura ambiente durante 1 h para el desarrollo del color azul y se medía la absorbancia de las mismas a 860 nm. Cada grupo de medidas iba acompañado de una recta de calibrado con fosfato sódico como patrón.

2.5. Métodos analíticos

2.5.1. Medidas espectrofotométricas

Las medidas de absorbancia de luz visible o ultravioleta se realizaron en un espectrofotómetro marca Jenway 6405 UV/VIS. Los espectros de absorbancia de cultivos de *Rhodospirillum rubrum* y las medidas de densidad óptica se obtuvieron con un espectrofotómetro marca Varian modelo “Cary 1E”.

2.5.2. Determinación de bacterioclorofila

La determinación de la concentración de bacterioclorofila en los cultivos de *Rhodospirillum rubrum* se realizó espectrofotométricamente a 880 nm en muestras de 1 ml de cultivo, usando el coeficiente estimado de extinción molar in vivo de $140 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ determinado por Clayton (1963).

2.5.3. Determinación de clorofila

El contenido celular de clorofila de los cultivos de microalgas eucarióticas se determinó espectrofotométricamente en extractos celulares obtenidos con metanol, según una modificación del protocolo descrito por Mackinney (1941). Un mililitro de suspensión celular se centrifugó 2 min a 8000xg en una centrifuga Eppendorf y el sedimento se resuspendió en 1 ml de metanol absoluto. Tras agitar vigorosamente durante 1 min en un agitador vórtex de mesa, la preparación se calentó 2 min en un baño a 80°C y se centrifugó 2 min a 13000xg, determinándose la concentración de clorofila en el sobrenadante a partir de su absorbancia a 665 nm en cubetas de 1 ml. El coeficiente de extinción de la clorofila que se empleó en todos los casos fue de 13,43 mM⁻¹cm⁻¹.

2.5.4. Determinación de proteína

El contenido de proteína de los cultivos de microalgas y de *Rhodospirillum rubrum*, se determinó en células enteras siguiendo la modificación de Markwell del método de Lowry (Markwell *et ál.* 1987). Cantidades variables de muestra se suplementaban con agua hasta un volumen de 0,2 ml, añadiendo 50 µl de NaOH 0,5M y 750 µl de una mezcla en proporción 100:1 de las disoluciones A y B que se detallan a continuación:

Disolución A

Na₂CO₃ 2% (p/v)

NaOH 0,4% (p/v)

Tartrato sódico potásico 0,16% (p/v)

SDS 1% (p/v)

Disolución B

CuSO₄·5H₂O 4% (p/v)

Tras incubar 15 min a 30°C, se añadían 75 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck) diluido al 50% (v/v) en agua, incubándose de nuevo 30 min a 30°C. A

continuación, se medía la absorbancia a 750 nm en cubetas de 1 ml, usándose en cada medida una curva patrón con cantidades conocidas de ovalbúmina (OVO)

El contenido en proteína de los extractos libres de células y de las preparaciones de membrana se determinaba siguiendo el método de Bradford (1976). Las muestras se suplementaban con agua hasta un volumen de 0,8 ml y con 0,2 ml de reactivo de determinación de proteínas (BIO-RAD), incubándose las mezclas 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se medía la absorbancia de las mismas a 595 nm, usándose un patrón de OVO para el cálculo de las concentraciones finales.

La concentración de las fracciones de proteína de *Thermotoga maritima* obtenidas tras su extracción desde geles de poliacrilamida se estimó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm (Layne 1957).

2.5.5. Medidas de pH

El pH de las disoluciones se determinó utilizando un pH-metro marca CRISON modelo “Micro pH 2001”.

2.6. Métodos de purificación y caracterización de proteínas

2.6.1. Purificación de proteínas por cromatografía de ion-quelante

Para la purificación de péptidos mediante cromatografía en columnas cargadas con metales divalentes, se obtuvieron distintas construcciones en plásmidos de expresión, que contenían la secuencia codificante del péptido en cuestión con un grupo de seis histidinas en su extremo amino-terminal. Estas construcciones se expresaron en *Escherichia coli* o en *Saccharomyces cerevisiae*, según se indica en el capítulo de Resultados y los extractos o preparaciones de membrana se obtuvieron según los protocolos expuestos en el apartado 2.3.

2.6.1.1. Cromatografía de ion-quelante en columnas cargadas con Cu²⁺

Para la cromatografía de ion-quelante en columnas cargadas con Cu²⁺, se emplearon columnas HiTrap[®] affinity columns (Pharmacia Biotech) de 1 ml de volumen de lecho, que presentan una matriz de perlas de agarosa sobre las que se fija ácido imidodiacético mediante formación de enlaces tipo éter. Dichas columnas deben ser cargadas con el metal divalente deseado antes de su uso. Para ello, se acoplaron las columnas, a través de un adaptador adecuado, a jeringas de 5 ml de volumen, que se cargaban sucesivamente con agua y CuSO₄ 1 M. Una vez cargada la columna, se introducía la misma en un sistema de cromatografía de proteínas de FPLC (Pharmacia Biotech), funcionando en este caso a la presión atmosférica, y se lavaba con 5 volúmenes de **tampón de trabajo** (fosfato sódico 20 mM [pH 7,0], NaCl 200 mM), antes de la inyección de la muestra (1 ml). Tras la inyección, se lavaba una vez con 5 volúmenes de tampón de trabajo y otra con el mismo tampón suplementado con 20 mM de imidazol [pH 7,0]. Para la elución se empleó un gradiente continuo de imidazol desde 20 hasta 150 mM. Una vez concluida la elución, la columna se limpiaba mediante un flujo de disolución 1 M de imidazol en el tampón de trabajo y se separaba del aparato de FPLC. Todos los lavados de la columna se hicieron a flujos constantes de 1 ml/min y las etapas de inyección de la muestra y elución se realizaron a 0,2 y 0,5 ml/min respectivamente. Con la ayuda de una jeringa de 5 ml, se eliminaban los iones de Cu²⁺ haciendo pasar un flujo de EDTA 50 mM en tampón de trabajo, se lavaba la columna con agua destilada y se equilibraba con etanol al 20% (v/v), antes de su almacenamiento a 4°C.

2.6.1.2. Cromatografía de ion-quelante en columnas cargadas con Ni²⁺

En este caso, las muestras solubilizadas se incubaban con una matriz de perlas de agarosa unidas a ácido nitriloacético en su superficie, cargada con iones de Ni²⁺ (Ni-NTA Agarose, Qiagen), que, previamente, había sido lavada dos veces con **tampón de lavado 1** (MES 50 mM [pH 6,5], glicerol 20% [v/v], KCl 500 mM, imidazol 25 mM [pH 6,5], PMSF 2 mM, pepstatina 2 mM, n-dodecil-β-D-maltopiranosido [DDM] 0,15% [p/v]). Las muestras solubilizadas se diluían a la mitad (40 veces en los experimentos finales) con

tampón de lavado con DTT 1 mM y se incubaban con la matriz en tubos de plástico de 50 ml, durante 16-24 h a 4°C o a temperatura ambiente y con agitación suave, tras lo cual, se centrifugaba (3000xg, 5 min, 4°C) y se lavaba la matriz tres veces con tampón de lavado, dos veces con **tampón de equilibrado** (MES 50 mM [pH 6,5], glicerol 20% (v/v), KCl 250 mM, imidazol 25 mM [pH 6,5], PMSF 2 mM, pepstatina 2 mM, DTT 1 mM, DDM 0,15% [p/v]) y dos veces más con **tampón de lavado 2**, idéntico al tampón 1, pero con KCl 50 mM. La elución se realizaba incubando la matriz lavada con 2 ml de **tampón de elución** (MES 50 mM [pH 6,5], glicerol 20% [v/v], KCl 50 mM, imidazol 500 mM [pH 6,5], PMSF 2 mM, pepstatina 2 mM, DTT 1 mM, DDM 0,075% [p/v]), durante 5 min a 4°C con agitación. A continuación, en una jeringa de 2,5 ml se colocaba lana de vidrio, sobre la que se pipeteaba la matriz. Esta jeringa se colocaba sobre un tubo de plástico de 15 ml y se centrifugaba a 3000 rpm durante 5 min a 4°C. Para recuperar la mayor cantidad posible de matriz, el tubo de 50 ml usado para todas las incubaciones, se lavaba con 2 ml más de tampón de elución, que se transferían a la jeringa, centrifugándose como antes y uniendo las dos fracciones eluidas. Para el reciclaje de la matriz, ésta se separaba de la lana de vidrio mediante resuspensión en agua y se regeneraba y almacenaba siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.6.2. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

2.6.2.1. Preparación de las muestras

Antes de cargar las muestras en el gel, éstas se suplementaban con 0,2 volúmenes de **tampón de carga 5x** compuesto por SDS 1% (p/v), Tris-HCl 60 mM [pH 8,5] y azul de bromofenol al 0,01% (p/v) y se les añadía un 5% (v/v) de β -mercaptoetanol. En el caso de las preparaciones de membrana, la cantidad de proteína deseada se precipitaba con ácido trocloroacético (TCA) al 10% (p/v) de concentración final, manteniéndose en hielo durante 10 min antes de centrifugar en una centrífuga Eppendorf a 13000 rpm durante 5 min. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se lavaban dos veces con 1 ml de agua, incubándose en hielo y centrifugando del mismo modo. Finalmente, las muestras se

resuspendían en tampón de carga 1x y se suplementaban con un 5% (v/v) de β -mercaptoetanol. Cuando era necesario concentrar las muestras de proteína soluble, éstas se precipitaban con TCA, de manera análoga a las de membrana, pero los lavados se realizaban sucesivamente con 1 ml de mezcla etanol:éter de petróleo (1:1) y 1 ml de mezcla etanol:éter de petróleo (1:3). Tras secar unos segundos al aire, las muestras se resuspendían en tampón de carga 1x con β -mercaptoetanol. Las muestras de proteínas solubles se calentaban a 100°C durante 5 min antes de cargarlas en el gel, mientras que las de proteínas de membrana se calentaban a 65-70°C durante 2 min. En el caso de las preparaciones de proteína de *Thermotoga maritima* las muestras se cargaban en el gel sin llevar a cabo ningún calentamiento previo.

2.6.2.2. Desarrollo de la electroforesis mediante el método de Laemmli

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizaron en su mayor parte en geles de poliacrilamida que contenían dodecil sulfato sódico (SDS) según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970). El gel separador se preparaba al 10% de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 38:2) con SDS al 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,375 M [pH 8,8], y el de empaquetamiento de las muestras se preparaba al 4% (p/v) de poliacrilamida de la misma composición con SDS al 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,125 M [pH 6,8]. Los geles se polimerizaban con persulfato amónico (APS) al 0,1% (p/v), usando como agente catalizador N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) a una concentración final 6 mM. Para los trabajos realizados con la H⁺-PPasa de *Thermotoga maritima*, se usaron geles separadores al 10%, con una relación acrilamida:bisacrilamida 38:1.6.

La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 200 V para las proteínas solubles y de 100 V para las proteínas de membrana. Para las preparaciones de *Thermotoga maritima* se aplicaba un voltaje constante de 170 V. Para el desarrollo de la electroforesis, se usaban aparatos de modelos Mini-Protean II y Mini-Protean III (BIO-RAD), utilizando como **tampón de electroforesis de proteínas** una disolución que contenía Tris-HCl 25 mM, glicina 0,32 M [pH 8,3] y SDS al 0,1% (p/v).

2.6.2.3. Desarrollo de la electroforesis mediante el método de Schägger y von Jagow

Para la separación de proteínas de movilidad electroforética pequeña (Mm relativa entre 5-30 kDa), se usó el método descrito por Schägger y von Jagow (1987). Este sistema discontinuo permite la resolución de péptidos de pequeño tamaño mediante la utilización de tres geles de poliacrilamida sucesivos: i) gel de empaquetamiento (4% T, 3% C); ii) gel espaciador (10% T, 3% C); y iii) gel separador (16,5% T, 3% C), donde T es la concentración total de acrilamida más bisacrilamida (p/v) y C es el porcentaje de la concentración de bisacrilamida con respecto a la concentración total. El gel de empaquetamiento se preparaba en tampón Tris-HCl 0,744 M [pH 8,45] con SDS al 0,0744% (p/v) y los geles espaciador y empaquetador, en tampón Tris-HCl 1 M [pH 8,45] con SDS al 0,1% (p/v). El gel separador se suplementaba además con un 10,7% de glicerol (v/v). La polimerización de los geles se llevó a cabo mediante la adición de APS y TEMED en concentraciones finales del 0,1% (p/v) y 6 mM, respectivamente. En algunos casos, se omitió el gel espaciador, no necesario para péptidos mayores de 5 kDa.

La electroforesis se llevó a cabo en los aparatos descritos en el apartado anterior, a un voltaje inicial de 30 V. Una vez que las muestras habían recorrido el gel de empaquetamiento, el voltaje se aumentaba hasta 85 V. Como **tampón del ánodo** se usó Tris-HCl 0,2 M [pH 8,9] y como **tampón del cátodo**, una disolución 0,1 M de Tris y 0,1 M de tricina, cuyo pH está en torno a 8,25. En este caso, los patrones de peso molecular usados fueron Pre-stained Molecular Weight Markers (Low Range) (BIO-RAD).

2.6.2.4. Teñido de los geles

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se teñían sumergiendo los geles durante 30 minutos en una disolución de azul de Coomassie “Brilliant Blue R” al 0,1% (p/v) en una mezcla 5:4:1 de agua:etanol:ácido acético (v/v/v). Los geles se lavaban a continuación con esta mezcla para retirar el exceso de colorante y para su posterior mantenimiento se secaban entre dos láminas de celofán durante 24 h o mediante una placa calefactora conectada a un sistema de vacío.

En el caso de la extracción de la proteína de *Thermotoga maritima* de los geles de poliacrilamida, éstos se teñían según el procedimiento descrito por Fernández-Patrón *et al.* (1995). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se lavaban unos segundos con agua y se sumergían durante 10 min en una disolución de imidazol 0,2 M. Tras retirar esta disolución, los geles se mojaban con ZnSO₄ 0,2 M durante 30 seg, se lavaban con agua tres veces durante 15 seg y se procedía a cortar las bandas de proteína deseadas. Este método provoca una tinción "negativa" del gel de poliacrilamida, mediante la formación de un complejo poliacrilamida-imidazol-Zn de color blanquecino. De este modo, las zonas del gel en que existen bandas de proteína permanecen transparentes, mientras el fondo del gel se vuelve de color blanco. La sensibilidad de este método es mayor que la de la tinción con Coomassie, descrita anteriormente, pudiendo detectarse hasta 30-50 femtomoles de proteína, frente a los 1-2 picomoles detectados con la tinción azul (Fernández-Patrón *et al.* 1995).

Para determinar la movilidad electroforética relativa de las proteínas en estudio, se usaron patrones preteñidos See Blue[®] Pre-stained Standards (Novex) y Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range (BIO-RAD). Ambos consisten en una serie de péptidos naturales unidos a un colorante azul, cuyas masas moleculares relativas varían entre los 210 kDa de la miosina y los 7 kDa de la aprotinina, en el caso de los patrones de BIO-RAD y los 4 kDa de la cadena β de la insulina, en el caso de los de Novex. Antes de ser cargados en los geles de poliacrilamida, los patrones de Novex se hervían a 100° C durante 3-5 min. Los patrones de BIO-RAD se mantenían a -20°C y se descongelaban inmediatamente antes de cargarlos en el gel, sin ningún tratamiento previo.

2.6.3. Extracción de proteínas de geles de poliacrilamida mediante electroelución

Tras la electroforesis, las bandas teñidas con Coomassie correspondientes al péptido deseado se cortaban en tiras de aproximadamente 1 x 4 mm, procurando que el corte fuese lo más limpio posible. Estos fragmentos se sometieron a electroelución, usando un aparato modelo Elucon de la marca Biometra. El canal de electroelución se cerraba usando una membrana de exclusión de 20 kDa y el sistema se rellenaba con tampón de electroforesis de proteínas (apartado 2.6.2.2) diluido a la mitad, eliminando

todas las burbujas que pudieran existir en la zona próxima a la membrana. Los fragmentos de poliacrilamida se situaban cuidadosamente en el borde del canal y se aplicaba un campo eléctrico de 200 V. Una vez finalizada la electroelución, que podía seguirse gracias al colorante de Coomassie presente en las tiras de gel, la proteína se retiraba del fondo del canal con la ayuda de una pipeta Pasteur, procurando arrastrar la menor cantidad de tampón posible.

Fracciones de 1 μ l de las muestras se sometían a electroforesis junto con cantidades conocidas de un péptido de 7 kDa que se usaba como referencia. Tras tinción con Coomassie, se estimaba la concentración de las mismas por comparación de la intensidad de las bandas-problema con la de las bandas de la referencia.

2.6.4. Extracción de proteínas de geles de poliacrilamida mediante "difusión pasiva"

Tras ser sometidas a electroforesis y tinción con el método de Fernández-Patrón *et al.* (1995), las bandas correspondientes a la proteína deseada se cortaban de los geles de poliacrilamida y se homogeneizaban usando una homogeneizadora de mano en **tampón de extracción** que contenía Tris-HCl 100 mM [pH 8,3], DTT 100 mM, SDS 0,1% (p/v) y DDM 0,01% (p/v), formando una especie de papilla. Fracciones de 1 ml de esta papilla se agitaban a 37°C y 200 rpm en tubos de 2 ml de capacidad durante 16 h, tras lo cual las muestras se centrifugaban a 13000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se retiraban a tubos limpios, mientras que a los precipitados de poliacrilamida se les añadían 500 μ l del tampón anterior y se repetía la incubación durante 24 horas.

Los sobrenadantes que contenían la proteína extraída de poliacrilamida se precipitaban, en un volumen de 2 ml, con TCA a una concentración final del 10% (p/v). Tras incubar 15 min en hielo, las muestras se centrifugaban durante 10 min y el precipitado proteico se lavaba una vez más con TCA al 10% (p/v) para eliminar restos de detergente que podrían solubilizar parte de la proteína durante el resto del proceso. Tras incubar y centrifugar como antes, se repetía por dos veces el lavado con 1 ml de agua destilada y el precipitado final se resuspendía en **tampón de resuspensión** (Tris-HCl 50 mM [pH 8,3], DTT 10 mM, SDS 0,1% [p/v], DDM 0,01% [p/v]).

Para comprobar las muestras, fracciones de 1 μ l se corrían en geles de poliacrilamida según se describe en el apartado 2.6.2.2 y se teñían con Coomassie. La cuantificación de las mismas se realizaba mediante medida de absorbancia ultravioleta a 280 nm, usando disoluciones de seroalbúmina bovina (BSA) de concentración conocida como referencia para la estimación.

2.7. Métodos inmunológicos e inmunocitoquímicos

2.7.1. Obtención de anticuerpos policlonales en conejo

La obtención de anticuerpos policlonales se llevó a cabo a través del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Un conejo albino macho de raza neozelandesa de 2 kg de peso fue sometido a inmunización mediante la inyección de 600 μ g de proteína purificada en 500 μ l de uno de los tampones definidos en los apartados 2.6.3 y 2.6.4 (según el método usado para la extracción del gel de poliacrilamida), mezclada con un volumen de coadyuvante completo de Freund. Previamente a esta inyección, se extrajeron 10 ml de sangre, que sirvieron para preparar el suero preinmune. Veintiún días después de la primera inyección, se realizó una segunda con 300 μ g de proteína. Tras quince días, se extrajeron 10 ml de sangre para comprobar la reacción inmune y se inyectaron otros 200 μ g de proteína. Finalmente, quince días después de la tercera inyección el conejo se sacrificó y exanguinó.

Los sueros recibidos del Centro de Producción y Experimentación animal, se suplementaron con azida sódica al 0,02% (p/v), se repartieron en fracciones de 1 ml y se guardaba a -80°C. Las fracciones de uso más frecuente se guardaron a -20°C.

2.7.2. Transferencia de proteína a membranas de nitrocelulosa

Para la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa se utilizó un aparato de transferencia semi-seca Biometra “Fast-flow B32” de la marca Braun Biotech (Alemania). Tras la electroforesis de las muestras de proteína, el gel de poliacrilamida se colocaba sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μ m de diámetro de poro

previamente humedecidos con tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM [pH 8,3], glicina 192 mM y metanol 20% [v/v]). Por encima del gel y por debajo de la membrana, se colocaban papeles 3 MM Chr (Whatman) humedecidos en el mismo tampón de transferencia, algo más grandes que el tamaño de la membrana.

La transferencia se llevaba a cabo poniendo en contacto las dos placas de grafito del aparato, humedecidos en tampón de transferencia, con los papeles Whatman de recubrimiento y sometiendo el “sandwich” a una corriente máxima de 2,5 mA/cm² durante aproximadamente 40 min. La membrana se teñía a continuación durante unos minutos con una disolución de colorante rojo Ponceau al 0,2% (p/v) disuelto en una disolución acuosa de TCA al 3% (p/v), tras lo cual se lavaba con abundante agua, quedando las proteínas transferidas a la membrana teñidas de color rojo, con lo que podía comprobarse la eficiencia de la transferencia.

2.7.3. Inmunodetección por Western Blot

La membrana con las proteínas fijadas se incubaba en **tampón TBS** (Tris-HCl 20 mM [pH 7,5], NaCl 150 mM), que contenía leche desnatada en polvo entre el 2 y el 5% (p/v) durante al menos 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadía suero inmune en una dilución apropiada y se incubaba con agitación a temperatura ambiente durante 16-18 h con azida sódica al 0,02% (p/v) para evitar contaminaciones. Tras esta primera incubación, la membrana se lavaba tres veces durante 15 min con la misma disolución de leche en polvo en TBS y se incubaba durante al menos 1 h con una dilución 1:1000 de anticuerpos secundarios (anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados a peroxidasa de rábano [Boehringer Mannheim]) en TBS. Tras la segunda incubación la membrana se lavaba dos veces durante 15 min con TBS suplementado con 0,05% (v/v) de Tween-20 y una última vez durante el mismo tiempo con TBS sin detergente y se revelaba en una mezcla que contenía 50 ml de TBS, 30 mg de 4-cloro-1-naftol (disuelto en 10 ml de metanol) y 25 µl de una disolución al 33% (v/v) de H₂O₂ en agua. Tras incubación durante varios minutos protegido de la luz directa, aparecían bandas oscuras sobre el fondo blanco de la membrana, que correspondían al precipitado resultante de la actividad peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario, que a su vez se encontraba

unido al anticuerpo de conejo que reconocía la proteína de estudio. La reacción se paraba con agua abundante y las membranas se secaban sobre papel Whatman.

2.7.4. Microscopía de inmunofluorescencia

La fijación y la tinción inmunofluorescente se llevaron a cabo por el procedimiento de Pringle *et ál.* (1991). Las células crecidas durante 16-24 horas en un medio adecuado, se fijaban mediante la adición en el propio medio de cultivo de formaldehído a una concentración final del 4-5% (v/v). Tras incubar entre 2 y 30 min a temperatura ambiente, las células se recogían por centrifugación, se resuspendían en tampón que contenía fosfato potásico 50 mM [pH 6,5], MgCl₂ 0,5 mM, formaldehído 4-5% (v/v) y se mantenían a temperatura ambiente durante 2-4 h. A continuación, se lavaban las células con una disolución que contenía fosfato potásico 50 mM [pH 7,5] y sorbitol 1,2 M, para eliminar el formaldehído, y se resuspendían en 1 ml de la misma disolución, añadiendo 2 µl de β-mercaptoetanol y 20 µl de Zymolyase (Zymolyase 100T, ICN Immunobiologicals) diluída en agua a una concentración de 1 mg/ml. Tras incubar 30 min a 37°C con agitación suave, las células se centrifugaban a baja velocidad y se lavaban una vez más con la misma disolución, resuspendiéndolas finalmente en 1 ml de la misma. Las placas de inmunofluorescencia se trataron con una disolución de polilisina (Sigma Chemical co.) a 1 mg/ml y se lavaron con agua y secaron, antes de depositar en cada pocillo 10 µl de la suspensión de células. Tras 10 s, se retiró el líquido y se dejó secar al aire. La permeabilización de las células se consiguió mediante inmersión en metanol a -80°C durante 6 min y, a continuación, en acetona a -80°C durante 30 s. Las células se trataron con un anticuerpo policlonal, purificado por afinidad, contra la H⁺-PPasa de *Rhodospirillum rubrum*, donado por la profesora M Baltscheffsky (Universidad de Estocolmo).

2.8. Métodos genéticos de manipulación del DNA

2.8.1. Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo y que no se construyeron durante la realización del mismo se encuentran detallados en la tabla V.

TABLA V: Plásmidos utilizados

Plásmido	Características	Ref./Casa comercial
pBluescript (pBS) KS ⁺ /SK ⁺	Vectores de clonación con sitios de unión de cebadores de secuenciación comerciales	Stratagene
pGEM-T [®]	Vector de clonación y secuenciación para productos de PCR	Promega
pRS1024	Vector de expresión de levadura que contiene el promotor y el terminador constitutivos PMA-1 y como marcador de selección el gen LEU-2 (selección por crecimiento en ausencia de leucina)	Villalba <i>et ál.</i> 1992
pJR1	Vector de expresión de levadura que contiene el promotor inducible GAL-1 y el terminador PMA-1 y como marcador de selección el gen URA-3 (selección por crecimiento en ausencia de uracilo)	Pérez-Castiñeira <i>et ál.</i> 2001
pRS-699	Vector de expresión de levadura que contiene el promotor y el terminador constitutivos PMA-1 y como marcador de selección el gen URA-3 (selección por crecimiento en ausencia de uracilo)	Serrano y Villalba 1995
pSI104	Vector de selección positiva para la transformación de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mediante resistencia a Paromomicina (derivado de pSI103 [Sizova et al. 2003])	Prof. Emilio Fernández
pAD35	Vector que contiene el fragmento de DNA genómico de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> que contiene el promotor, el gen y el terminador de la Nitrato reductasa	Prieto <i>et ál.</i> 1996

pQE-9	Vector comercial que permite la sobreexpresión en <i>E. coli</i> y purificación de péptidos mediante la adición a los mismos de un grupo de seis histidinas en el extremo amino-terminal.	QIAGEN
pSUP202	Vector integrativo para la inserción de fragmentos de DNA en <i>Rhodospirillaceas</i> .	Simon <i>et ál.</i> 1983

2.8.2. Métodos de transformación genética

En la mayor parte del trabajo realizado, las células competentes de *E. Coli* se obtenían directamente del Servicio de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Universidad de Sevilla-CSIC). Durante el trabajo de purificación de la H⁺-PPasa de *Thermotoga maritima*, las bacterias de la estirpe XL1-Blue de *E. Coli* se hicieron competentes para la transformación por alguno de los métodos que se detallan a continuación.

2.8.2.1. Preparación de células de *E. coli* para transformación por electroporación

Las células de *E. coli* se crecían desde placa en matraces de 1 l que contenían 400 ml de medio LB a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 660 nm en torno a 0,4-0,5. Tras 10 min en hielo, el cultivo se recogía por centrifugación a 3500xg durante 5 min a 4°C y se resuspendía en 20 ml de agua estéril a 0°C. Tras otra incubación de 10 min en hielo, se centrifugó como antes y las células se resuspendieron en 2 ml de glicerol al 10% en agua, se dividieron en fracciones de 100 µl y se guardaron a -80°C tras congelación en nitrógeno líquido.

2.8.2.2. Transformación de *E. coli* por electroporación

Para la transformación, 100 µl de células competentes previamente descongeladas se mezclaban con el DNA deseado en un volumen de 1 µl y se mantenían en hielo 1 min, tras lo cual se transferían a cubetas de electroporación de 1 cm (BIO-RAD), previamente

enfriadas en hielo al menos durante 1 min, y se sometían a la acción de un pulso eléctrico de 2500 V. Inmediatamente, se añadía 1 ml de LB y se transfería la suspensión celular a un tubo de 1,5 ml de volumen, incubándose a 37°C sin agitación durante 1 h. Posteriormente, 500 µl de esta suspensión celular se extendían sobre medio sólido LB con antibiótico y se dejaban secar.

2.8.2.3. Preparación de células de *E. coli* para transformación por choque térmico

Para la preparación de células para la transformación por choque térmico, se desarrollaron cultivos de 400 ml en matraces de 1 l que se crecían a 37°C y 200 rpm hasta densidad óptica a 600 nm en torno a 0,4-0,5 (aproximadamente 90 min). Tras 15 min en hielo, el cultivo se centrifugaba (3000xg, 5 min, 4°C) y las células se lavaban con 200 ml (1/2 volumen) de CaCl₂ 100 mM a 0°C, manteniendo 30 min en hielo. Tras centrifugar como antes, las células se resuspendían en 8 ml (1/50 volúmenes) de CaCl₂ y se mantenían en hielo durante una hora, agitando suavemente de forma ocasional. Finalmente, se añadía PEG-8000 hasta una concentración final del 10% (v/v) y se distribuía la mezcla en fracciones de 100 µl en tubos de 1,5 ml preenfriados, que se congelaban en nitrógeno líquido y se guardaban a -80°C.

2.8.2.4. Transformación de *E. coli* por choque térmico

La transformación de células competentes por choque térmico se realizaba añadiendo a la suspensión celular, previamente descongelada, el DNA en un volumen máximo de 10 µl. Tras 15 min de incubación en hielo, se sometían a un choque térmico a 42°C durante 2 min, se incubaban en hielo durante 2 min más y se les añadían entre 400 µl y 1 ml de medio LB, incubando entre 30 min y 1 h a 37°C. Finalmente, las células se centrifugaban en centrífuga Eppendorf a 8000 rpm durante 30 s y, tras eliminar la mayor parte del sobrenadante, se sembraban en placas de medio LB con antibiótico.

2.8.2.5. Transformación de levaduras

Las levaduras se transformaron usando la modificación de Schiestl y Gietz (1989) del método del litio. Cultivos de 100 ml de la estirpe de levadura deseada se crecían durante una noche en medio rico, se centrifugaban y lavaban con LiTE (acetato de litio 0,1 M, Tris-HCl 10 mM [pH 7,6], EDTA 1 mM). Tras centrifugar de nuevo, las células se resuspendían en 0,5 ml de LiTE y se incubaban a 30°C durante 15 min. A continuación, se les añadían 100 µl de DNA de esperma de arenque o salmón al 1% (p/v), fragmentado para reducir su viscosidad y desnaturalizado por calentamiento. La preparación se dividía en fracciones de 100 µl que se usaban directamente para la transformación, o bien se suplementaban con 25 µl de glicerol estéril al 80% y se guardaban inmediatamente a -80°C hasta su uso.

Para la transformación, 5 µg de DNA se mezclaban con 100 µl de suspensión celular y se les añadían 600 µl de una disolución de LiTE suplementada con 40% (p/v) de polietilenglicol (PEG-LiTE). Esta mezcla se incubaba en un baño a 30°C durante 30 min y, posteriormente, se sometía a un choque térmico a 42°C durante 20 minutos. Tras 2 min en hielo, las células se sedimentaban mediante centrifugación durante 15 seg a 13000 rpm y se descartaba el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendía en 100 µl de agua estéril y se extendía en placas de medio selectivo.

2.8.2.6. Transformación de *Rhodospirillum rubrum* por choque térmico

Para esta transformación, se usó el protocolo de Fitzmaurice y Roberts (1991). Las células del mutante UR2, se crecían hasta saturación (aproximadamente 16 horas) en el medio SMN suplementado con un 0,3% (p/v) de hidrolizado enzimático de caseína, tal como se describe en el apartado 2.1.1.2. A continuación, se centrifugaban los cultivos (6000xg, 8 min) y se resuspendían en ½ volumen de CaCl₂ 200 mM a 0°C, incubando 10 min en hielo. Tras recoger por centrifugación una vez más, las células se resuspendían en 1/5 del volumen de partida de CaCl₂ 200 mM a 0°C y se dividían en fracciones de 500 µl en tubos de 1,5 ml preenfriados a 0°C. El DNA se añadía en un volumen de 5 µl de agua y la mezcla se mantenía en hielo durante otros 10 min. Las células se sometían entonces a

un choque térmico de 2 min a 37°C, manteniéndolas a continuación 1 min en hielo, antes de inocularlas en 5 ml de medio líquido SMN e incubarlas a 30°C durante 5h (200 rpm) para permitir la expresión de los genes de resistencia a antibiótico. Finalmente, estos cultivos se concentraban por centrifugación y se extendían en placas de medio SMN suplementado con antibióticos. De forma paralela, se tomaban muestras de cada cultivo y se diluían, realizando goteos sobre placas sin antibiótico para comprobar el número de células viables en cada uno de ellos.

2.8.2.7. Transformación de *Rhodospirillum rubrum* por conjugación

Esta transformación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Liang *et ál.* (1991). Células de la estirpe S17-1 de *E. coli* se transformaban por electroporación con el plásmido deseado y, tras seleccionar en placas con antibiótico, se crecían hasta la mitad de la fase exponencial en medio líquido LB. Fracciones de 0,1 ml de este cultivo, se mezclaban suavemente con un volumen idéntico de un cultivo aeróbico fresco de *R. rubrum* (crecido durante 16 h). A continuación, se centrifugaba brevemente y se eliminaba la mayor parte del sobrenadante, resuspendiendo las células en, aproximadamente, 10 µl del medio restante, para extenderlas en una membrana estéril (25 mm espesor, 0,45 µm de tamaño de poro) sobre una placa de medio SMN, incubando 24 h a 30°C. Finalmente, las células se resuspendían en 1 ml de medio MN agitando con vórtex y se extendían sobre placas de este medio suplementado con los antibióticos adecuados.

2.8.2.8. Transformación de *Chlamydomonas reinhardtii*

Las transformaciones de *C. reinhardtii* se llevaron a cabo en el laboratorio del Prof. Emilio Fernández, de la Universidad de Córdoba, usando una modificación del protocolo de Kindle (1990). Las células del mutante sin pared 704 se crecían en medio TAP con amonio hasta alcanzar la fase estacionaria (5-6 días), sin agitación. El cultivo se centrifugaba a 3000 rpm durante 1 min y se resuspendía en medio mínimo con amonio, concentrándolo 100 veces. En tubos de 10 ml, se preparaba una mezcla con 500 µl de perlas de vidrio (0,4-0,6 mm, Braun Biotech International), 100 µl de PEG-8000 al 20%

(p/v), 900 µl de cultivo concentrado de *C. reinhardtii*, a la que se añadían 100 ng del plásmido pSI104, que confiere resistencia al antibiótico paromomicina a las células transformadas, y 500 ng del plásmido cuya inserción deseaba obtenerse. Esta mezcla se agitaba en vórtex durante 8 segundos y se diluía añadiendo 5 ml de medio mínimo sin amonio, centrifugando y descartando el sobrenadante. A continuación, las células se resuspendían en 5 ml del medio anterior, dejando decantar las perlas de vidrio. La suspensión celular se transfería entonces a un tubo de plástico, se diluía hasta 50 ml con medio de cultivo y se incubaba en luz continua durante, al menos, 5 ó 6 h para permitir la expresión de la resistencia a antibiótico. Finalmente, el cultivo se concentraba por centrifugación hasta aproximadamente 0,5 ml y se extendía sobre placas de medio sólido TAP amonio suplementadas con paromomicina a razón de 25 µg/ml.

2.8.3. Aislamiento del DNA

2.8.3.1. Aislamiento de plásmidos de *E. coli* a pequeña escala

Las minipreparaciones de plásmido de *E. coli* se obtenían mediante un procedimiento de purificación por “lisis alcalina”, según una modificación del protocolo de Towner (1991). El cultivo de células, crecido toda la noche a 37°C, se recogía por centrifugación (2 min a 8000xg) en tubos de 1,5 ml y el precipitado celular se resuspendía en 100 µl de **disolución I** (Tris-HCl 25 mM [pH 8], glucosa 50 mM, EDTA 10 mM [pH 8]). A continuación, se añadían 200 µl de **disolución II** (NaOH 0,2 N, SDS 1% [p/v]) y se mezclaban las muestras invirtiendo los tubos varias veces, produciéndose la lisis celular. Para neutralizar, se añadían 150 µl de **disolución III** (acetato potásico 5 M [pH 4,8]) y se volvía a mezclar invirtiendo los tubos varias veces. A continuación, se realizaba una extracción con una mezcla 25:24:1 (v/v/v) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (USB, Pharmacia) -en adelante PCI- y las fases se separaban por centrifugación a 13000 rpm durante 2 min en centrífuga Eppendorf, quedando una fase orgánica inferior, separada de la fase superior acuosa por una “pastilla” blanca, que contenía los restos celulares y las proteínas desnaturalizadas. Los ácidos nucleicos se precipitaban de la fase acuosa mediante la adición de 1 ml de etanol absoluto. Tras centrifugación a 12000xg durante 5-

10 min, el precipitado se lavaba con 1 ml de disolución de etanol al 70% (v/v) en agua, se centrifugaba como antes y, tras eliminar el sobrenadante, se secaba al aire unos minutos. Finalmente, los ácidos nucleicos se resuspendían en 20 μ l de agua MilliQ que contenía un 0,05% de RNasa (p/v) (Sigma Química). Cuando era necesaria una muestra más limpia del plásmido (p.e. para su secuenciación), las preparaciones se filtraban en una columna Microspin™ S-200 de la marca Amersham Biosciences.

2.8.3.2. Aislamiento de DNA de plásmido de cadena simple

Una colonia aislada de *E. coli* que contenía el plásmido con la construcción deseada se cultivaba durante toda la noche a 37°C y 200 rpm en 1 ml de medio LB con antibiótico. A la mañana siguiente, 100 μ l de este cultivo se usaban para inocular 2 ml de medio 2xYT con antibiótico y se dejaba crecer durante 4-5 h hasta una densidad óptica a 600 nm en torno a 0,5. En este punto, el cultivo se refrescaba, inoculando 25 μ l del mismo en 2 ml de 2xYT suplementado con ampicilina y se le añadían 2 μ l de fago M13 (Amersham Biosciences). Este nuevo cultivo se incubaba en un tubo de 50 ml para asegurar una buena aireación. Tras un par de horas, se añadía kanamicina a una concentración final de 70 μ g/ml y se incubaba durante 16-24 horas a 37°C con agitación. Finalmente, el cultivo se centrifugaba a 9000 rpm durante 5 min y se tomaba el sobrenadante para la preparación del DNA de cadena simple.

A 1 ml del sobrenadante anterior se le añadían 150 μ l de una disolución de PEG 8000 al 20% y NaCl 2,5 M, mezclando por inversión. Tras 15 min en hielo, se centrifugaba y se descartaba el sobrenadante, procurando eliminar la mayor parte posible del mismo. El precipitado se resuspendía en 100 μ l de **tampón TE** (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8,0]), agitando vigorosamente en un vórtex. A continuación, se añadían 50 μ l de PCI y se realizaban dos ciclos de agitación en vórtex durante 30 segundos y 1 minuto de reposo a temperatura ambiente. Las dos fases se separaban mediante centrifugación durante 5 min a 13000 rpm, y al sobrenadante se le añadían 300 μ l de mezcla 25:1 de etanol absoluto: acetato sódico 3 M [pH 5,2]. Tras incubar 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaba durante 10 min y el precipitado de DNA

de cadena simple se lavaba con etanol al 70% en agua (v/v), se secaba al aire unos minutos y se resuspendía en 15 μ l de agua de calidad MilliQ.

2.8.3.3. Aislamiento de DNA genómico de microalgas eucarióticas

El aislamiento de DNA total de microalgas eucarióticas se llevó a cabo mediante una modificación del método de Doyle y Doyle (1990) para la extracción de DNA de plantas, empleando el detergente catiónico CTAB (bromuro de hexadecil-trimetil-amonio, H-5882, Sigma Chemical co. EEUU).

Las células de la microalga, alrededor de 1 g de peso fresco, se congelaban a la temperatura del nitrógeno líquido y se rompían por trituración hasta obtener un polvo muy fino. A continuación se vertían sobre 5 ml de una disolución de **tampón CTAB** precalentada a 65°C (Tris-HCl 20 mM [pH 8,8], NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% [p/v]) al que se añadían 50 μ l de β -mercaptoetanol. La mezcla se incubaba 15-30 min en un baño a 65°C con agitación suave, tras lo cual se extraía con 5 ml de PCI. Tras centrifugar 5 min a 2000 rpm en una centrifuga de rotor basculante (Heraeus, Alemania), el sobrenadante se precipitaba con 2/3 del volumen de isopropanol, se incubaba unos minutos a temperatura ambiente y se volvía a centrifugar como antes, retirando el sobrenadante. Finalmente, el precipitado se lavaba 20-30 minutos con etanol al 70% (v/v) y acetato amónico 10 mM, de manera que se eliminaba la mayor parte del CTAB, se centrifugaba a 2000 rpm 5 min y el precipitado se dejaba secar unos minutos a temperatura ambiente. El precipitado seco se resuspendía en 500 μ l de agua MilliQ con RNasa y, tras incubar 20 min a 37°C, la RNasa se eliminaba mediante extracción con PCI y el DNA genómico se reprecipitaba con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y 0,7 volúmenes de isopropanol. Tras una nueva centrifugación, el DNA se resuspendía en 500 μ l de agua MilliQ y se precipitaba con una mezcla de 6 volúmenes de etanol absoluto y 1 volumen de acetato amónico 7,5 M. Tras centrifugar una vez más, el precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se dejaba secar brevemente y se resuspendía en volúmenes variables de agua MilliQ.

Para el análisis por Southern y Northern Blot de los mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* obtenidos en el transcurso de esta Tesis Doctoral, se utilizó un protocolo de

extracción que permitía el aislamiento fraccionado simultáneo del DNA y el RNA y que se detalla en el punto 2.10.

2.8.3.4. Aislamiento de DNA genómico de bacterias fotosintéticas

Para el aislamiento de DNA total de bacterias fotosintéticas se utilizó una modificación del procedimiento de Fitzmaurice *et ál.* (1989), los cultivos se recogían por centrifugación y se resuspendían (0,25-0,5 g de peso fresco) en 525 µl de **tampón TE25** (Tris-HCl 25 mM [pH 8], EDTA 1mM [pH 8]), a los que se añadían 60 µl de SDS 10% (p/v), 1 µl de RNasa al 1% (p/v) y 3 µl de disolución de proteinasa K al 2% (p/v). Tras incubar a 37°C hasta que la disolución se volvía completamente transparente (en torno a 30 minutos), se añadían 300 µl de cloroformo y se mezclaba por agitación. Posteriormente, se centrifugaba a 12000xg durante 4 min y al sobrenadante se le añadían 500 µl de PCI. A continuación, se centrifugaba una vez más y el sobrenadante se precipitaba con 0,8 volúmenes de isopropanol y 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M [pH 5,3]. Tras incubar unos minutos a temperatura ambiente, los ácidos nucleicos se sedimentaban por centrifugación a 12000xg durante 10 minutos, se lavaban con etanol al 70% (v/v) y se secaban al aire. Finalmente, la preparación se resuspendía en 50 µl de agua MilliQ.

2.8.3.5. Aislamiento de DNA genómico de levadura

Para este aislamiento, se usó el protocolo de Winston *et ál.* (1983). En el caso de medios de cultivo YPD e YPGal se usaron 20 ml de cultivo en fase estacionaria como material de partida, mientras que en el caso de los medios selectivos (SD y SGal) se partió de volúmenes de cultivo de 100 ml. Los cultivos se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min en tubos tipo de plástico de 50 ml, se lavaron una vez con 4 ml de **tampón SoE** (sorbitol 0,9 M, 0, EDTA 1 M [pH 8,0]) y una segunda vez con 2 ml de este tampón. Finalmente, se resuspendieron en 0,6 ml de SoE y se llevaron a un tubo de 1,5 ml. De esta suspensión celular se tomo una muestra de 5µl que se diluyó en 1 ml de **tampón TCES** (Tris 0,2 M, NaCl 0,2 M, EDTA 50 mM, SDS 2% [p/v] llevado a pH 8 con HCl),

mediéndose espectrofotométricamente la absorbancia inicial a 660 nm. Tras añadir a la suspensión 40 μ l de DTT 0,5 M y 100 μ l de Liticasa (0,8 U/ μ l, Sigma Química), las muestras se incubaban en un baño a 37°C, con inversión ocasional, hasta que la turbidez - medida tras diluir como antes- caía a menos del 10% del valor inicial, proceso que duraba en torno a 20-30 min. A continuación, se centrifugaba a 2000 rpm durante 5 min, se lavaba dos veces con 1 ml de SoE y finalmente los protoplastos se resuspendían suavemente en 400 μ l de SoE.

Un volumen de 250 μ l de la suspensión concentrada de protoplastos se añadió entonces a un tubo de 1,5 ml que contenía 1 ml de tampón TCES, 5 μ l de β -mercaptoetanol y 10 μ l de proteinasa K al 2% (p/v), mezclando bien por inversión. Esta mezcla se incubaba durante 20-30 min a 65°C con inversión ocasional para completar la lisis y se enfriaba en hielo. La mezcla se dividía en dos fracciones de unos 700 μ l y, a continuación, se extraía cada una de ellas con 750 μ l de PCI, mezclando suavemente por inversión y centrifugando a 2000 rpm durante 5 min. La fase acuosa superior (turbia), se pasaba a tubos limpios y se precipitaba con 0,6 volúmenes de isopropanol, incubando unos segundos a temperatura ambiente y centrifugando como antes. El sobrenadante se retiraba y los tubos se dejaban secar unos minutos al aire, antes de resuspender en 0,5 ml de TE o agua MilliQ y añadir 5 μ l de RNasa al 1%, incubando 20 min a 37°C. Tras tratar con 0,5 ml de PCI, centrifugar y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo, se añadieron 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5,3 y 0,75 volúmenes de isopropanol. El DNA se recogió por centrifugación a 2000 rpm durante 5 min, se lavó con etanol al 70%, se secó al aire unos minutos y se resuspendió en un volumen total de 100 μ l de agua MilliQ, calentando 5 min a 55°C para conseguir la solubilización total del DNA.

2.8.3.6. Aislamiento de DNA de cianobacterias

Para el aislamiento de DNA de cianobacterias, se usó una modificación del protocolo descrito por Cai y Wolk (1990). Las células se resuspendían en 400 μ l del tampón TCES descrito en el apartado anterior en tubos de 1,5 ml de capacidad. A continuación, se añadían 150 μ l de perlas de vidrio (0,2 μ m de diámetro) y 400 μ l de PCI y las muestras se sometían a tres ciclos de agitación en vórtex durante 1 min, con

incubaciones de 1 min en hielo entre ellos. Tras centrifugar a 12000xg durante 4 min, los sobrenadantes se precipitaban con 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubaban a -20°C durante 30 min antes de centrifugar a 12000xg durante 10 min. Los precipitados se lavaban con etanol al 70% y se secaban, antes de resuspenderlos en volúmenes variables de agua milliQ.

2.8.3.7. Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un aparato MiniCycler™ (MJ Research, EE.UU). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía tampón comercial de la enzima (1x), 0,2 mM de cada desoxirribonucleótidos (dNTPs), 50 o 100 pmol de cada oligonucleótido, 0,1-1 µg de DNA y 1 U de Taq polimerasa de distintas marcas. Los resultados de las reacciones de amplificación se analizaban en geles de agarosa según se describe en el apartado 2.8.4.1.

Amplificación de fragmentos a partir de DNA genómico. Como molde de la reacción se usaron los DNA extraídos según se ha descrito en apartados anteriores. El protocolo básico para la amplificación de fragmentos usando oligonucleótidos degenerados consistía en un tratamiento inicial de 5 min a 95°C en ausencia de enzima, tras el cual la Taq polimerasa se añadía a 72°C y se realizaban 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min para la hibridación de los oligonucleótidos a temperaturas entre 42 y 45°C y 1 min de elongación a 72°C. Finalmente, se añadía un ciclo de 10 min a 72°C para terminar la reacción. En algunos casos, se hizo necesaria la adición de DMSO en concentraciones finales entre 1-5%.

Para las amplificaciones de los fragmentos de genómico que contenían las secuencias que codifican las pirofosfatasas solubles de *Chlamydomonas reinhardtii*, se siguió un protocolo similar al anterior, pero con algunas variaciones: la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos fue de 50°C; el tiempo de elongación fue de 2 min y medio; el porcentaje de DMSO en las muestras osciló entre 4-16%, dado el alto contenido en G+C de este organismo, y el paso final a 72°C se llevo a cabo durante 30 min. En este caso se usó una polimerasa de alta fidelidad (Ecozyme, Ecogen). La amplificación de los

fragmentos de DNA genómico correspondientes al gen de la H⁺-PPasa de este organismo, se llevó a cabo usando la enzima TaqPlus DNA polimerasa (Ecogen), adecuada para la amplificación de fragmentos de gran tamaño con un alto contenido en G+C, cuya temperatura de elongación es 68°C. Los tiempos de elongación usados fueron de 10 min y las cantidades de DMSO, la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos y el tiempo de elongación en el paso final de la reacción, fueron análogos a los usados para los genes de las pirofosfatasa solubles.

Amplificación de fragmentos a partir de clones en plásmido. En este caso, de 10-100 ng de DNA de plásmido obtenido según se describe en el apartado 2.8.3.1 se usaban como molde para la reacción de PCR, que constaba de 10-15 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de hibridación de los oligonucleótidos a 45°C (50°C para *C. reinhardtii*) y tiempos de elongación a 72°C variables según el tamaño del fragmento a amplificar y las características de la polimerasa usada (1 min/kb para polimerasas normales y 2 min/kb para polimerasas de precisión). También en este caso, se añadía un paso final de 10 min a 72°C ó 30 min a esa temperatura para las polimerasas de precisión.

Amplificación de fragmentos de DNA para la búsqueda de putativos mutantes de *C. reinhardtii*. Un pequeño número de células se tomaba de placas de medio sólido, con ayuda de un asa de siembra, y se resuspendía en 20 µl de **tampón de lisis celular** (Tris-HCl 100 mM [pH 8,0], EDTA 100 mM [pH 8,0], NaCl 250 mM, SDS 0,1 % [p/v]). Las células se lisaban inmediatamente y la disolución se volvía de un color verde claro. A continuación se añadían 180 µl de agua y se mezclaba mediante agitación en vórtex. 1 µl de esta preparación se usaba directamente para la PCR, a la que se añadía rutinariamente un 2% (v/v) de DMSO.

2.8.3.8. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Por regla general, los fragmentos de DNA separados por electroforesis en gel de agarosa, tal como se describe en el apartado 2.8.4.1, se extraían del mismo mediante congelación del trozo de agarosa correspondiente a -20°C en una jeringa de 1 ml y extracción por presión de la fase líquida. Esta fase se sometía después a extracción con PCI, tras lo cual el DNA se precipitaba con 1/50 volúmenes de NaCl 5M y 2 volúmenes

de etanol absoluto y se incubaba a -20°C durante al menos 20 min. El precipitado obtenido tras centrifugación se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en 8-10 μl de agua MilliQ.

En algunos casos, la extracción se llevó a cabo usando un kit de purificación de DNA desde geles de agarosa de la marca Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.8.4. Análisis del DNA

2.8.4.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de DNA se llevaba a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa, según se describe en Sambrook *et ál.* (1989). Los geles se preparaban en **tampón TBE** (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM [pH 8,0]). La concentración de agarosa (p/v) en los geles variaba entre el 0,7% (para la separación de bandas de tamaños mayores o iguales a 1 kb) y el 1% (para bandas de peso molecular inferior a 1 kb). Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se suplementaban con **tampón de carga de DNA** compuesto por glicerol al 7,2% (v/v), EDTA 20 mM [pH 8,0], azul de bromofenol al 0,08% (p/v) y xileno-cianol FF al 0,08% (p/v). Como patrones de peso molecular se usaban los fragmentos resultantes de la digestión completa del DNA del fago lambda con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI. Las electroforesis se llevaban a cabo en aparatos horizontales de diferentes marcas y modelos, dependiendo del tamaño de gel requerido, aplicando diferencias de potencial entre 80 y 120 V. Para la separación de fragmentos de DNA provenientes de la digestión de DNA genómico para su análisis por Southern Blot, las diferencias de potencial usadas oscilaron entre 12 y 25 V. Para la detección del DNA en los geles y su visualización, éstos se suplementaban con bromuro de etidio en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La visualización de los geles y el almacenamiento de las imágenes se llevó a cabo con un transiluminador de luz ultravioleta conectado a un ordenador personal modelo BIO-PRINT[®] de la marca UVP, que permitían realizar fotografías gracias a la incorporación de una cámara de vídeo acoplada al aparato.

2.8.4.2. Determinación de la concentración y pureza del DNA

La concentración de las disoluciones de DNA se estimaba sometiendo una muestra de la misma a una electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio, tal como se indica en el apartado anterior. Una vez terminada la electroforesis, se comparaba la intensidad de la banda obtenida con la de los patrones de DNA de fago λ que se resolvían simultáneamente en el mismo gel y de los cuales se cargaba una cantidad conocida.

Para la estimación de la pureza de las preparaciones de DNA genómico, 1 μ l de las mismas se diluía hasta 0,5 ml con agua y se medía su absorbancia UV en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, tanto a 260 nm como a 280 nm. La concentración de DNA se estimaba usando el coeficiente de extinción $E = 0,2 \text{ (mg/ml)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Como criterio de pureza se usó la relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}), que para una preparación de alta pureza se encontraba entre 1,8 y 1,9.

2.8.4.3. Análisis del DNA por Southern Blot

Transferencia del DNA desde geles de agarosa a filtros de nylon. Una vez sometidos a electroforesis y con el fin de despurinizar el DNA y facilitar su transferencia, los geles se lavaban sucesivamente 20 min con HCl 0,25 M, 20 min con una disolución de NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M, 20 min con Tris-HCl 0,5 M [pH 7,5] y NaCl 1,5 M y, finalmente, 20 min con SSC 10x, que se preparaba por dilución de una solución stock de **SSC 20x** (NaCl 175,3 g/l, citrato disódico 88,2 g/l, ajustado a pH 7 con HCl 1 M). A continuación, el DNA se transfería de los geles de agarosa a membranas de Nylon sin carga, de 0,45 μ m de tamaño de poro de las marcas Pal (Biodyne A[®]) o Schleier and Schuell (Nytran[®]), mediante el procedimiento de la transferencia por capilaridad en seco (Kempter *et ál.* 1991). Una vez tratado y equilibrado en tampón SSC 10x, el gel se colocaba boca abajo sobre un papel 3MM mojado en el mismo tampón y se rodeaba de papel de parafina. Encima se colocaba la membrana de Nylon, también humedecida en SSC 10x y del mismo tamaño que el gel, eliminando cuidadosamente las burbujas de aire. Sobre la membrana se colocaban varios papeles 3MM secos cortados al mismo tamaño y, finalmente, varias capas de papel secamos formando una pila de unos 2-3 cm. Encima

del “sandwich” se colocaba una placa de vidrio con un peso de aproximadamente un cuarto de kg y se dejaba la transferencia, al menos, durante 1 ó 2 h. Una vez terminada la transferencia, el DNA se fijaba a los filtros de nylon mediante tres pulsos de 0,120 J de energía en forma de luz ultravioleta (UV) de 254 nm de longitud de onda, usando un aparato marca Vilber Lourmat modelo BLX-254. Los filtros se guardaban congelados a -20°C hasta su uso.

Hibridación de los filtros con sondas radiactivas. Para las hibridaciones de los filtros, se usó el método de Church y Gilbert (1984). Los filtros se prehibridaban en **tampón PSE** (3 ml tampón fosfato potásico 1 M [pH 7,2], 7 ml SDS 10% (p/v), 20 μl EDTA 0,5 M [pH 8,0]) precalentado a la temperatura adecuada. Tras 5 min como mínimo, la sonda se añadía sobre 10-20 ml de tampón PSE caliente y se incubaba con los filtros durante 12-16 horas. Las sondas obtenidas y marcadas como se especifica en el apartado 2.8.5.6, antes de ser añadidas a la solución de hibridación, se desnaturalizaban 5 min a 100°C y se mantenían en hielo durante 2 min al menos. Una vez utilizadas, podían ser reusadas para nuevas hibridaciones. En este caso, se guardaban congeladas en la solución de hibridación y, justo antes de ser añadidas a los filtros, se calentaban a 100°C durante 10 min. Las temperaturas de prehibridación e hibridación fueron de 65°C para sondas homólogas y de 55°C para sondas heterólogas. Tras la hibridación, los filtros se lavaban tres veces a la temperatura de hibridación con una disolución de SSC 4x y SDS 0,1% (p/v) durante 15 minutos. En el caso de hibridaciones homólogas, el último lavado se realizaba en condiciones más restrictivas, con una disolución de SSC 0,4x y SDS 0,1% (v/v). Finalmente, los filtros se envolvían en dos capas de material plástico transparente y se visualizaban de dos formas: i) Mediante análisis con un aparato InstantImager (detector bidimensional de partículas β , marca Packard, EE.UU.); ii) Mediante exposición de una pantalla sensible a partículas β y análisis en un aparato Cyclone™ “Storage Phosphor System” (Packard).

2.8.5. Tratamientos enzimáticos del DNA

2.8.5.1. Restricción del DNA

Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas, inicialmente, por la marca comercial Pharmacia Biotech y, posteriormente, por Amersham Biosciences. Las reacciones se llevaron a cabo, en su mayor parte, en un volumen de 20 μ l según las recomendaciones del fabricante en el tampón suministrado con cada enzima. Las digestiones simultáneas con dos o más enzimas de restricción se realizaron en un tampón compatible o en tampón OPA (One-Phor-All) de las mismas casas comerciales. En caso de que las enzimas no fuesen compatibles en ninguno de los sistemas de tampones, la restricción se realizaba de forma sucesiva en tampón OPA, usando primero la enzima que requería una concentración mayor de este tampón. A continuación la enzima se inactivaba a 80°C durante 15-20 min y la muestra se diluía hasta la concentración de tampón adecuada para la segunda enzima. En caso de que la primera enzima no pudiera inactivarse por calor, la restricción se llevaba hasta un volumen de 50 μ l y se extraía con 50 μ l de PCI. La fase acuosa se precipitaba con 1/50 volúmenes de acetato sódico 3 M [pH 5,3] y 2 volúmenes de etanol absoluto y el precipitado se resuspendía en el tampón adecuado para la segunda enzima.

Las restricciones de DNA genómico para análisis por Southern Blot se llevaban a cabo en un volumen de 40-50 μ l, a los que se añadían 20-30 U de la enzima de restricción. Tras digerir durante 14-18 h, las reacciones se suplementaban una vez más con una cantidad análoga de enzima y se incubaban durante, al menos, 8 horas más.

Las restricciones de DNA de plásmido se incubaron durante tiempos variables entre 1 h (para el análisis de las minipreparaciones de DNA de plásmido de *E. coli*) y 12 h (para asegurar la digestión completa en el caso de la obtención de fragmentos de DNA).

2.8.5.2. Desfosforilación de extremos del DNA

Para realizar ligaciones de fragmentos de DNA con extremos romos era conveniente desfosforilar los extremos del plásmido sobre el que iba a realizarse la ligación para aumentar la eficiencia de la misma. Para ello, se obtenía una preparación del plásmido según el protocolo descrito en el apartado 2.8.3.1, con la salvedad de que, en el paso final, el DNA se resuspendía en agua MilliQ sin RNasa. Una fracción de 1 µg del plásmido así obtenido se sometía a restricción con la enzima deseada en un volumen final de 20 µl, incubando al menos 4-6 h. Una vez que la digestión era completa, a esta mezcla de reacción se le añadía 1 U de fosfatasa alcalina (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Pharmacia), 6 µl de tampón 10x comercial y agua MilliQ hasta un volumen final de 60 µl. Tras incubar 30 min a 37°C, se añadía 1 U más de enzima y se repetía la incubación. A continuación, la mezcla de reacción se suplementaba con 2 µl de EDTA 0,5 M [pH 8], 1 µl de RNasa 1% (p/v) y 6 µl de tampón de carga de DNA (Apdo. 2.8.4.1) y se calentaba a 75°C durante 15 min para inactivar las enzimas. El vector desfosforilado se sometía a electroforesis en un gel de agarosa y la banda correspondiente se aislaba según se describe en el apartado 2.8.3.8.

2.8.5.3. Formación de extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes

Para obtener extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes, la muestra de DNA se trataba con T4 DNA polimerasa (Amersham Biosciences). Tras restricción de 1 µg de DNA en un volumen final de 20 µl, ésta se comprobaba mediante electroforesis de una fracción de 2 µl de la misma. Cuando la digestión era completa, en el mismo tubo, se añadían 1 µl de disolución 2 mM de dNTPs y 2 unidades de la polimerasa y se incubaba la mezcla a 14°C durante 30 min. Si iba a procederse a una segunda restricción del DNA, se añadían 80 µl de agua MilliQ y 100 µl de PCI, se agitaba en vórtex y se centrifugaba. El sobrenadante acuoso se precipitaba con NaCl y etanol, tal como se indica en el apartado 2.8.3.8. Si no era necesaria una restricción posterior, la muestra tratada con T4 DNA polimerasa se cargaba en un gel de agarosa y se sometía a electroforesis para aislar el fragmento deseado.

2.8.5.4. Formación de extremos romos a partir de extremos 5' protuberantes

El tratamiento de fragmentos con extremos 5' protuberantes para la formación de extremos romos se llevó a cabo por dos procedimientos distintos. El primero, consistía en un tratamiento del DNA con T4 DNA polimerasa análogo al descrito en el apartado anterior. El segundo procedimiento consistía en el tratamiento con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Amersham Biosciences). Al igual que en el caso anterior, la reacción de restricción, en 20 µl de volumen final, se suplementaba con dNTPs (1 µl de una disolución 2mM de cada uno) y se le añadían 2 unidades de la enzima, incubando a temperatura ambiente durante 30 min. La muestra tratada con Klenow se procesaba de modo análogo al descrito en el apartado anterior.

2.8.5.5. Ligación de fragmentos de DNA

La ligación de fragmentos de DNA se realizaba mezclando preparaciones de los fragmentos e incubando la mezcla en presencia de 1-3 U de DNA ligasa del bacteriófago T4 (Promega). Las ligaciones se llevaban a cabo en un volumen final de 10 µl del tampón comercial de la enzima (Tris-HCl 30 mM [pH 7,8], MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 1 mM). La ligación de fragmentos de DNA con extremos cohesivos se incubaban a 14°C durante al menos 2 h o a 4°C durante 16-24 h. Las ligaciones al vector pGEM-T[®] se incubaban a 14°C durante 16 h o a 4°C durante al menos 2 días. Para la ligación de fragmentos con extremos romos, la mezcla de ligación se suplementaba con una concentración final del 6% (p/v) de PEG 8000 y se incubaba a 14°C durante 16-24 h o a temperatura ambiente durante al menos 2 h.

2.8.5.6. Preparación de sondas radiactivas de DNA

Las sondas de DNA usadas en los experimentos de Southern Blot, se obtuvieron mediante reacciones de PCR usando como molde plásmidos que contenían el fragmento de DNA deseado o DNA genómico de la microalga correspondiente, en el caso de que la clonación no hubiese sido posible. En la mayor parte de los casos, se utilizó para la

amplificación una pareja de oligonucleótidos degenerados que se describe en el apartado 3.1 de Resultados y que amplifican aproximadamente entre el 25 y el 30% de la zona codificante de los genes que codifican distintas H⁺-PPasas (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002). Una vez sometido a electroforesis y aislado del gel de agarosa, el DNA se marcaba radiactivamente con [α -³²P]-dCTP, usando el kit “Ready-to-Go”™ DNA labelling beads (dCTP) (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los dNTPs no incorporados se eliminaban mediante una columna Microspin™ S-200 (Amersham Biosciences).

2.8.6. Secuenciación del DNA

2.8.6.1. Secuenciación automática del DNA mediante marcaje fluorescente

La secuenciación automática del DNA se llevó a cabo a través del Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Bioquímica y Biomedicina "López-Neyra" de Granada. El equipo utilizado fue un secuenciador ABI 373 XL Stretch con un termociclador PE 9600, usando para el marcaje el kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.0 (PE Biosystems). Los cromatogramas se visualizaron y analizaron usando el programa Editview 1.0.1 para Macintosh.

2.8.6.2. Secuenciación manual de DNA de cadena doble mediante marcaje radiactivo

La desnaturalización de las muestras de DNA de doble cadena para su secuenciación manual se realizaba mezclando 5 µg del molde, en 20 µl de volumen final, con 5 µl de NaOH 2 M. Tras una breve agitación en vórtex, la mezcla se incubaba a temperatura ambiente durante 10 minutos y, a continuación, se pasaba a través de una columna Microspin™ S-200 (Amersham Biosciences) para eliminar el NaOH. La muestra se ponía inmediatamente en hielo para evitar su renaturalización.

La secuenciación manual del DNA se llevó a cabo según el método de secuenciación descrito por Sanger *et ál.* (1977), basado en la terminación de la elongación enzimática de las cadenas de DNA por incorporación de dNTPs, usando el juego de

reactivos ¹⁷S Sequencing Kit de Amersham Biosciences. 10 µl del molde desnaturalizado se sometían a secuenciación con este kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. El marcaje radiactivo de las cadenas se realizó utilizando $\alpha^{35}\text{S}$ -[dATP].

Las mezclas de reacción obtenidas se sometían a electroforesis vertical en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-urea, tal como se describe en Sambrook *et ál.* (1989). Los geles se preparaban al 6% (p/v) de poliacrilamida a partir de una disolución comercial (Long Ranger[®] gel solution, PE Biochemicals) y 7 M de urea en tampón TBE 2x (ver apartado 2.8.4.1), polimerizándose mediante la adición de una mezcla de APS al 0,08% (p/v) y TEMED 6 mM. Para facilitar la separación del gel de los cristales, previamente al montaje de éstos, se trataba uno de ellos con dimetildiclorosilano (Sigma Química) y se dejaba secar durante 20 min en una campana de extracción de aire. La electroforesis se llevaba a cabo en un aparato modelo Hoeffer SQ3 "Sequencer" (Hoeffer-Pharmacia Biotech) a una potencia constante de 55 W. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se transfería a papel Whatman 3MM y se secaba a vacío durante 1 hora en un secador de geles modelo SE 1160 (Hoeffer-Pharmacia Biotech), calentando a 80°C. Para la visualización de los resultados, el gel seco se exponía a pantallas sensibles a partículas β , que se analizaban en un aparato Cyclone[™] "Storage Phosphor System" (Packard).

2.8.6.3. Secuenciación manual de DNA de cadena simple mediante marcaje radiactivo

Para evitar problemas de estructuras secundarias del DNA, se hizo necesario en algún caso realizar las reacciones de secuenciación sobre DNA de cadena simple. En estos casos, la desnaturalización del DNA de cadena simple (1 µg por reacción) se realizaba calentando la muestra a 90-100°C durante 10 min, tras lo cual se mantenía en hielo durante un par de minutos más. Las reacciones de secuenciación se realizaron del mismo modo que en el apartado anterior, pero suplementando las mismas con un 21% de DMSO (Baltscheffsky M *et ál.* 1998) y aumentando la temperatura de hibridación del oligonucleótido hasta 65°C.

Los geles de electroforesis también se prepararon de un modo análogo al descrito anteriormente, pero a partir de una mezcla no comercial de acrilamida-bisacrilamida

(29:1) en TBE 2x y con una concentración final de urea 8 M. Estos geles se corrían a una potencia constante de 75 W para asegurar que la temperatura del gel se mantenía en torno a los 55°C durante todo el proceso. Una vez terminada la electroforesis, los geles se procesaron y visualizaron igual que en el apartado anterior.

2.9. Aislamiento y análisis de RNA

2.9.1. Aislamiento de RNA

Para las extracciones de RNA, todas las disoluciones se prepararon usando agua tratada con dietilpirocarbonato (en adelante, agua DEPC). El material de vidrio se horneó a 200°C durante 2 horas y el de plástico se lavó con una disolución de NaOH 0,1 M, EDTA 1 mM [pH 8] y SDS 0,1% (p/v) o se sumergió durante al menos 24 horas en una disolución comercial de peróxido de hidrógeno al 33% (p/p).

2.9.2. Aislamiento de RNA de microalgas eucarióticas

Para la extracción de RNA de microalgas eucarióticas, se utilizó una modificación del protocolo de Malmberg *et al.* para la extracción de RNA de plantas. Los cultivos se recogían por centrifugación a 8000xg durante 6 min. Muestras de 0,5-1 g de peso fresco se congelaban en nitrógeno líquido y se trituraban en un mortero hasta conseguir un polvo muy fino, que se transfería, sin dejar descongelar, a tubos de plástico de 50 ml que contenían 10 ml de tampón TCES (Apdo. 2.8.3.5), 50 µl de β-mercaptoetanol y 10 ml de PCI y se mezclaba con vórtex. Tras centrifugar a 2000 rpm durante 10 min en una centrífuga de rotor basculante, la fase acuosa superior (unos 8 ml) se transfería a un tubo Sorvall (rotor SS34) estéril y se añadían 4 ml (1/2 volumen) de etanol absoluto. Tras incubar en hielo durante 10 minutos, se llevaba a cabo otra centrifugación a 10000 rpm durante 5 min para eliminar el material insoluble y los ácidos nucleicos se precipitaban del sobrenadante añadiendo 16 ml (2 volúmenes) de etanol absoluto, completando así 2,5 volúmenes. Las muestras se incubaban a -20°C durante al menos 30 min y se centrifugaban durante 10 min a 10000 rpm. Los precipitados se lavaban con etanol al

70%, se secaban al aire y se resuspendían en 500 µl de agua DEPC, previamente calentada a 55-60°C. Las muestras se mantenían unos minutos en un baño a esta misma temperatura, para licuar el posible gel de polisacáridos y se centrifugaban a 2000xg durante 5 minutos para eliminar el material insoluble. El RNA se precipitaba con 1 volumen de LiCl 6M, incubando durante 1 h en hielo y centrifugando 10 minutos como antes. El precipitado se resuspendía en 0,2 ml de agua DEPC caliente y se incubaba una vez más a alta temperatura para licuar los polisacáridos. Tras otra centrifugación para eliminar material insoluble, el sobrenadante se precipitaba con 0,7 ml de una mezcla 6:1 (v/v) etanol absoluto:acetato amónico 7,5 M y se incubaba a -20°C durante al menos 30 min, centrifugando como antes. El RNA se lavaba con etanol al 70%, se secaba unos minutos al aire y se resuspendía, finalmente, en un volumen entre 50 y 100 µl de agua DEPC, calentando como antes.

2.9.3. Aislamiento de RNA de bacterias fotosintéticas

Para las preparaciones de RNA para análisis por Northern Blot, las células crecidas hasta la mitad de la fase exponencial (aproximadamente 100 mg en peso fresco), se recogían por centrifugación y se lavaban con 600 µl de TE y 130 µl de cloroformo. Tras incubar 5 min en hielo, se centrifugaban a máxima velocidad en una centrífuga de mesa, separándose dos fases, acuosa (superior) y orgánica (inferior), entre las que se situaban las células enteras. Estas células lavadas se resuspendían en 400 µl de **tampón STET** (sacarosa 10% (p/v), Tris-HCl 50 mM [pH 8,0], EDTA 50 mM [pH 8,0], Tritón X-100 1% [v/v]), 400 µl de PCI y 24 µl de Ribonucleoside Vanadyl Complexes (RVC, Sigma Chemical co.) 200 mM, y se les añadían 4 cucharadas de perlas de vidrio. Las muestras se sometían a 10 ciclos de 1 min de agitación en vórtex seguido de 1 min de incubación en hielo, se centrifugaban a máxima velocidad durante 4 min y el sobrenadante se precipitaba con 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M [pH 5,2] y 2 volúmenes de etanol absoluto. Tras incubar a -20°C durante, al menos, 30 min, las muestras volvían a centrifugarse y el precipitado se resuspendía en 300 µl de RVC 2 mM en agua. Esta disolución se trataba dos veces con PCI y otra dos veces con cloroformo, la fase acuosa se precipitaba de nuevo con etanol y acetato de sodio. El precipitado se

resuspendía en 30 µl de agua DEPC, a la que se añadían 10 µl de Tris-HCl 100 mM [pH 8,0], 10 µl de MgSO₄ 50 mM y 1 µl de inhibidor de RNasas (RNase guard, Pharmacia), y se trataba con 20 U de DNasa libre de RNasas (Amersham Biotech) durante 20 min a 30°C.

Para el aislamiento de RNA de alta calidad y sin contaminaciones de DNA genómico para los experimentos de extensión del cebador, se usó el kit "RNeasy Mini Kit" (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.9.4. Aislamiento de RNA de levadura

El aislamiento de RNA de levadura se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Carlson y Botstein (1982). Un cultivo de 20 ml de medio rico o de 40 ml de medio selectivo, se inoculaba con 1/100 volúmenes de un cultivo fresco en fase estacionaria. Tras incubar a 30°C durante el tiempo deseado, las células se centrifugaban, se lavaban con agua fría y se resuspendían en 300 µl de TCES (Apdo. 2.8.3.5), se dividían en dos fracciones y se llevaban a tubos de 1,5 ml, a cada uno de los cuales se añadían 150 µl de PCI y 600 µl de bolas de vidrio (0,45-0,6 mm diámetro, Sigma Chemical co.). A continuación, las muestras se centrifugaban enérgicamente en un vórtex durante 2-3 min y se les añadían 200 µl de TCES y 200 µl de PCI, antes de volver a agitar durante 1 min adicional. Tras centrifugar durante 5 min a 12000xg, los sobrenadantes se llevaban a tubos limpios, extrayendo una vez más con 300 µl de PCI y centrifugando como antes. Las fases acuosas se precipitaban entonces con 2,5 volúmenes de etanol absoluto, incubando en hielo durante 30 min y centrifugando 15 min a 12000xg. Los precipitados se resuspendían en 250 µl de agua DEPC caliente y se mantenían a 55-60°C durante unos minutos. El material insoluble se eliminaba por centrifugación a 12000xg durante 10 min y los sobrenadantes se unían en un solo tubo, al que se añadían 0,5 ml de LiCl 6M, incubando una hora en hielo y centrifugando como antes. Los precipitados se lavaban con 0,5 ml de LiCl 3M y se resuspendían en 360 µl de agua DEPC, calentando como antes y centrifugando una vez más para eliminar el material insoluble. El sobrenadante se precipitaba, finalmente, con 1 ml de etanol absoluto y 40 µl de acetato sódico 3 M [pH 5,3], incubando otra vez en hielo durante media hora. Tras centrifugar, el precipitado final

de RNA se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba al aire unos minutos y se resuspendía en 100 μ l de agua DEPC.

La concentración y pureza del RNA se analizaba, a continuación, como se describe en el apartado siguiente.

2.9.5. Estimación de la concentración, pureza e integridad del RNA

De forma análoga a la descrita en el apartado 2.8.4.2, fracciones de 1 μ l de la preparación de RNA se diluían en 0,5 ml de agua y su absorbancia UV se medía en cubetas de cuarzo, tanto a 260 como a 280 nm. Como criterio de pureza e integridad se consideró una relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}) entre 1,8 y 2. Para la estimación de la concentración se usó un coeficiente de extinción $E = 0,25 \text{ (mg/ml)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Adicionalmente, 1 μ l de preparación se diluía en 10 μ l de agua DEPC, se le añadían 2 μ l de **tampón de carga de RNA** (glicerol 50% [v/v], EDTA 1 mM [pH 8,0], azul de bromofenol 0,45% [p/v]) y 0,5 μ l de bromuro de etidio (1 mg/ml) y se corrían y visualizaban en geles de agarosa al 0,7% (p/v) preparados en tampón TBE (ver apartado 2.8.4.1). Esto permitía comprobar la integridad de las muestras y la concentración relativa de unas respecto a otras, según la intensidad de las bandas observadas.

2.9.6. Electroforesis desnaturizante de RNA en geles de agarosa

El análisis electroforético del RNA total se realizó en geles de agarosa al 1% (p/v) en **tampón MOPS 1x** (MOPS 40 mM [pH 8,0], acetato sódico 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8,0], formaldehído 2% [v/v]), como se describe en Farrell (1993). Para la preparación de las muestras, a 20 μ g de RNA como máximo en un volumen de 10 μ l se les añadían 2 μ l de tampón MOPS 10x, 6,6 μ l de formaldehído y 10 μ l de formamida, y se calentaban a 55-60°C durante 15 min. Tras dos minutos en hielo, se añadían 4 μ l del tampón de carga de RNA descrito en el apartado anterior y 1 μ l de bromuro de etidio (1 mg/ml), y se cargaban en el gel de agarosa. La electroforesis se corría a una diferencia de potencial máxima de 5 V por cm de longitud del gel durante aproximadamente 3 h y el resultado se

visualizaba en un transiluminador de luz ultravioleta, como se describe en el apartado 2.8.4.1.

2.9.7. Análisis de RNA mediante Northern Blot

Tras la electroforesis, los geles se lavaban dos veces durante 20 min con SSC 10x (ver apartado 2.8.4.3), para eliminar la mayor parte del formaldehído, que interfiere en la transferencia. A continuación, se preparaba un “sandwich” para transferencia por capilaridad en seco a membranas de nylon sin carga de 0,45 μm de tamaño de poro, análogo al usado para la transferencia de DNA. Una vez terminada la transferencia, el RNA se fijaba al nylon mediante tres pulsos de 0,120 J de energía de luz UV de 254 nm de longitud de onda y los filtros se guardaban a -20°C hasta su uso. La preparación y marcaje de las sondas de DNA y la hibridación de los filtros se llevó a cabo de manera análoga a la descrita para el DNA en los apartados 2.8.5.6 y 2.8.4.3, respectivamente. Todas las hibridaciones y lavados se llevaron a cabo a 65°C , en las condiciones de astringencia especificadas para los análisis por Southern Blot con sondas homólogas. La visualización de los filtros también se llevó a cabo del modo indicado para el DNA.

2.9.8. Experimentos de extensión del cebador. Determinación de los puntos de inicio de la transcripción (TSPs)

2.9.8.1. Experimentos de extensión del cebador por protocolos estándar

En los ensayos de extensión del cebador se diseñaron oligonucleótidos estrictos en la zona próxima al codón de inicio de la traducción del gen de estudio y orientados hacia el extremo 5' que se describirán en el capítulo de resultados correspondiente. Una fracción de 2 μg del oligonucleótido en cuestión se mezclaba con 10 μg de RNA en un volumen final de 10 μl de tampón KCl 10 mM, Tris-HCl 1 mM y 1 mM EDTA [pH 8] en agua DEPC y se desnaturalizaba a 100°C durante 10 min. Inmediatamente, la muestra se llevaba a la temperatura de hibridación del oligonucleótido y se incubaba durante 1 h. Por otro lado, se preparaba una mezcla de reacción con 2 μl de DTT 0,1 M, 4 μl del tampón

5x suministrado con la enzima, 2,5 μl de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ y 1,5 μl de una mezcla de dNTPs 2,5 mM de dATP, dGTP y dTTP, que se precalentaba a 47°C. La muestra del RNA con el oligonucleótido se mantenía a temperatura ambiente un par de minutos antes de añadirle la mezcla de reacción, incubar a 47°C un par de minutos y añadir 1 μl de enzima Superscript™. Tras 1 hora a 47°C, la muestra se pasaba por una columna de Microspin™ (Amersham Biosciences) para eliminar los nucleótidos no incorporados y la enzima. El resultado de la extensión del cebador se suplementaba con tampón de carga de DNA (Apdo. 2.8.4.1) y se cargaba en un gel de poliacrilamida desnaturalizante junto a una reacción de secuenciación (Apdo. 2.8.6.3). Esta reacción se realizaba con el molde de DNA de cadena simple que contenía las secuencias promotoras del gen en estudio y el mismo oligonucleótido de la extensión del cebador, de manera que el fragmento resultante del experimento (marcado radiactivamente con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$) se retenía, tras la electroforesis, a la misma altura del fragmento de la reacción de secuenciación de igual tamaño, determinando el punto de inicio de la transcripción. El resultado se visualizaba como se describe en el apartado 2.8.6.2.

2.9.8.2. Experimentos de extensión del cebador a alta temperatura

Dado el alto contenido en G+C de *Rhodospirillum rubrum*, se hizo necesario realizar los experimentos de extensión del cebador a altas temperaturas, para impedir la formación de estructuras secundarias en el DNA. Para ello, se empleó la transcriptasa reversa de *Thermus thermophilus* (Tth205, Stratagene). Fracciones de 2 μg de RNA total, en un volumen final de 7,5 μl , se suplementaban con 1 μl de **tampón de hibridación** (KCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM [pH 8]) y 3,5 pmol del oligonucleótido deseado, diseñado de modo análogo al descrito en el apartado anterior. Tras calentar 10 min a 95-100°C, la mezcla se llevaba hasta la temperatura de hibridación del oligonucleótido y, posteriormente, se enfriaba durante 2 min a temperatura ambiente. Para la extensión del cebador, se preparó una mezcla de reacción que contenía el resultado de la hibridación del RNA con el oligonucleótido, 5 μl de tampón 10x comercial de la enzima, 4 μl de disolución 2,5 mM de dATP, dGTP y dTTP, 1 μl de MnCl_2 50 mM, 1 μl de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ y agua MilliQ hasta un volumen final de 50 μl . Tras precalentar esta

mezcla a 60°C durante, al menos, un par de minutos, se añadieron 2,5 µl de enzima Tth205 y la reacción se incubó a 65°C durante 1 h. A continuación, se añadió 1 µl de RNasa al 1% (p/v) y se mantuvo la mezcla a 37°C durante 15 min. Los dNTPs no incorporados y la enzima se eliminaron usando una columna Microspin™ S-200 (Pharmacia) y el resultado de la extensión del cebador se suplementó con tampón de carga y se sometió a electroforesis como se indica en el apartado anterior.

2.10. Minipreparaciones de RNA y DNA genómico de *Chlamydomonas reinhardtii*

Para la caracterización de los mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* obtenidos durante el transcurso de esta Tesis Doctoral, se optimizó una modificación del protocolo de extracción de RNA de plantas expuesto en el apartado 2.9.2, con el fin de poder llevar a cabo preparaciones a pequeña escala que permitieran analizar un número elevado de transformantes a la vez. Las células del mutante 704 transformado se crecían en cultivos de 10-12 ml del medio Sueoka con amonio o nitrato descrito en el apartado 2.1.2.2, en tubos de cristal estériles de 15 ml, a 25°C, iluminación constante de luz blanca y con 50 rpm de agitación. Al alcanzar la mitad de la fase exponencial (concentración de clorofila 7-10 µg por ml de cultivo), las células se recogían por centrifugación a 3000xg durante 1 min, se lavaban dos veces con Tris-HCl 50 mM [pH 7,5], centrifugando como antes, y se resuspendían en 2 ml de tampón TCES (Apdo. 2.8.3.5), suplementado con 10 µl de β-mercaptoetanol. Tras resuspender bien las células, se añadían 2 ml de PCI y se agitaba en vórtex. Las muestras se centrifugaban a 4000xg durante 5 min y el sobrenadante acuoso (1750 µl) se trasladaba a tubos nuevos, donde se añadían 875 µl (½ volumen) de etanol absoluto. Tras incubar 5 min en hielo, se centrifugaba a 2000xg durante 5 min para eliminar material insoluble y los ácidos nucleicos se precipitaban del sobrenadante por adición de dos volúmenes más (3,5 ml) de etanol. Tras incubar durante al menos media hora a -20°C, las muestras volvían a centrifugarse a 4000xg durante 10 min, se lavaban con etanol al 70% (v/v) y se resuspendían en 500 µl de agua DEPC caliente (55-60°C), trasladando los ácidos nucleicos resuspendidos a un tubo de 1,5 ml. A continuación, se añadían 500 µl de disolución de LiCl 6 M, para precipitar selectivamente el RNA, y se mantenían los tubos en hielo durante aproximadamente 1 hora. Tras centrifugación a

12000xg durante 10 min, el sobrenadante que contenía el DNA se trasladaba a tubos nuevos y se precipitaba por adición de 2 volúmenes de etanol absoluto, incubándose a -20°C durante al menos 30 min. Por su parte, el precipitado de RNA se resuspendía en 200 μl de agua DEPC caliente y se reprecipitaba con 0,7 ml de mezcla 6:1 (v/v) de etanol absoluto:acetato amónico 7,5 M, incubándose una vez más a -20°C . Tras una nueva centrifugación, el pellet de RNA se resuspendía en 15 μl de agua DEPC. Por otro lado, una vez incubado a -20°C , el DNA precipitado se centrifugaba, se lavaba con etanol al 70% y se resuspendía en agua caliente. Finalmente, se precipitaba con 2 volúmenes de etanol:acetato amónico. Tras centrifugar y lavar una vez más con etanol al 70% (v/v), los DNAs se resuspendían en 15-20 μl de agua. La integridad y concentración de estas preparaciones de RNA y DNA se comprobaba como se describe en los apartados 2.9.5 y 2.8.4.2, respectivamente.

2.11. Análisis de secuencias de DNA y proteínas por métodos informáticos

La búsqueda de marcos abiertos de lectura (ORF), la traducción de las secuencias de los nucleótidos a aminoácidos y la búsqueda de las dianas de restricción, se realizaba con el programa informático "DNA Strider" versión 1.2 para Macintosh.

El alineamiento de las secuencias promotoras de las H^+ -PPasas de *Rhodospseudomonas palustris* y *Rhodospirillum rubrum* se llevó a cabo con la versión 1.3 del programa "DNA Strider" para Macintosh. La secuencia de las regiones promotoras para el gen *vpp* de *Rps. capsulatus* se obtuvo de la página web del proyecto genoma de este organismo del DOE-JGI (<http://aluminium.jgi-psf.org/prod/bin/browseBlast.pl>). La información preliminar del proyecto genoma de *Rhodospirillum rubrum* se obtuvo de la página web del "DOE Joint Genomic Institute (DOE JGI, USA) Microbial Sequencing Program" (<http://genome.ornl.gov/microbial/rub/>) y se analizó usando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1997).

El alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos realizado durante los estudios de filogenia molecular se confeccionó usando el programa CLUSTAL X (1.64b). El árbol de distancias obtenido a partir de este alineamiento se obtuvo con el mismo programa, aplicando la metodología "neighbor-joining" y una matriz BLOSUM. Las

secuencias de aminoácidos que no se generaron en nuestro grupo se obtuvieron de la página web de proyectos genoma microbianos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/Complete.html>).

2.12. Otras técnicas utilizadas

2.12.1. Determinación de los niveles de pirofosfato celular

Cultivos de 50 ml de células de *Saccharomyces cerevisiae* se crecían en medio con glucosa, se sedimentaban y se rompían con perlas de vidrio como se describe en el apartado 2.3.2, con la excepción de que el tampón A se sustituyó por una disolución acuosa al 10% (p/v) de ácido tricloroacético y 4% de ácido perclórico (v/v). Las perlas de vidrio y los restos celulares y de proteínas desnaturalizadas se eliminaban por centrifugación (5 min a 700xg), y el contenido de PPI se estimó en el sobrenadante, tras neutralizar el mismo con NaOH, utilizando un kit enzimático de determinación de PPI (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en el método descrito por O'Brien (1976), que se vale de una serie de reacciones enzimáticas acopladas, como resultado de las cuales se producen 2 moles de NAD a partir de NADH por cada mol de PPI consumido. La reacción se sigue mediante medida espectrofotométrica a 340 nm.

2.12.2. Determinación de la actividad de bombeo de protones

La formación de gradientes de pH a través de vesículas cerradas en las preparaciones de membrana de levadura, se llevaron a cabo midiendo la caída de fluorescencia del fluoróforo de acridina 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA). Esta molécula es permeable a las membranas celulares sólo en su forma desprotonada. Una vez en el interior de las vesículas cerradas, la actividad de bombeo de protones hacia el interior de las mismas provoca la protonación de la molécula de ACMA, que queda retenida. Las moléculas retenidas en las vesículas sufren un proceso denominado “apilamiento molecular” (molecular stacking), que provoca una disminución de la

fluorescencia debido a las interacciones que se establecen. Esta caída de fluorescencia puede seguirse con un sistema adecuado. Las medidas de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro de marca Perkin-Elmer modelo LS-5, acoplado a un baño de agua, que permitía temostatizar la muestra a 30°C. Se usaron cubetas de cuarzo para fluorimetría de marca Hellma, de 0,5 ml de volumen. Las longitudes de onda de excitación y de emisión usadas fueron, respectivamente, 420 y 480 nm. Para estas medidas se usó una modificación del protocolo de Pérez-Castiñeira y Apps (1990). El medio de reacción (500 µl) contenía sacarosa 0,2 M, Tris-HCl 10 mM [pH 7,4], MgSO₄ 3 mM, KCl 50 mM, valinomicina 0,4 µg/ml y ACMA 0,2 µg/ml, a los que se añadían preparaciones de membrana de levadura a razón de 4 µg de proteína por mililitro. La reacción se iniciaba con la adición de PPi 1 mM y el gradiente de protones obtenido tras la misma se relajaba mediante la adición de Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP) 2 µM.

3. RESULTADOS

3.1. Estudio sobre la distribución de las PPasas de membrana en microorganismos fotosintéticos y heterótrofos de distintos grupos taxonómicos.

3.1.1. Identificación de posibles H⁺-PPasas

Al comienzo de este trabajo de Tesis Doctoral, se conocía la presencia de las H⁺-PPasas en diversas plantas (Rea y Poole 1993, Maeshima 1994b, Baltscheffsky M *et ál.* 1999), algunas bacterias (Schwarm *et ál.* 1986, Shakov *et al.* 1982, Schocke y Schink 1998) y unos pocos protistas parásitos de humanos (Rodrigues *et ál.* 1999a y 1999b, Scott *et ál.* 1998, Luo *et ál.* 1999). También se habían descrito en el alga marina *Acetabularia acetabulum* (Ikeda *et ál.* 1999), el alga verde *Chara corallina* (Nakanishi *et ál.* 1999) y las microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* (Robinson *et ál.* 1998) y *Chlorococcum littorale* (Sasaki *et ál.* 1999). Sin embargo, no se había llevado a cabo ninguna búsqueda sistemática de genes correspondientes a H⁺-PPasas en microorganismos de distintos grupos taxonómicos, que permitiera esclarecer qué posibles ventajas adaptativas podría suponer el disponer de este tipo de bomba de protones. Por este motivo, se planteó como uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral la realización de un estudio sistemático sobre la presencia de H⁺-PPasas (proteínas y genes) en organismos muy diversos.

Estudios preliminares anteriores llevados a cabo en nuestro grupo se habían basado en el aislamiento de fracciones de membrana de distintas microalgas eucarióticas y su análisis por Western Blot con el anticuerpo PAB_{HK1} (HKAAVIGDTIGDPLK) [Kim *et ál.* 1994b], cedido por el Profesor Phillip A. Rea de la Universidad de Pensilvania, EE.UU., y que reconoce un epítipo de 15 aminoácidos muy conservados en las H⁺-PPasas conocidas. Esta estrategia permitió identificar bandas de proteínas de membrana con las masas moleculares esperadas para las H⁺-PPasas (65-80 kDa) en diversas microalgas eucarióticas (Figura 3.1.1) (García-Donas *et ál.* 1998).



Figura 3.1.1: Identificación de posibles polipéptidos de H^+ -PPasas en microalgas eucarióticas y plantas mediante análisis por Western Blot. Las fracciones de membrana correspondientes a cultivos de distintas microalgas eucarióticas y la planta *Antirrhinum majus* se sometieron a análisis por Western Blot (aprox. 100 μ g de proteína por calle), con el anticuerpo PAB_{HK1}, que reconoce un epítipo conservado en las H^+ -PPasas conocidas. De izquierda a derecha: C.p., *Cyanophora paradoxa*; C.c., *Cyanidium caldarium*; P.b., *Phorphyridium braunii*; O.d., *Ochromonas danica*; E.g., *Euglena gracilis*; D.s., *Dunaliella salina*; C.f., *Chlorella fusca*; C.r., *Chlamydomonas reinhardtii*; A.m., *Antirrhinum majus*.

Con el fin de ampliar esta búsqueda y de confirmar los resultados obtenidos, durante esta Tesis Doctoral se planteó una estrategia de PCR, usando la pareja de oligonucleótidos descritos por Pérez-Castiñeira *et ál.* (2002), **PP1** [5'-GCIGGIGGIAT(A/C/T)(G/T)CIGA(A/G)ATG-3', I = Inosina] y **PP2** [5'-GC(A/G)TT(A/G)TCCCAIGCICCC-3', I = Inosina]. Estos oligonucleótidos degenerados se diseñaron a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las H^+ -PPasas de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* y de las plantas superiores *Oriza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare* y *Beta vulgaris*, lo que permitió identificar la existencia de distintos motivos conservados. La región elegida para llevar a cabo este trabajo está situada cerca del extremo carboxilo terminal de la proteína y corresponde, aproximadamente, al 25-30% de la longitud total de la misma (Figura 3.1.2). Los oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de motivos conservados en los extremos de esta secuencia de aminoácidos permiten la amplificación de un fragmento de aproximadamente 600 nt de secuencia codificante en el extremo 3' de genes que codifican H^+ -PPasas (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002). La pareja de oligonucleótidos descrita se utilizó en reacciones de PCR sobre el DNA de distintos microorganismos, en su mayoría fotosintéticos, en las que se empleó como molde, fundamentalmente, DNA genómico, aunque en algunos casos, como se indicará, las reacciones se llevaron a cabo sobre genotecas o muestras de cDNA. Para las microalgas eucarióticas, la mayor parte de las preparaciones de DNA genómico se extrajeron a partir de cultivos en placa, obtenidos del Servicio de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis en el que se llevó a cabo este trabajo de Tesis Doctoral. En el apartado de Materiales y Métodos se recogen aquellos casos para los que el DNA o los cultivos del organismo se obtuvieron de otras fuentes.

R.rubrum	-----MAHYLFV-VAAALAAALGYGALTIKTIMAADA-----GTARMQEIS
O.sativa	---MAAILP-DLATQVLVPA--AVVGIAPVAVVQVVLVSKVKMTAERRGGEGSPGAAAGKDGGAASEYLIEEEEGLNEHNVEKCEIQ
Hordeum v.	---MAILG-ELGTEILIPVC--GVIGIVFAVAQWFIIVSKVKTTP---GALR---RRRAKNG--YGDYLIIEEEEGLNDHNVVVKCAEIQ
Beta v._	-MGSALLP-DLGTQIVIPVC--AVIGIVFSSQWYVLSRVKVSSE-HGATSPSSNKNKNG--YGDCLIEEEEGLNDHNVVAKADIQ
A.thaliana	MVAPALLP-ELWTEILVPIIC--AVIGIAFSLFQWYVVSVRKLTSD-LGASSSGGANNGKNG--YGDYLIIEEEEGLNDQSVVAKCAEIQ
R.rubrum	GAVQEGASAFNLRQYKTIIVVGVAVFVIL-TALL---GIS-----V--GFGFLIGAVCSGIAGYVGMYSVR
O.sativa	HAISEGATSLFTEYKYVGLFMGI FAVLIFLFLGSGVEGFSTKSQPCYHYSKDRMCKPALANAFSTVAVFLGAVTSLVSGFLGMKIATY
Hordeum v.	TAISEGATSLFTEYKYVGMFMVFAAII FFLGSGIEGFSTKQPCY--SKGTCKPALYALFSTASFLGAIITSLVSGFLGMKIATY
Beta v._	NAISEGATSLFTEYKYVGMFMFAAII FFLGSGIEGFSTSSQPCYTNKEKCKPALATAIFSTVSVLLGAIITSLVSGFLGMKIATY
A.thaliana	TAISEGATSLFTEYKYVGMFMFAAII FFLGSGIEGFSTDNKPCYDTRTRCKPALATAAFSTIAFVLGAVTSLVSGFLGMKIATY
R.rubrum	ANVRVAAGAQQGL---ARGLELAFQSGAVTGMLVAGLALLSVA-FY---YILLVIGATG-RA-LIDPLVALGFGASLISIFARLGG
O.sativa	ANARTTLEA---RKGVGKAFITAFRSGAVMGFLLAASGLVLYIAINLFGIY---YGDWE--GLFEAITGYGLGSSSMALFGRVGG
Hordeum v.	ANARTTLEA---RKGVGKAFITAFRSGAVMGFLSSSGLVLYIITINVFKMY---YGDWE--GLFESITGYGLGSSSMALFGRVGG
Beta v._	ANARTTLEA---RKGVGKACLQVQV---MGFLLAANGLVLYIAINLFLKLY---YGDWE--GLFEAITGYGLGSSSMALFGRVGG
A.thaliana	ANARTTLEA---RKGVGKAFITAFRSGAVMGFLLAASGLVLYIITINVFKIY---YGDWE--GLFEAITGYGLGSSSMALFGRVGG
R.rubrum	GIYTKAADVGADLVGKVEAGIPEDDPRNPAVIADNVGDNVGDAGMAADLFETYAVTVVATMVLASI--FFGAVPAMTSM--MAYPLAIG
O.sativa	GIYTKAADVGADLVGKVERNIPEDDPRNPAVIADNVGDNVGDAGMGSDFLGSYAESSCAALVVASISS--FGINHEFT--PMLYPLLIS
Hordeum v.	GIYTKAADVGADLVGKVERNIPEDDPRNPAVIADNVGDNVGDAGMGSDFLGSYAESSCAALVVASISS--FGINHDT--AMCYPLLVIS
Beta v._	GIYTKAADVGADLVGKVERNIPEDDPRNPAVIADNVGDNVGDAGMGSDFLGSYAESSCAALVVASISS--FGIDHDT--AMCYPLLVIS
A.thaliana	GIYTKAADVGADLVGKIERNIPEDDPRNPAVIADNVGDNVGDAGMGSDFLGSYAESSCAALVVASISS--FGINHDT--AMCYPLLVIS
R.rubrum	GVCILASILGKFKVL----GPKNNIMGALYRGLVLSAGASFVGI--ILATAIVPG-FG---DI--QGAN--GVLYSGFDLFLCAVI
O.sativa	SVGI IACL-ITTLFATDFFEIKAVDEIEPALKKQLIISTVVMVTG--IVLVSWLGLPYS-FTIFNFGA-QKTVY---NWQLF--LCVAV
Hordeum v.	SVGI IVCL-LITTLFATDFFEIKANEIEPALKKQLIISTALMTVG--VAVISWLALPAK-FTIFNFGA-QKEVS---NWGLF--FCVAV
Beta v._	SMGILVCL-ITTLFATDFFEIKAVKEIEPALKKQLIISTAIMTVG--IAIVTWTCLPSS-FTIFNFGT-QKVVK---NWQLF--LCVAV
A.thaliana	SMGILVCL-ITTLFATDFFEIKLVEIEPALKKQLIISTVIMTVG--IAIVSVWGLPTS-FTIFNFGT-QKVVK---NWQLF--LCVAV
R.rubrum	GLLVGTGLLIWVTEYYTGTNFRPVRVSAKASTGHGTNVIQGLAISMEATGLPALIICAAIITTYQLSGLFGIAITVTSMLALAGMVVA
O.sativa	GLWAGLIIGFVTEYYTNSAYSPVQDVADSCRTGAATNVI FGLALGYKSVI IPIFAIAFISIFLSFSLAAMYGVAVAAALGMLSTIATGLA
Hordeum v.	GLWAGLIIGFVTEYYTNSAYSPVQDVADSCRTGAATNVI FGLALGYKSVI IPIFAIAVSIYVVSFSAAMYGIAMAALGMLSTMATGLA
Beta v._	GLWAGLIIGFVTEYYTNSAYSPVQDVADSCRTGAATNVI FGLALGYKSVI IPIFAIAIAIFVVSFSAAMYGIAVAALGMLSTIATGLA
A.thaliana	GLWAGLIIGFVTEYYTNSAYSPVQDVADSCRTGAATNVI FGLALGYKSVI IPIFAIAISIFVVSFSAAMYGVAVAAALGMLSTIATGLA
	PP1
R.rubrum	LDAYGPVTDN AGGIAEM ANLPEDVRKTTDALDAVGNNTTAVTKGYAIGSSGLGALVLFAYTEDLAFKFNVDAYPAFAGVDVNFSLIS
O.sativa	IDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFAGSAAVLSLALFGAFVS---RAAIS-----TVDVL
Hordeum v.	IDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFAGSAAVLSLALFGAFVS---RAGVK-----VVDVL
Beta v._	IDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFAGSAAVLSLALFGAFVS---RAGIS-----TVDVL
A.thaliana	IDAYGPISDN AGGIAEM AGMSHRIRERTDALDAAGNTTAAIGKGFAGSAAVLSLALFGAFVS---RAGIH-----TVDVL
R.rubrum	SPYVVVGLFFIGGLPYLFGSMGMTAVGRAAGSVVEEVRQFR-EIPGIMEGTAKPEYSRCVMDLTKAAIKEMII PSLPLVLAIVLY-
O.sativa	TPKVFIFGLIVGAMLPYWFSAAMTKSVGSAALKMVEEVRQFNS-I PGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTPLIV-G
Hordeum v.	SPKVFIFGLIVGAMLPYWFSAAMTKSVGSAALKMVEEVRQFNT-I PGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTPLIV-G
Beta v._	TPQVFIFGLIVGAMLPYWFSAAMTKSVGSAALKMVEEVRQFNT-I PGLMEGLAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTPLIV-G
A.thaliana	TPKVIIFGLIVGAMLPYWFSAAMTKSVGSAALKMVEEVRQFNT-I PGLMEGTAKPDYATCVKISTDASIKEMIPPGALVMLTPLIV-G
R.rubrum	FVILGIADKSAAFSALGAMLLGVIIVTGLFVAISMTAG GGAWDNA KKYIEDG---HY---GGKGEAHKAAVTGDTVDPYKDTAGPAV
O.sativa	-IFFGV-----ETLSGLLAGALVSGVQIAISASNT GGAWDNA KKYIEAGASEHARTLGPKGS DCHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSL
Hordeum v.	-TLFGV-----ETLSGVLGALVSGVQIAISASNT GGAWDNA KKYIEAGNSEHARSLGPKGS DCHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSL
Beta v._	-IFFGV-----ETLSGVLGALVSGVQIAISASNT GGAWDNA KKYIEAGASEHARTLGPKGS EPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSL
A.thaliana	-FFFV-----ETLSGVLGALVSGVQIAISASNT GGAWDNA KKYIEAGVSEHAKSLGPKGSEPHKAAVIGDTIGDPLKDTSGPSL
	PP2
R.rubrum	NPMIKITNIVALLLAVLA-H-----
O.sativa	NLILKLMAVESLVFAPFFATHGGILFKWF
Hordeum v.	NLILKLMAVESLVFAPFFATHGGILFKYI
Beta v._	NLILKLMAVESLVFAPFFATHGGILFKIF
A.thaliana	NLILKLMAVESLVFAPFFATHGGILFKYF

Figura 3.1.2: Diseño de oligonucleótidos degenerados contra dominios conservados en H⁺-PPasas de bacterias y plantas. El alineamiento de las secuencias de las H⁺-PPasas de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* y de las plantas superiores *Oriza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Beta vulgaris* y *Arabidopsis thaliana*, permitieron la identificación de zonas altamente conservadas. Sombreado en gris se muestra el fragmento empleado en los estudios de identificación de nuevos genes que codifican H⁺-PPasas en distintos microorganismos. Las secuencias de aminoácidos muy conservadas correspondientes a los oligonucleótidos degenerados denominados PP1 y PP2 se muestran en rojo. Estos oligonucleótidos amplifican una secuencia de aproximadamente 600 nt, aproximadamente el 25-30% de la longitud total del gen, cerca del extremo 3'.

Para cada caso fue necesario optimizar varias condiciones de la reacción de PCR, principalmente, la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos, el número de unidades de polimerasa EcoTaq (Ecogen) y la necesidad o no de la presencia de DMSO para permitir la desnaturalización completa del DNA. En una reacción estándar sobre 0,5 µg de DNA molde, la mezcla de reacción sin la enzima se calentaba a 95°C durante 5 min. A continuación se añadía la polimerasa a 72°C y se realizaban 30 ciclos que consistían en una desnaturalización de 1 min a 95°C, 1 min a la temperatura de hibridación (42 ó 45°C) y 1 min a 72°C para la elongación, para acabar con un paso de 10 min a esta última temperatura. En una primera aproximación, las reacciones se llevaban a cabo en ausencia de DMSO, pero en algunos casos, tras obtener resultados negativos en las condiciones estándar, se probaron distintas concentraciones de agente desnaturizante a las dos temperaturas de hibridación mencionadas. Las condiciones específicas de cada reacción de PCR con resultados positivos se detallan en las tablas VI-VIII. En todos los casos se realizaban tres reacciones de PCR en paralelo, una con los dos oligonucleótidos y dos con cada uno de los oligonucleótidos por separado, como controles negativos.

TABLA VI: Condiciones de las reacciones de PCR para microalgas eucarióticas

Espece	Temperatura hibridación (°C)	Conc. DMSO (% v/v)	DNA pol. (U)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (cDNA)	45	2	2,5
<i>Chlorella fusca</i> (cDNA)	42	2	2,5
<i>Chlorella salina</i>	42	2	2,5
<i>Cryptomonas</i> sp.	42	--	3,5
<i>Cyanidium caldarium</i>	42	--	3,5
<i>Heterocapsa</i> sp.	45	2	2,5
<i>Isochrysis galbana</i>	42	--	2,5
<i>Micromonas pusilla</i>	42	1	2,5
<i>Nanochloris maculata</i>	42	1	2,5
<i>Nannochloropsis oculata</i>	42	2	2,5

<i>Nannochloropsis gaditana</i>	42	2	2,5
<i>Nannochloropsis salina</i>	42	1	2,5
<i>Navicula pelliculosa</i>	42	--	2,5
<i>Ochromonas danica</i> (cDNA)	42	2	2,5
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	42	--	2,5
<i>Porphyra purpurea</i>	42	--	3,5
<i>Porphyridium purpureum</i>	45	1	5
<i>Rhodomonas baltica</i>	42	2	2,5
<i>Rhodomonas salina</i>	45	--	3,5
<i>Skeletomonas costata</i>	42	--	2,5
<i>Tetraselmis chuii</i>	42	--	2,5
<i>Tetraselmis suecica</i>	42	--	2,5

En el caso de las bacterias fotosintéticas (Tabla VII) fue necesario aumentar las concentraciones de DMSO hasta el 5% (v/v) en algunos casos. Para *R. salexigens* y *R. salinarum*, las reacciones de PCR no presentaron ningún resultado positivo cuando se llevaron a cabo sobre una preparación de DNA total de los organismos en cuestión. El análisis electroforético del DNA sin digerir permitió observar la presencia de plásmidos, que representaban alrededor del 50% del DNA total. Para aislar la fracción cromosómica, 5 µg de DNA total se corrieron en geles de agarosa al 0,7% (p/v) y las bandas de más elevado peso molecular se purificaron de modo análogo al expuesto en el apartado 2.8.3.8 de Materiales y Métodos, con la excepción de que la precipitación del DNA se realizó con 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M [pH 5,2] y 0,8 volúmenes de isopropanol. El precipitado se resuspendió en 10 µl de agua MilliQ y se usó directamente como molde para la reacción de PCR, pudiendo amplificarse bandas correspondientes a H⁺-PPasas en ambos casos, lo que demuestra que los genes que codifican estas proteínas no se encuentran asociados a plásmidos en estos organismos. Esta estrategia se usó también para *Rhoseobacter denitrificans*. Sin embargo, aunque pudieron amplificarse dos fragmentos de DNA de tamaño adecuado para este organismo, no se obtuvieron secuencias lo suficientemente claras como para identificar la naturaleza de los mismos.

TABLA VII: Condiciones de las reacciones de PCR para bacterias fotosintéticas

Especie	Temperatura hibridación (°C)	Concentración DMSO (% v/v)	DNA polimerasa (U)
<i>Rhodobacter salinarum</i>	45	2	1,5
<i>Rhodothalassium salexigens</i>	45	2	1,5
<i>Rhodopseudomonas viridis</i>	45	2	2,5
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	42	5	2,5
<i>Chromatium vinosum</i>	45	2	2,5
<i>Amoebobacter roseus</i>	45	4	2,5
<i>Chlorobium limicola</i>	42	2	2,5
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	45	2	2,5
<i>Heliobacterium chlorum</i>	42	5	2,5

Con el fin de completar los estudios de filogenia molecular, se usaron como molde para la PCR muestras de DNA genómico y cDNA de distintos organismos no fotosintéticos, entre los que se encontraban bacterias del suelo (*Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Frankia*), distintos parásitos, un coanoflagelado - organismo perteneciente a la línea evolutiva de los animales - un euglenoide heterotrófico y dos arqueas halofílicas (ver Materiales y Métodos, Tabla III). Las condiciones para estas reacciones se recogen en la Tabla VIII. Para *Entamoeba histolytica*, las reacciones se llevaron a cabo tanto sobre cDNA como sobre DNA genómico, pero no pudieron obtenerse resultados positivos en este último caso.

TABLA VIII: Condiciones de las reacciones de PCR para microorganismos no fotosintéticos

Especie	Temperatura hibridación (°C)	Conc. DMSO (% v/v)	DNA pol. (U)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	45	2	2,5
<i>Entamoeba histolytica</i> (cDNA)	42	2	3,5
<i>Monosiga brevicollis</i> (cDNA)	45	2	5
<i>Astasia longa</i>	42	2	2,5
<i>Azospirillum brasiliensis</i>	42	2	2,5
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	42	2	2,5
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (2 estirpes)	42	2	2,5

Los productos obtenidos en las distintas reacciones de PCR se sometieron a electroforesis con el fin de identificar bandas de alrededor de 600 nt en el caso de las preparaciones de cDNA y de este tamaño y algo mayores en el caso de las PCRs sobre DNA genómico, según la presencia o no de intrones en los fragmentos amplificados. Las bandas de peso molecular adecuado se purificaron y se sometieron a secuenciación automática. Las secuencias obtenidas se analizaron por comparación con otras de H⁺-PPasas conocidas. De este modo, pudo determinarse la existencia de genes correspondientes a posibles H⁺-PPasas en los organismos recogidos en las tablas anteriores e identificar aquellas bandas que correspondían a hibridaciones inespecíficas de los oligonucleótidos.

Para algunos de los microorganismos se obtuvieron varios productos de PCR que, tras secuenciación, resultaron corresponder a H⁺-PPasas distintas (Figura 3.1.3), como ocurrió en el caso de las microalgas *Nannochloris maculata*, *Nannochloropsis oculata*, *Navicula pelliculosa*, *Cyanidium caldarium*, *Porphyridium purpureum*, *Porphyra purpurea*, *Cryptomonas* sp., *Isochrysis galbana*, *Rhodomonas baltica*, y *Phaeodactylum tricorutum*, el parásito apicomplejo *Cryptosporidium parvum* y la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* (2 estirpes). La nomenclatura de los distintos fragmentos se discutirá en el Apdo. 3.1.3. Especial atención merecen *P. purpurea* y *P. tricorutum*,

para las que se encontraron, respectivamente, 3 y 4 bandas de distinto tamaño correspondientes a H⁺-PPasas. En el caso de *P. tricornutum*, aunque dos de los fragmentos correspondientes a posibles H⁺-PPasas obtenidas para este organismo poseían tamaños muy similares y su separación electroforética resultaba complicada, pudo secuenciarse directamente uno de ellos. El intento de subclonación de estos fragmentos permitió obtener un plásmido que contenía el otro fragmento de DNA buscado, pudiendo así resolverse la secuencia de los cuatro productos de PCR amplificados para este organismo, que resultaron corresponder todos a genes para H⁺-PPasas parálogas.

Por otra parte, el análisis electroforético de los productos de PCR para *R. salina*, permitió distinguir la presencia de dos bandas de tamaños muy similares, que no pudieron ser separadas completamente en geles de agarosa. Por ello, el resultado de las reacciones de PCR se sometió a digestión con varias enzimas de restricción distintas. Esta estrategia permitió separar y secuenciar uno de los fragmentos amplificados. Sin embargo, no fue posible obtener la secuencia correspondiente para el segundo producto de PCR.

La microalga prasinofícea *M. pusilla* presentó hasta 5 productos de PCR distintos y para la bacteria fotosintética *R. salixigens* y el rhizobio *S. meliloti* se obtuvieron dos bandas de distinta movilidad electroforética (Figura 3.1.3); sin embargo, en cada caso sólo uno de los fragmentos presentó una secuencia análoga a las de las H⁺-PPasas conocidas.

De todas las secuencias obtenidas, sólo dos contuvieron algún intrón (Figura 3.1.4): la banda de mayor peso molecular amplificada para *P. tricornutum* (gen Ib) y el único producto de PCR amplificado para *C. salina* (Figura 3.1.4). En el primer caso, el fragmento de 715 nt contenía dos pequeños intrones canónicos (flanqueados por las secuencias GT/AG) de 78 y 69 nt, respectivamente, desde el extremo 5', similares a los encontrados en algunos protozoos (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002). Para el fragmento de *C. salina*, de 811 nt, se encontró un único intrón, también canónico, de 261 nt, situado prácticamente en el centro de la secuencia obtenida.

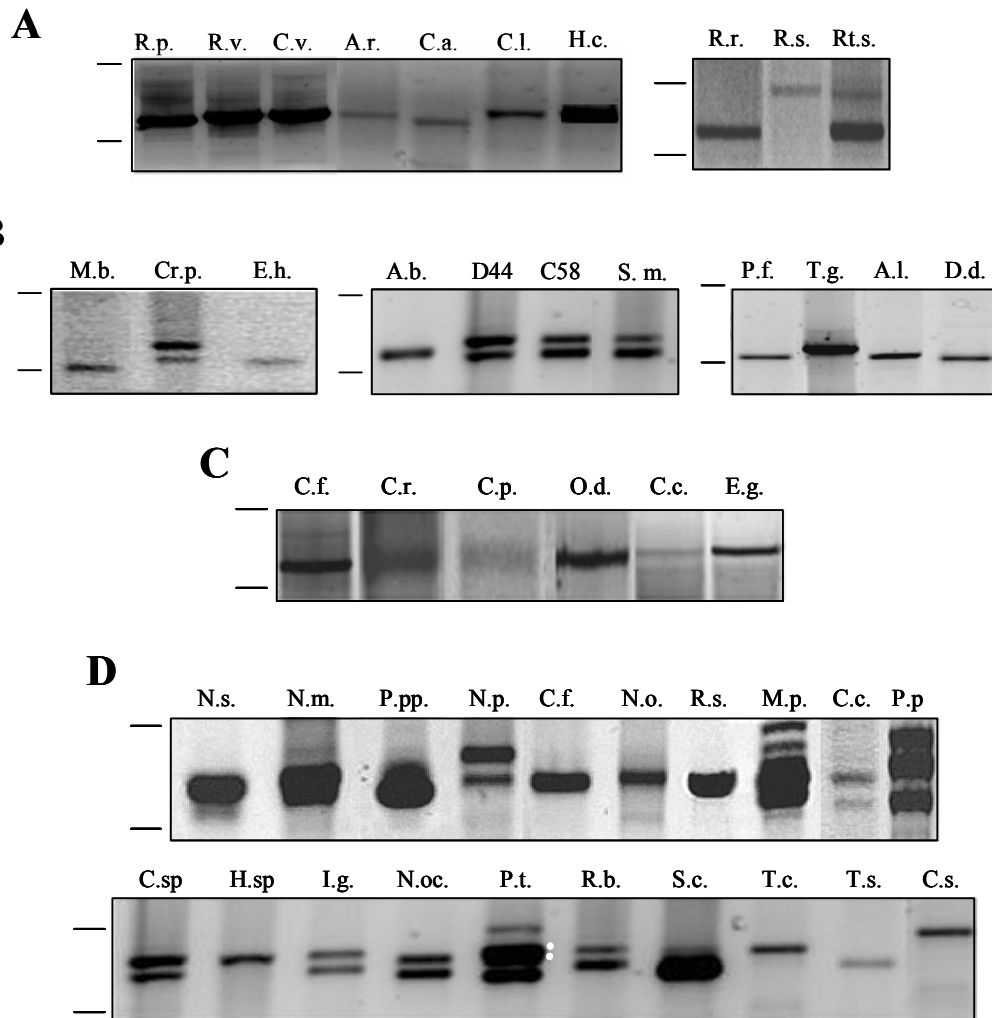


Figura 3.1.3: Análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos degenerados PP1 y PP2 para distintos organismos. Muestras de DNA genómico o cDNA de distintos organismos se usaron como moldes para reacciones de PCR con los oligonucleótidos degenerados PP1 y PP2. Los productos obtenidos en estas reacciones se sometieron a electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. A) Fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR sobre preparaciones de DNA genómico de bacterias fotosintéticas: *Rhodospseudomonas palustris* (R.p.), *Rhodospseudomonas viridis* (R.v.), *Chromatium vinosum* (C.v.); *Amoebobacter roseus* (A.r.), *Chloroflexus aurantiacus* (C.a.), *Chlorobium limicola* (C.l.), *Heliobacterium chlorum* (H.c.), *Rhodospirillum rubrum* (R.r.), *Rhodovibrio salinarum* (R.s.), *Rhodothalassium salexigens* (Rt.s.). B) Productos de PCR de distintos microorganismos no fotosintéticos: *Monosiga brevicollis* (M.b., cDNA), *Cryptosporidium parvum* (Cr.p.), *Entamoeba histolytica* (E.h., cDNA), *Azospirillum brasiliensis* (A.b.), *Agrobacterium tumefaciens* D44 (D44), *Agrobacterium tumefaciens* C58 (C58), *Sinorhizobium meliloti* (S.m), *Plasmodium falciparum* (P.f.) *Toxoplasma gondii* (T.g.), *Astasia longa* (A.l.), *Dyctiostelium discoideum* (D.d.). C) Productos de PCR sobre cDNA de distintas microalgas eucarióticas: *Chlorella fusca* (C.f.), *Chlamydomonas reinhardtii* (C.r.), *Cyanophora paradoxa* (C.p.), *Ochromonas danica* (O.d.), *Cyanidium caldarium* (C.c.) y *Euglena gracilis* (E.g.). D) Fragmentos obtenidos en reacciones de PCR sobre el DNA genómico de distintas microalgas eucarióticas. Arriba: *Nannochloropsis salina* (N.s.), *Nannochloris maculata* (N.m), *Porphyridium purpureum* (P.pp.), *Navicula pelliculosa* (N.p.), *Chlorella fusca* (C.f.), *Nephroselmis olivacea* (N.o.), *Rhodomonas salina* (R.s.), *Micromonas pusilla* (M.p.), *Cyanidium caldarium* (C.c.), *Porphyra purpurea* (P.p). Abajo: *Cryptomonas* sp. (C.sp.), *Heterocapsa* sp. (H.sp.), *Isochrysis galbana* (I.g.), *Nannochloropsis oculata* (N.oc.), *Phaeodactylum tricorutum* (P.t.), *Rhodomonas baltica* (R.b), *Skeletomonas costata* (S.c.), *Tetraselmis chuii* (T.c.), *Tetraselmis suecica* (T.s.), *Chlorella salina* (C.s). Los puntos blancos marcan la posición de los dos fragmentos de PCR obtenidos para *P. tricorutum* cuya secuenciación requirió la subclonación de uno de ellos. Las líneas corresponden a las posiciones en los geles de agarosa de los patrones de peso molecular correspondientes a 0,83 y 0,56 kb.

Chlorella salina

```

GCG GGG GGG ATT GCG GAA ATG GCT GGC ATG GGC GAG AAA ATT CGG GAG AAG
A G G I A E M A G M G E K I R E K
ACA GAT GCG CTC GAC GCC GCA GGC AAC ACC ACC GCT GCC ATT GGC AAG GGC
T D A L D A A G N T T A A I G K G
TTC GCG ATC GGA TCC GCC GCG CTG AGC CTT GCG CTC TTC GGC GCG TAC
F A I G S A A L V S L A L F G A Y
ATC ACG CGC TGC GAC ATC AGC CTG GCA GAC ACC AGC ATC CTC GAC CCT GCG
I T R C D I S L A D T S I L D P R
GTC TTC TGC GGC CTC CTC ATC GGG GCC ATG CTC CCC TAC TGG TTC TCT GCC
V F C G L L I G A M L P Y W F S A
gtg tgc ttc gtt ccc ctc gca cag cgt ttg att cag gcc tot ggc
tgc gca cat ttc tgg cgc act gct ttg ggt gag cgc ttt cga ttg
tct gcg gct cta cag aag agg gcg ctg gct tgg gcc gca cac tcc
tgt aga gct ttg tca tat cta gct atc ttc acg tct tta gaa agg
agc tcg aaa tag tca aac tgc agc gcc atg ttc aca tgg tca tcg
gca ggg aat ttg ggg tcg tcg tgc ag
ATG ACA ATG AAG TCG GTT GGC AAG GCT GCC CTG GCC ATG GTC AAC GAG GTG
M T M K S V G K A A L A M V N E V
CGA AGG CAG TTC AGC ACC ATG ACA GGC CTC ATG GAC GGT ACA CAG ACG CCA
R R Q F S T M T G L M D G T Q T P
GAC TAT AAG AAC TGC GTT GCT ATC TCG ACA AAG GCT TCG CTG GAA GAG ATG
D Y K N C V A I S T K A S L E E M
ATC GCT CCC GGC GCC CTC GTC ATG CTC TCC CCA ATC ATC GTC GCC TCC GCC
I A F G A L V M L S F I I V G S A
TTT GGG ACT TGC GCG CTC GCT GGT CTG CTC GCC GGC GCT CTC GTC TCT GGC
F G T C A L A G L A G A L V S G
GTA CAA ATG GCC ATC TTC ATG TCC AAC ACA GGT GGT GCT TGG GAT AAC GCT
V Q M A I S M S N T G G A W D N A

```

***Phaeodactylum tricornutum* (gen Ib)**

```

GCG GGG GGG ATT GCT GAG ATG GCC GAG CTG GAA GAA CGC GTC CGC GAC ACA
A G G I A E M A E L E E R V R D T
ACT GAC GCT TTG GAT GCT TTG GGT AAC ACC ACT GCT GCT ACC GGT AAG GGA
T D A L D A L G N T T A A T G K G
TTT GCT ATC GGA TCT GCT GTG CTT ACG GCA TTG TCG TTG CTT TCT GCC TTT
F A I G S A V L T A L S L L S A F
GGC TTG GGC AAC GTC ACT GAT AAG GCC AAC GTC GAC ATC GGT GAA CCT GTT
T D K A G L G N V N V D I G E P V
GTG CTT GCG GGA GTT TTG ATT GGA GCC ATG CTT CCT TTC TTG TTC GCT GCC
V L A G V L I G A M L P F L F A A
gta tgt ott tgg aao att cga gca aat ago ato ttt gac
jag cat tga ttt att aac ctt ttg ttt gtg aat ttg tag
TTG ACT ATG CTT TCA TFG CAA AAG GCT GCT GGA GCC ATC ATT ATT GAA GTC
L T M L S V Q K A A G A I I I E V
CGT CGA CAG TTC GCC GAG ATC CCT GGA CTT CGC GAA GGA ACT GCT GAG GCC
R R Q F A E I P G L R E G T A E A
GAT TCG GAC AAG TGT GTT GCG ATC TCT ACG CAG AGT TCT GTT GAA GAA ATG
D S D K C V A I S T Q S S V E E M
GTA CTC CCT GGA ATT TAC GCT ATT CTT TCG CCA ATC ACC GTC GGC TTT CTC
V L P G I Y A I L S P I T V G F L
ATT GGG CCT CGC TGC TTG ACC GGT CTT CTC GGA GGA GCG ATT GCT TCT GGT
I G P R C L T G L L G P A I S G
gta cgt aca ctg ctt ctt aaa agt gta aaa caa gct
tag ggg tcg cta atg taa aca tgc tcc tta cag
ATG ATG CTG GCA CTC ATG ATG ATT CAG TCT AAC GGN GGT GGT GCT TGG GAT
M M L A L M M I Q S N A G G A W D
AAC GCT
N A

```

Figura 3.1.4: Secuencias de nucleótidos de los fragmentos de DNA genómico amplificados por los oligonucleótidos PP1 y PP2 para la H⁺-PPasa de *Chlorella salina* y la isoforma Ib de *Phaeodactylum tricornutum*. Se muestran las secuencias de DNA junto con su traducción a aminoácidos. La posición de los intrones canónicos encontrados para cada gen se encuentran sombreadas en gris y con letra cursiva minúscula. Los extremos GT/AG se indican en negrita. Las longitudes de los mismos son 261 nt para el intrón de *C. salina* y 78 y 69 nt, respectivamente para los dos de *P. tricornutum*.

Entre los resultados obtenidos para los microorganismos no fotosintéticos cabe destacar la presencia de una H⁺-PPasa en el coanoflagelado *M. brevicollis*, que se encuentra en la base del linaje evolutivo animal (Lang *et ál.* 2002, Stechmann y Cavalier-Smith 2002), siendo ésta la primera vez que se demuestra la existencia de genes para este tipo de proteínas, ausentes en hongos y metazoos, en un organismo de esta línea evolutiva.

Las secuencias de algunas de las bandas obtenidas se enviaron a bases de datos y se les asignó un número de acceso. Algunos han sido publicados por nuestro grupo, como los de *A. longa* (AJ 251783), *P. falciparum* (AJ249300), *T. Cruzi* (AJ243978), *O. danica* (AJ251725) ó *C. reinhardtii* (AJ304836) [Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002]. En la tabla IX se recogen los números de acceso de las secuencias obtenidas durante este trabajo que no han sido publicados. El resto de las secuencias se enviarán a bases de datos próximamente.

TABLA IX: Números de acceso de algunas de las secuencias obtenidas

Microalgas eucarióticas	
<i>Chlorella fusca</i> SAG 211-8b	AJ251470
<i>Nannochloropsis gaditana</i> B-3 (gen II)	AJ251926
Bacterias fotosintéticas	
<i>Chromatium vinosum</i>	AJ251726
<i>Heliobacterium chlorum</i>	AJ251371
Microorganismos no fotosintéticos	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	gen I - AJ 251786 gen II- AJ251784

La Tabla X recoge aquellos microorganismos para los que o bien no se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado para las H⁺-PPasas, o bien sus secuencias no permitieron asignaciones claras. Cabe destacar que no pudieron amplificarse bandas del tamaño esperado para ninguna de las cianobacterias utilizadas. En los proyectos genoma de cianobacterias completados hasta el momento no ha podido identificarse ninguna secuencia correspondiente a una H⁺-PPasa, lo que confirmaría los resultados negativos obtenidos durante este trabajo.

TABLA X: Otros microorganismos utilizados

Microalgas eucarióticas
<i>Amphydinium sp.</i>
<i>Chlamydomonas euryale</i>
<i>Chlorella sorokiniana</i>
<i>Chlorella stigmatofora</i>
<i>Chlorococcum citrifforme</i>
<i>Cyanophora paradoxa</i> (cDNA* y DNA genómico*)

<i>Dunaliella salina</i>
<i>Euglena gracilis</i> (cDNA* y DNA genómico)
<i>Haematococcus pluvialis</i>
<i>Nephroselmis olivacea</i>
<i>Poterioochromonas malhamensis</i>
<i>Tetracystis</i> sp.
Cianobacterias
<i>Anabaena</i> sp.
<i>Pseudoanabaena</i> PCC6903
<i>Synechocystis</i> PCC 6803
<i>Nostoc punctiforme</i> PCC7120
Bacterias fotosintéticas
<i>Thermocromatium vinosum</i>
<i>Roseobacter denitrificans</i> *
Organismos no fotosintéticos
<i>Acantamoeba rhyodes</i>
<i>Physarum polycephalum</i> (cDNA y DNA genómico)
<i>Giardia lamblia</i>
<i>Frankia</i> sp. (2 estirpes)
<i>Dyctiostelium discoideum</i> *
<i>Halobacterium</i> sp.
<i>Halococcus</i> sp.

*Organismos para los que se obtuvieron bandas de PCR cuya secuencia no fue lo suficientemente clara como para permitir su identificación inequívoca.

Todos los fragmentos de DNA correspondientes a H⁺-PPasas identificados intentaron clonarse en un plásmido pGEM-T. Sin embargo, sólo se obtuvieron resultados positivos con dos de las bandas de menor tamaño de *P. tricorutum* y el fragmento de cDNA amplificado para *C. fusca*.

3.1.2. Análisis por Southern Blot

Para confirmar la presencia de las H⁺-PPasas encontradas a lo largo de este trabajo en el genoma del organismo en cuestión, se llevaron a cabo análisis por Southern Blot sobre el DNA genómico de distintas microalgas, usando como sonda para la hibridación los fragmentos de PCR obtenidos. Este proceso resultó altamente complicado y no pudo completarse en muchos casos, debido a la dificultad para digerir las preparaciones de DNA genómico, lo que implicó probar un número bastante amplio de enzimas de restricción distintas para cada microorganismo. En algunos de los casos en que pudo encontrarse una enzima adecuada para la digestión completa del DNA genómico, las bandas de hibridación para las sondas utilizadas se encontraban en la zona de pesos moleculares más altos, donde se localiza el DNA sin digerir. Un ejemplo de este problema se presenta en la figura 3.1.5, con el análisis por Southern Blot de *Tetraselmis chuii*. Otros ejemplos pueden verse en la figura 3.1.7.

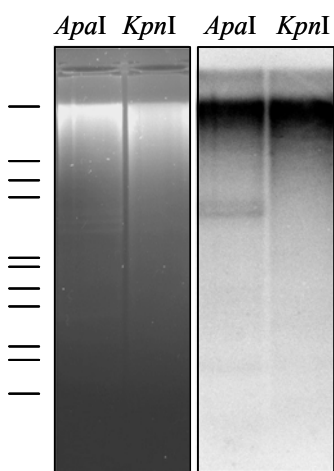


Figura 3.1.5: Análisis por Southern Blot del DNA genómico de *Tetraselmis chuii*. Muestras de 8 µg de DNA total de *T. chuii* se digirieron con las enzimas *ApaI* y *KpnI* y los fragmentos de digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de nylon, que se hibridaron con el fragmento de DNA amplificado por PCR con los oligonucleótidos degenerados PP1 y PP2. La posición de los patrones de peso molecular se indica con líneas: de arriba abajo, 21,3; 5,1; 4,2; 3,5; 2,0; 1,9; 1,6; 1,3; 0,9; 0,83 y 0,56 kb. A pesar de que la digestión del DNA parecía completa en el caso de *KpnI*, las bandas de hibridación se obtuvieron en la zona de mayor peso molecular, correspondiente al DNA sin digerir. Otros ejemplos pueden verse en la figura 3.1.7.

Para estos experimentos se prestó especial atención a aquellos organismos que presentaban más de una banda distinta correspondiente a una posible H⁺-PPasa. Los resultados se presentan en la figura 3.1.6. En el caso de *P. tricornutum*, se pudo determinar la presencia de tres de las bandas encontradas en el DNA genómico del organismo. La hibridación con el cuarto fragmento de DNA amplificado no pudo llevarse a cabo debido a la dificultad para separar dicho producto de PCR de otros de tamaño similar en geles de agarosa y a que no fue posible clonarlo en un vector, por lo que no

pudo obtenerse una sonda adecuada. Para *N. maculata* y *R. baltica*, los dos fragmentos amplificados en cada caso presentaron hibridación específica con el DNA genómico del organismo en cuestión. En el caso de *Cryptomonas* sp., sólo se consiguieron sondas para dos de los tres fragmentos de PCR obtenidos. Es importante destacar, en cualquier caso, que la analogía de secuencias encontrada entre los genes Ia y I sugiere que ambos podrían ser en realidad un mismo gen, para el que podrían haberse producido errores en el proceso de amplificación/secuenciación. Las bandas de hibridación del análisis por Southern Blot fueron idénticas para las dos sondas usadas, correspondientes a los genes I y II. Dado que la misma membrana se hibridaba sucesivamente con los distintos fragmentos de DNA, cabía la posibilidad de que el resultado obtenido para la segunda sonda fuera debido a la radiactividad residual de la primera hibridación, que no se hubiera eliminado al limpiar la membrana. Por ello, tras hibridar con la primera sonda y limpiar la membrana, se comprobó que había sido eliminada toda la radiactividad, mediante la exposición de una pantalla sensible a la radiación β durante 24 h. Una vez comprobada la limpieza de la membrana, se procedió a la hibridación con la segunda sonda, que reconoció los mismos fragmentos de DNA genómico que la primera. Además de los análisis por Southern Blot con sondas homólogas que se muestran en las figuras 3.1.5 y 3.1.6, se llevaron a cabo otros para las microalgas *N. salina* y *T. suecica*. Las bandas de hibridación se encontraron en este caso en la zona del DNA no digerido.

Asimismo, se realizaron análisis por Southern Blot con sondas heterólogas sobre preparaciones de DNA genómico de *E. gracilis* y *D. salina*, con el fin de detectar la presencia de genes para H^+ -PPasas en estas microalgas, para las que no se habían obtenido resultados positivos mediante la estrategia de PCR, pero que, sin embargo, sí habían presentado bandas de inmunodetección en los análisis por Western Blot. Las sondas utilizadas en este caso correspondían a fragmentos de cDNA amplificados con los oligonucleótidos degenerados PP1 y PP2 de las H^+ -PPasas de *C. fusca* y de la isoforma independiente de K^+ de *A. thaliana*, AVP2. Estos análisis no fueron concluyentes debido a que las bandas de hibridación de las distintas sondas se encontraban una vez más en la zona de más elevado peso molecular (Figura 3.1.7). Sin embargo, cabe destacar que, mientras que la hibridación con una sonda heteróloga para la H^+ -PPasa de *C. fusca* permitió observar bandas para ambas microalgas, cuando la hibridación se realizaba con

el fragmento de DNA correspondiente a AVP2, sólo las membranas que contenían el DNA de *E. gracilis* presentaron resultados positivos.

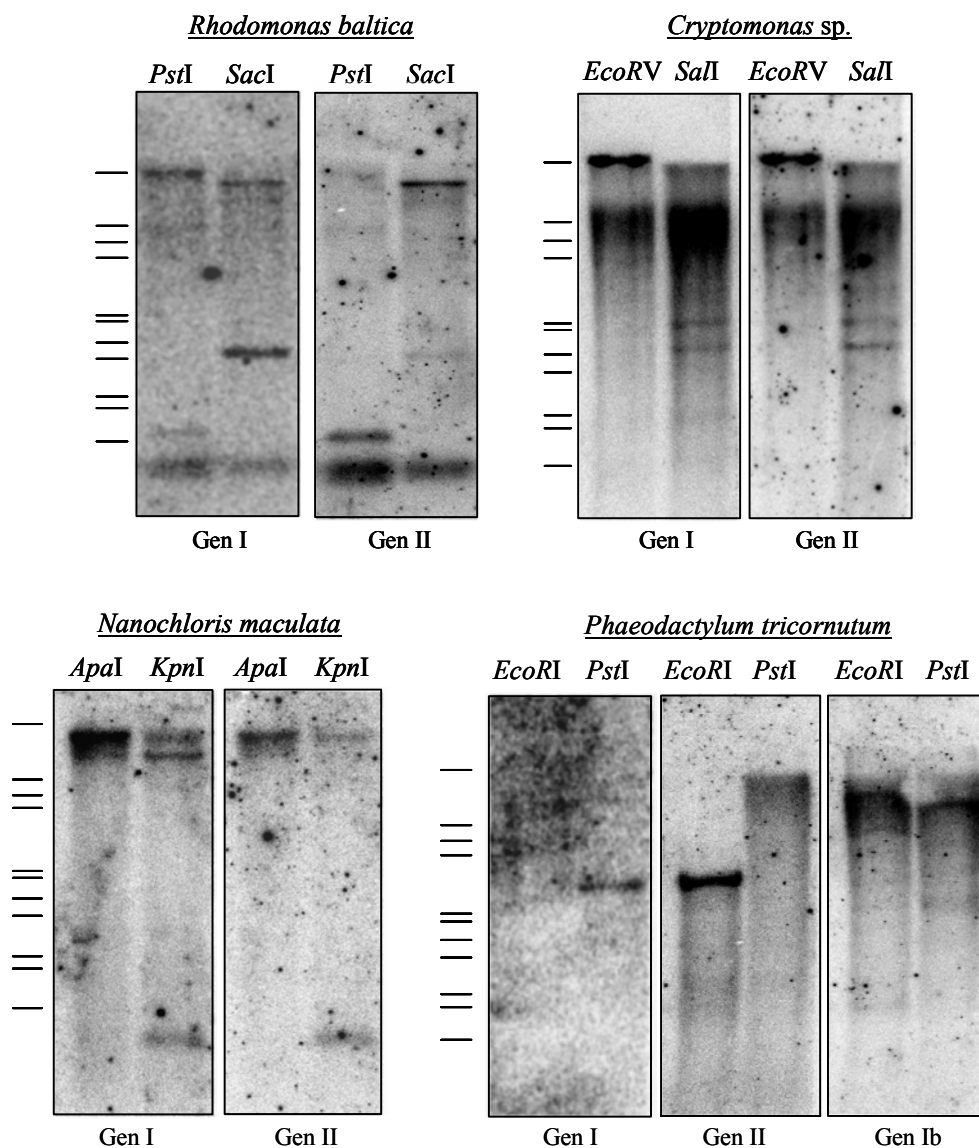


Figura 3.1.6: Análisis por Southern Blot del DNA genómico de distintas microalgas eucarióticas mediante el uso de sondas de H⁺-PPasas. Muestras de 8 µg de DNA genómico de las microalgas eucarióticas *Rhodomonas salina*, *Cryptomonas sp.*, *Nanochloris maculata* y *Phaeodactylum tricornutum*, se sometieron a digestión con distintas enzimas y los fragmentos de restricción se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron a filtros de membrana, que se hibridaron con los distintos productos de PCR obtenidos en cada caso con los oligonucleótidos degenerados PP1 y PP2. La posición de los marcadores de peso molecular se indica con líneas: de arriba abajo, 21,3; 5,1; 4,2; 3,5; 2,0; 1,9; 1,6; 1,3; 0,9; 0,83 y 0,56 kb.

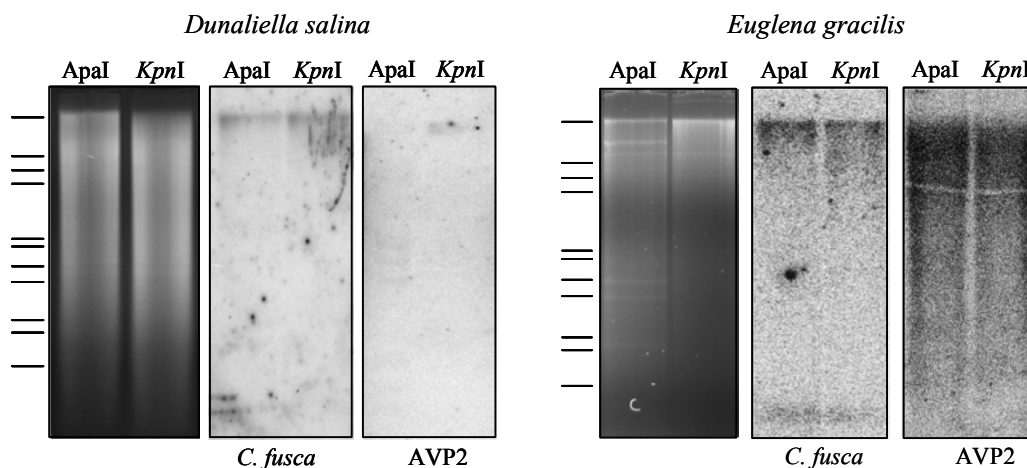


Figura 3.1.7: Análisis por Southern Blot heterólogo para las microalgas *Dunaliella salina* y *Euglena gracilis*. Muestras de 12 μ g de DNA genómico de *D. salina* y *E. gracilis* se digirieron con las enzimas *ApaI* y *KpnI*, se sometieron a electroforesis y se transfirieron a filtros de membrana, que se hibridaron con sondas heterólogas correspondientes a las H⁺-PPasas de *C. fusca* y la isoforma independiente de K⁺ de *A. thaliana*, AVP2. Las posiciones de los marcadores de peso molecular se indican con líneas: de arriba abajo, 21,3; 5,1; 4,2; 3,5; 2,0; 1,9; 1,6; 1,3; 0,9; 0,83 y 0,56 kb.

Con el fin de identificar posibles isoformas de H⁺-PPasas en el genoma de *T. suecica* y *T. chuii*, se utilizó también la estrategia de Southern Blot heterólogo, debido a la evidente relación filogenética existente entre estos dos organismos. Para estas dos microalgas, se habían amplificado fragmentos de PCR de distintos tamaños, cuya secuencia parecía corresponder a dos H⁺-PPasas bastante distintas. Debido a la evidente relación filogenética existente entre estos dos organismos, intentó usarse la estrategia del Southern heterólogo para identificar posibles isoformas de H⁺-PPasas en el genoma de los mismos. Sin embargo, una vez más, el problema de la dificultad para digerir completamente el DNA genómico impidió obtener resultados definitivos, dado que la hibridación se produjo en la zona correspondiente al DNA no digerido.

3.1.3. Estudios de filogenia molecular

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a los fragmentos de DNA obtenidos durante este trabajo, así como otras obtenidas en nuestro grupo (Pérez-Castiñeira *et al.* 2002) y algunas provenientes del sitio web de genomas microbianos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/Complete.html>), se utilizaron en un alineamiento usando el programa Clustal X (1.64 b). Los resultados de este alineamiento se presentan en la figura 3.1.8.

La comparación de las distintas secuencias permitió observar la presencia de distintos residuos conservados, localizándose la zona menos variable al principio del fragmento amplificado por los oligonucleótidos PP1 y PP2. Mediante alineamiento de las secuencias de las H⁺-PPasas dependientes e independientes de K⁺ caracterizadas bioquímicamente, tanto en membranas nativas como heterólogas, con otras provenientes de bases de datos y proyectos genoma, Belogurov y Lahti (2002) identificaron dos residuos que presentaban una sustitución muy clara según la actividad de la H⁺-PPasa fuera (posiblemente) dependiente o independiente de la presencia del ion K⁺, (K/A) y (T/G), separados entre sí por dos aminoácidos. Sin embargo, experimentos de mutagénesis dirigida demostraron que sólo el primero de estos residuos parece ser esencial para la estimulación por K⁺. Estos residuos se encuentran dentro del fragmento usado en nuestros estudios de filogenia molecular y el amino ácido (K/A) que determina la dependencia de K⁺ se marca en rojo en la figura 3.1.8. En la parte superior de la figura se agrupan aquellas secuencias de aminoácidos que poseen una lisina en esa posición y que, por tanto, serían independientes de K⁺ (correspondientes a los genes denominados II), entre las que se encuentran algunas caracterizadas bioquímicamente, como las de la bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodospirillum rubrum* (Randahl 1979), la bacteria termofílica *Pyrobaculum aerophilum* (Drozdowicz *et ál.* 1999) y la isoforma independiente de K⁺ de *A. thaliana*, AVP2 (Drozdowicz *et ál.* 2000), así como la H⁺-PPasa de la bacteria verde no sulfurosa *Chloroflexus aurantiacus*, caracterizada durante esta Tesis Doctoral (ver Apdo. 3.2). En la zona inferior se agrupan las secuencias que poseen el residuo de alanina que determinaría la estricta dependencia de K⁺ para el desarrollo de la actividad máxima (correspondientes a los genes denominados I). También en este grupo existen algunas H⁺-PPasas que han sido caracterizadas bioquímicamente, como las de *Chlamydomonas reinhardtii* (Pérez-Castiñeira *et ál.* en preparación), *Thermotoga maritima* (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001), *Trypanosoma cruzi* (Scott *et ál.* 1998), y las isoformas dependientes de K⁺ de *A. thaliana*, AVP1 (Britten *et ál.* 1989), y *Plasmodium falciparum*, PfVP1 (McIntosh *et ál.* 2001). Algunas de las secuencias obtenidas para H⁺-PPasas dependientes de K⁺ en este trabajo, sin embargo, presentan serina o treonina en vez de alanina en esa posición.

Además de este residuo, el alineamiento de las secuencias llevado a cabo en este trabajo ha permitido identificar otros que siguen una pauta análoga de presencia o

ausencia según la dependencia esperada de la proteína por K^+ . Así, en el motivo $(K/A)A^V_I(T/G)KG(Y/F)AI^G_A SA(G/A)$, en que el primer residuo es la lisina esencial propuesta por Belogurov y Lahti (2002), existen otras tres sustituciones que podrían estar relacionadas con el efecto del K^+ .

El primero de estos residuos $[(K/A)A^V_I(\underline{T/G})KG(Y/F)AI^G_A SA(G/A)]$ ya fue analizado mediante mutagénesis dirigida por Belogurov y Lahti y, aunque parece ser importante - una sustitución de treonina por alanina en esa posición genera una proteína con tres veces menos actividad que la estirpe silvestre - no parece ser un residuo esencial para la estimulación por K^+ .

El segundo de los residuos $[(K/A)A^V_I(T/G)KG(\underline{Y/F})AI^G_A SA(G/A)]$ presenta una sustitución de tirosina (en H^+ -PPasas independientes de K^+) por fenilalanina (en H^+ -PPasas dependientes de K^+). Sin embargo, las secuencias de AVP2, PfVP2, y el gen II de *C. caldarium*, independientes de K^+ , son una excepción ya que presentan una fenilalanina en esta posición.

El último residuo que presenta cambios claros entre H^+ -PPasas dependientes e independientes de K^+ $[(K/A)A^V_I(T/G)KG(Y/F)AI^G_A SA(\underline{G/A})]$ supone la sustitución de glicina (en las independientes) por alanina (en las dependientes). Las excepciones se centran fundamentalmente en las microalgas eustigmatofíceas y *N. maculata* - que presentan una serina en esa posición - y AVP2, PfVP2 y el gen II de *C. caldarium*, que presentan una alanina, a pesar de ser independientes de K^+ . Además, las posibles isoformas independientes de K^+ de las microalgas eustigmatofíceas (*Nannocloropsis*) y la clorofíceas *N. maculata* también presentan un cambio característico de una alanina conservada en prácticamente todo el resto de las secuencias dentro del mismo motivo $[(K/A)A^V_I(T/G)KG(Y/F)\underline{A}I^G_A SA(G/A)]$ por una serina.

Las siete secuencias de aminoácidos que no parecen seguir la pauta de residuos conservados analizados hasta este punto, presentan además un residuo de cisteína en el dominio $^D_E YXX(\underline{C/A})^V_I X^I_L XT$ (donde X es un aminoácido no conservado), situado hacia el final del fragmento usado en nuestros alineamientos. Este residuo es una alanina en la mayor parte de las H^+ -PPasas independientes de K^+ , excepto para las siete mencionadas, y cisteína para las proteínas dependientes de K^+ . La presencia de cisteína en esa posición es necesaria para la inhibición de las H^+ -PPasas por N-etilmaleimida o mersalil, pero no parece estar directamente involucrado en la catálisis, según se deduce de análisis por

mutagénesis dirigida (Kim *et ál.* 1995, Belogurov *et ál.* 2002). Nuestros resultados, basados en un número mucho más elevado de secuencias que las disponibles hasta este momento, sugieren la presencia de nuevos residuos que podrían estar involucrados en la estimulación por K^+ de las H^+ -PPasas. Sólo dos de estos residuos han sido analizados mediante mutagénesis dirigida, por lo que serían necesarios más experimentos de este tipo para determinar la implicación de cada uno de ellos en la unión del catión.

Por otro lado, es importante destacar la presencia, en el fragmento de DNA amplificado con los oligonucleótidos PP1 y PP2, de secuencias de aminoácidos adicionales entre los distintos segmentos transmembrana en las H^+ -PPasas posiblemente independientes de K^+ con respecto a aquellas cuya actividad depende de la presencia de este ion (Figura 3.1.8). De este modo, cuando las secuencias no presentan intrones, la movilidad de los productos de PCR en un gel de agarosa permite distinguir la presencia de genes parálogos de H^+ -PPasas con distinta dependencia de potasio en un organismo determinado (Figura 3.1.4), dado que los fragmentos de peso molecular más elevado corresponderían a posibles H^+ -PPasas independientes de potasio con sus secuencias adicionales, mientras que los de menor tamaño corresponderían a H^+ -PPasas dependientes de este ion. Dada la baja densidad de intrones existente en los microorganismos utilizados, la visualización de la presencia de más de un gen para H^+ -PPasas mediante análisis por electroforesis en geles de agarosa ha sido frecuente durante este trabajo (Figura 3.1.4). Así, por ejemplo, en el caso de las rodofíceas y eustigmatofíceas, las secuencias de los fragmentos de mayor peso molecular (genes II) se encuentran en el alineamiento en la zona correspondiente a las H^+ -PPasas independientes de K^+ , mientras que las bandas de menor tamaño (genes I) se encuentran con las H^+ -PPasas dependientes. Por regla general, para los organismos procarióticos, los fragmentos amplificados son de tamaño análogo a los de mayor peso molecular encontrados en los microorganismos eucarióticos, lo que estaría en consonancia con la independencia de K^+ predicha para las H^+ -PPasas procarióticas. Sólo en dos de los procariotas analizados en este trabajo se han encontrado H^+ -PPasas dependientes de K^+ : la bacteria hipertermofílica *Thermotoga maritima* y la bacteria verde no sulfurosa *D. ethenogenes* (gen I), que carecen de los dominios adicionales correspondientes a las H^+ -PPasas independientes de K^+ y, por tanto, generarían productos de PCR con los oligonucleótidos PP1 y PP2 de menor tamaño que los típicamente encontrados para otros procariotas. Además, se ha descrito otra H^+ -PPasa

dependiente de K^+ en este tipo de organismos, la de *Carboxidothermus hydrogenoformans* (Belogurov y Lahti 2002), que también presenta las características típicas encontradas en el fragmento usado en estos estudios de filogenia molecular. Es importante destacar el caso de las H^+ -PPasas de las prasinofíceas *T. chuii*, posiblemente independiente de K^+ , y *T. suecica*, para la que el único fragmento de DNA amplificado correspondería a una proteína dependiente de K^+ . Como puede observarse en la Figura 3.1.3, el producto de PCR obtenido para la primera presenta un tamaño en los geles de agarosa claramente mayor que el de la segunda. Una excepción a esta regla de tamaños la presentan los tres fragmentos de DNA amplificados para *Porphyra purpurea*, que corresponden a H^+ -PPasas dependientes de K^+ en todos los casos, sin que ninguna de las secuencias obtenidas presentara algún intrón, aunque la secuencia de aminoácidos correspondiente al gen Ib presenta dominios adicionales análogos a los de la H^+ -PPasa de la ulvofícea *A. mediterránea*.

Los resultados de este alineamiento se usaron para la obtención de un árbol de distancias generado con el programa CLUSTAL X usando la metodología "neighborg-joining" y una matriz BLOSUM (Figura 3.1.9). Este árbol de distancias apoya la existencia de dos grandes subfamilias de H^+ -PPasas según el requerimiento de K^+ para desarrollar su actividad máxima. En la base del grupo de las H^+ -PPasas dependientes de K^+ se encuentra la proteína de *T. maritima*, caracterizada bioquímicamente en nuestro grupo (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001), mientras que cerca de la base del grupo de las independientes de K^+ se encuentran la isoforma AVP2 de *A. thaliana* y la H^+ -PPasa de *P. aerophilum*, que también han sido caracterizadas bioquímicamente (Drozdowicz *et ál.* 2000, Drozdowicz *et ál.* 1999), lo que apoyaría la validez de la subdivisión de las H^+ -PPasas en dos subfamilias, divergentes desde el punto de vista evolutivo.

Además, los estudios filogenéticos demuestran que las H^+ -PPasas eucarióticas presentan dos diferentes linajes evolutivos. Por una parte, se encuentra un grupo representado por las prototípicas H^+ -PPasas de plantas, donde se encuentran también clorofíceas (*Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Chara*), parásitos apicomplejos (*Plasmodium*, *Toxoplasma*), ciliados (*Paramecium*, *Tetrahymena*, *Vorticella*), tripanosomátidos (*Herpetomonas*, *Chritidia*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*, *Leptomonas*, *Phytomonas*, *Leishmania*) y algunos heterocontes, tanto fotosintéticos (*Ochromonas*) como heterotróficos (*Phytophthora*). Por otro lado, existe un segundo grupo de H^+ -PPasas

eucarióticas, más próximas a las de las proteobacterias, que incluye fundamentalmente las proteínas de protistas fototróficos con plástidos complejos (Criptofíceas, rodofíceas, dinofíceas, haptofíceas, diatomeas,...) y algunas algas marinas (rojas y verdes). Estos resultados sugieren distintas historias evolutivas y/o la existencia de fenómenos de transferencia génica horizontal.

En resumen, los oligonucleótidos PP1 y PP2 han permitido identificar durante esta Tesis Doctoral H^+ -PPasas, tanto dependientes como independientes de K^+ en todos los grupos principales de protistas fotosintéticos: clorofíceas, criptofíceas, dinofíceas, euglenofíceas, haptofíceas, heterocontes (bacilariofíceas, eustigmatofíceas) y rodofíceas, la mayor parte de las cuales no se encuentran dentro del linaje evolutivo de las plantas y se ha encontrado el primer indicio de la existencia de estas proteínas en el linaje evolutivo animal, al haberse amplificado un fragmento de DNA correspondiente a una H^+ -PPasa en el coanoflagelado *M. brevicollis*, que se encuentra en la base de este linaje evolutivo (Lang *et ál.* 2002, Stechmann y Cavalier-Smith 2002 y 2003). Además, otros trabajos análogos llevados a cabo en nuestro grupo, permitieron demostrar la presencia de estas proteínas en protozoos, tanto parásitos como de vida libre (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002). Estos resultados ponen de manifiesto la validez de esta pareja de oligonucleótidos en la identificación de H^+ -PPasas en organismos de muy distintos grupos taxonómicos y en la predicción, usando la secuencia de aminoácidos correspondiente al fragmento de DNA amplificado, de la dependencia o independencia de K^+ de las mismas. Además, las secuencias de H^+ -PPasas obtenidas recientemente de proyectos genoma para su inclusión en los estudios de filogenia molecular corresponden a plantas o a organismos procarióticos en su mayoría, por lo que este trabajo contribuye en gran medida al conocimiento de la distribución de las H^+ -PPasas en los protistas.

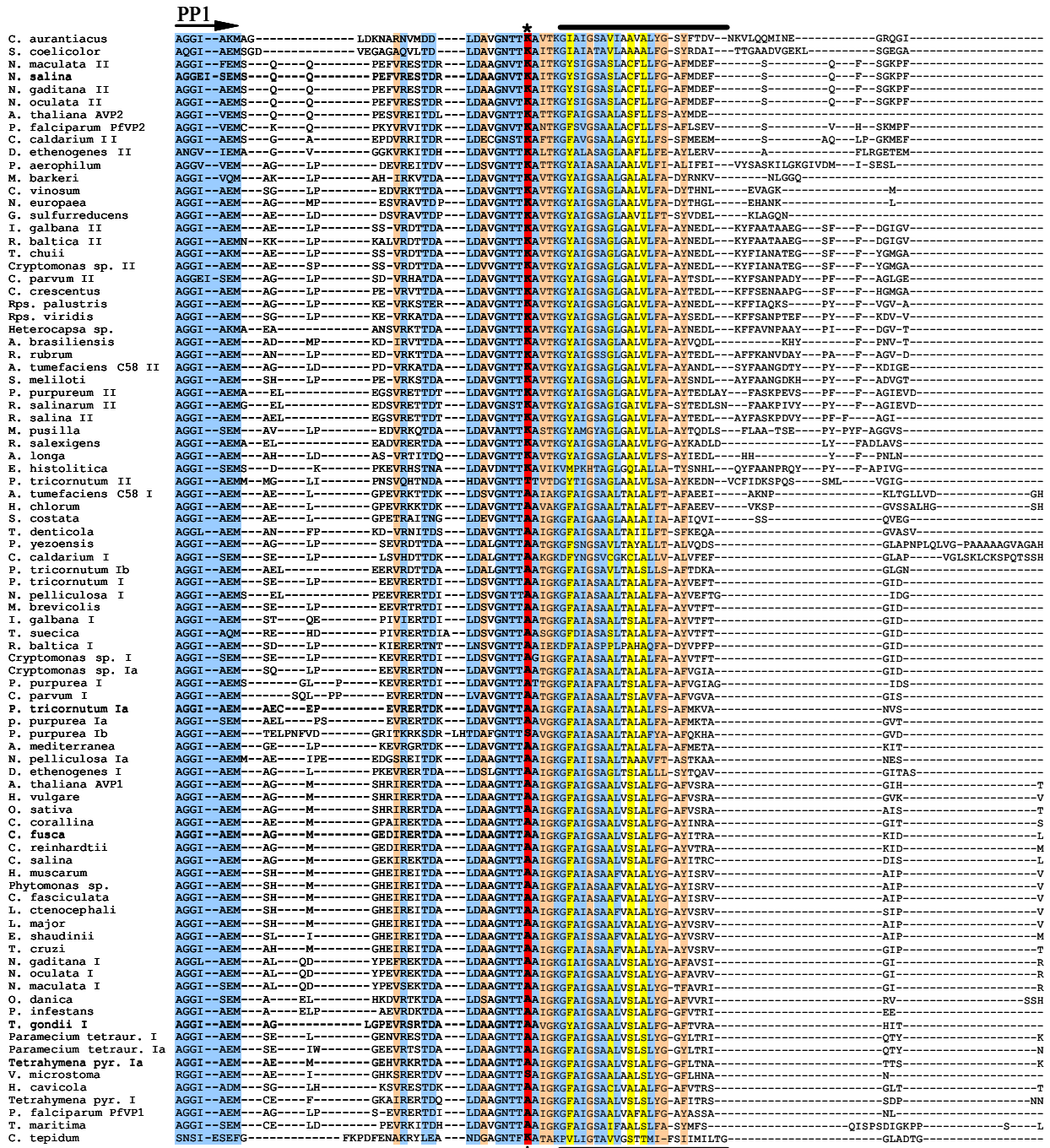


Figura 3.1.8: Alineamiento de secuencias parciales de H⁺-PPasas para microorganismos de distintos orígenes filogenéticos. El alineamiento se realizó con el programa Clustal X versión 1.64b. En color azul se marcan aquellos residuos totalmente conservados en más del 80% de las secuencias utilizadas en el alineamiento. En color rosa, residuos que presentan sustituciones conservativas en al menos el 80% de las secuencias. En color amarillo, sustituciones no conservativas que cumplen el mismo requisito. En rojo y con asteriscos encima y debajo, se marca el residuo de K/A que, según se ha propuesto (Belogurov y Lahti 2002), determina la dependencia o no de la actividad de esta proteína de potasio. La secuencia de aminoácidos correspondiente a los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de DNA de los diferentes microorganismos se marcan con flechas situadas sobre el alineamiento. Las barras horizontales encima y debajo de las secuencias de aminoácidos indican la posición de los segmentos transmembrana predichos por el programa TMpred. En las secuencias de *P. tricorntum* (gen Ib) y *C. salina*, la posición de los intrones se marca con una punta de flecha en color rojo. Cuando un microorganismo posee más de una secuencia en el alineamiento, los genes se nombran con números romanos a continuación del nombre de la especie, según su supuesta dependencia de K⁺, siendo los genes I los que corresponden a las posibles H⁺-PPasas dependientes de K⁺ y los genes II los correspondientes a las proteínas cuya actividad sería independiente de la presencia de este ion.

(continúa)

C. aurantiacus	-----ELLASINVAAPPV--F IGLLIG--GAVPELFSALTRIVASRAAQIVNEVRQFR--IFGLME-----	-----GKVPQ-----	DYARAVQISTTA--AQ
S. caelicolor	-----PMTLMDDISQNN--L VGLIAG--AAVVELPESGLAINVRSRAGAVVVEVRQFRERPGIMD-----	-----YSEKP-----	EYKVVDCIRDA--AL
N. maculata II	-----RVVDIAPEV--L IGGIIG--TMMVEYFVGLTVAAVKTAGEVVEVRQFRDNPIMT-----	-----FKARP-----	DYRSCVALVTHA--AL
N. salina	-----RVVDIAPEV--L IGGIIG--TMMVEYFVGLTVAAVKTAGEVVEVRQFRDNPIMT-----	-----FKARP-----	DYRSCVALVTHA--AL
N. gaditana II	-----RVVDIAPEV--L IGGIIG--TMMVEYFVGLTVAAVKTAGEVVEVRQFRDNPIMT-----	-----FKARP-----	DYRSCVALVTHA--AL
N. oculata II	-----RTVDIAPEV--L IGGIIG--TMMVEYFVGLTVAAVKTAGEVVEVRQFRDNPIMT-----	-----FKARP-----	DYRSCVALVTHA--AL
A. thaliana AVP2	-----VDIAIPEV--F VGGLLG--AMLIFLPSAWACAAVGTAGEVVEVRQFRTERPGIME-----	-----YKEKP-----	DYRSCVALVTHA--AL
P. falciptarum PfvP2	-----STVDIAIPEV--F IGGIIG--SVVVELPAGWSLDAVGTAGEVVEVRQFRNEHPGILT-----	-----YKEKP-----	DYRSCVALVTHA--AL
C. caldarium II	-----RTVDIAPEV--F TAGLLG--AAVVELPESGLAINVRSRAGAVVVEVRQFRERPGIMD-----	-----GTEKP-----	EYKVVDCIRDA--AL
D. ethenogenes II	-----MAVDSRPEV--F VGGLLG--VALVFFSVAIKAVGKTASKIEEVRQFRADPGILA-----	-----GTSRP-----	DYRSCVALVTHA--GL
P. serophilum	-----SGLQINANV--L IGAFLG--VALVFFSRTLEPVGRTIMEVVEVRQFRERPGILEW-----	-----KEQP-----	DYRSCVALVTHA--AL
M. barkeri	-----SNLDDPVV--L AGLLLG--ALLPEIFSAVTMSVGRAAEVVEVRQFRERPGIMD-----	-----G-TARP-----	DYRSCVALVTHA--AL
C. vinosum	-----QVFSLSDPV--L IGLFTG--GLVPELPGAMAMEAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTAKP-----	DYRSCVALVTHA--AL
N. europaea	-----MTFDLSNHLV--I IGLFTG--GMVPELPGAMAMEAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GSRKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
G. sulfurreducens	-----IEFSLADPYI--I IGLFTG--GMLPYFPAALCMAVGRAAGSVEVRQFRERPGIME-----	-----GTGKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
I. galbana II	-----VNFSIANPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TSKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
R. baltica II	-----VNFSIANPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TSKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
T. chuii	-----VDFSIANPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----Y-DEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
Cryptomonas sp. II	-----VDFSIANPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----Y-DEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
C. parvum II	-----IAFDLTPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----Y-BTKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
C. crescentus	-----VTFDLSNPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-EVKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
Rps. palustris	-----PDFSLNNPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TDKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
Rps. viridis	-----IDFSLSNPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----Y-KVKE-----	DYRSCVALVTHA--AI
Heterocapsa sp.	-----FVNLLEKPY--I IGLFTG--GMVPELPGAMAMEAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GKA-----	DYRSCVALVTHA--AI
A. brasiliensis	-----VEFRLDDPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TAKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
R. rubrum	-----VNFSLSSPYV--V VGLFTG--GLLPELPGGSMMAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TAKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
A. tumefaciens C58 II	-----ISFSLANPYV--V AGLLFG--GLIPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
S. meliloti	-----ISFDLSNPYV--V AGLLFG--GLIPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-KDRP-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. purpureum II	-----FSLSKPYV--V IGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----Y-EEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
R. salinarum II	-----FALSNPYV--V VGVVFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----Y-CEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
R. salina II	-----EVDLALSNPYV--V VGLLFG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----Y-EEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
M. pusilla	-----DFSLSNPYV--V VGLFVG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
R. salexigens	-----FELTNPYV--V VGLFVG--GLLPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
A. longa	-----IDFNLQDPV--I VGLFAG--GILPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-BNKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
E. histolytica	-----TISFDLSNPYV--A PDLTHNGGLIHPMPGRIAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-TSKPQ-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. tricornutum II	-----AAMFPIVNPYV--V IDPLVG--GMPMILDGLICLMDIRPAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----YHKPK-----	DYRSCVALVTHA--AI
A. tumefaciens C58 I	-----LVNMLTEPGV--I IGLFTG--ATLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTG-----	DYRSCVALVTHA--AI
H. chlorum	-----FVNLLEKPY--I IGLFTG--GMVPELPGAMAMEAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GKA-----	DYRSCVALVTHA--AI
S. costata	-----FSLDIGNPYV--L MGVFLG--GIPPEIVSAMTMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----GKA-----	DYRSCVALVTHA--AI
T. denticola	-----DITNINV--L VGVLLG--GVPELPGGSMMAVGRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----NTEKP-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. yezoensis	-----VDV--G--GQVVSVDVYV--V VSVFIG--IMLPEFFGALTMLAVSRAAQVVEVRQFRERPGIME-----	-----APGVR-----	DYRSCVALVTHA--AI
C. caldarium I	-----VIEL--L--DVLQTDIYV--V ASMLVG--IMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GPGVS-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. tricornutum Ib	-----VNVDIGEPV--L AGLVIG--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----TAEA-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. tricornutum I	-----GINIYKADV--L AALFIG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----EGT-----	DYRSCVALVTHA--AI
N. pelliculosa I	-----GINIYKADV--L AALFIG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----TGT-----	DYRSCVALVTHA--AI
M. brevicollis	-----GINIYKADV--L AALFIG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----EGT-----	DYRSCVALVTHA--AI
I. galbana I	-----GINIFKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----EGT-----	DYRSCVALVTHA--AI
T. suecica	-----GINIFKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----EGT-----	DYRSCVALVTHA--AI
R. baltica I	-----GINIFKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----EGT-----	DYRSCVALVTHA--AI
Cryptomonas sp. I	-----GINIFKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----EGK-----	DYRSCVALVTHA--AI
Cryptomonas sp. Ia	-----SIDYKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----EYK-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. purpurea I	-----SIDYKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. purpureum I	-----SIDYKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. tricornutum Ia	-----SIDYKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. purpurea Ia	-----SIDYKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. purpurea Ib	-----SIDYKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-----	DYRSCVALVTHA--AI
A. mediterranea	-----SIDYKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-----	DYRSCVALVTHA--AI
N. pelliculosa Ia	-----SIDYKAPV--L AMLFVG--GMVPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-----	DYRSCVALVTHA--AI
D. ethenogenes I	-----QVSLDVKV--L AGLLLG--VMPAPVCSALTAKAVGTAGEVVEVRQFRERPGIME-----	-----G-----	DYRSCVALVTHA--AI
A. thaliana AVP1	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
H. vulgare	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
O. sativa	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTT-----	DYRSCVALVTHA--AI
C. corallina	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTV-----	DYRSCVALVTHA--AI
C. fusca	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
C. reinhardtii	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. salina	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
H. muscivora	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
Phycomonas sp.	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
C. fasciculata	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
I. ctenocephala	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
L. major	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
E. shaudinii	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
T. cruzi	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
N. gaditana I	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
N. oculata I	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
N. maculata I	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
O. danica	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. infestans	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
T. gondii I	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
Paramecium tetraur. I	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
Paramecium tetraur. Ia	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
Tetrahymena pyr. Ia	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
V. microstoma I	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
H. cavicola	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
Tetrahymena pyr. I	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
P. falciptarum PfvP1	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
T. maritima	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI
C. tepidum	-----D--VLTPEKVI IGLLVC--AMLPELPGGAMTAVGRAASVVEVRQFRERPGIME-----	-----GTA-----	DYRSCVALVTHA--AI

Figura 3.1.8 (continuación): Se incluyeron las secuencias obtenidas durante este trabajo, secuencias previamente publicadas por nuestro grupo y algunas provenientes del sitio web de genomas microbianos del NCBI. De este trabajo: Microalgas: *Nannochloris maculata* (2), *Nannochloropsis oculata* (2), *Nannochloropsis gaditana* (2), *Nannochloropsis salina* (2), *Cyanidium caldarium* (2), *Isochrysis galbana* (2), *Rhodomonas baltica* (2), *Tetraselmis chuii* (1), *Cryptomonas* sp. (3), *Heterocapsa* sp. (1), *Porphyridium purpureum* (2), *Rhodomonas salina* (1), *Micromonas pusilla* (1), *Phaeodactylum tricornutum* (4), *Skeletomonas costata* (1), *Navicula pelliculosa* (2), *Isochrysis galbana* (2), *Tetraselmis suecica* (1), *Porphyra purpurea* (3), *Chlorella fusca* (1), *Chlorella salina* (1). Bacterias fotosintéticas: *Chromatium vinosum* (1), *Rhodospseudomonas palustris* (1), *Rhodospseudomonas viridis* (1), *Rhodovibrio salinarum* (1), *Rhodothalassium salexigens* (1), *Heliobacterium chlorum* (1). Organismos no fotosintéticos: *Cryptosporidium parvum* (2), *Azospirillum brasiliensis* (1), *Agrobacterium tumefaciens* C58 (2), *Sinorhizobium meliloti* (1), *Entamoeba histolytica* (1), *Monosiga brevicollis* (1). Otras secuencias publicadas por nuestro grupo (Pérez-Castañeira et al. 2002). Microalgas: *Chlamydomonas reinhardtii* (1), *Ochromonas danica* (1).

(continúa)

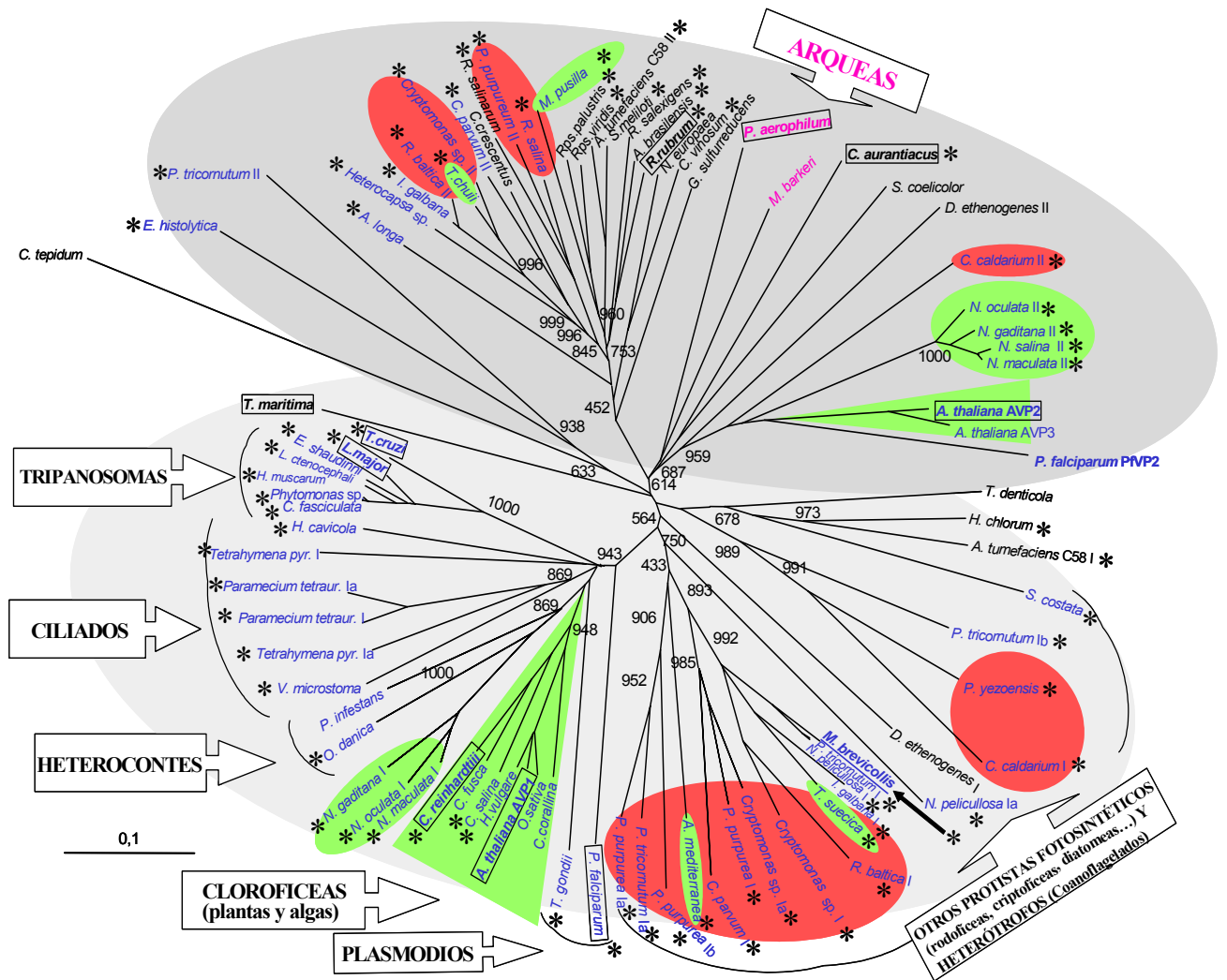


Figura 3.1.9: Filogenia molecular de las H^+ -PPasas de organismos fotosintéticos y heterotróficos de diversos grupos taxonómicos. El árbol de distancias se obtuvo a partir del alineamiento de las secuencias de aminoácidos obtenidas de las bandas de PCR amplificadas en nuestro grupo y algunas provenientes de bases de datos, descrito en la Figura 3.1.8 y se generó con el programa CLUSTAL X usando la metodología de "neighbor-joining" y una matriz BLOSUM. La barra indica 0,1 sustituciones por residuo. Los números en nodos seleccionados indican el grado de fiabilidad estadística ("bootstrap", sobre 1000) de los agrupamientos correspondientes. Los nombres de las bacterias se indican en negro, los de los microorganismos eucarióticos en azul y los de las arqueas en púrpura. Los asteriscos indican secuencias amplificadas con los oligonucleótidos PP1 y PP2 e identificadas por primera vez en nuestro grupo. En recuadros y en negrita se indican aquellas H^+ -PPasas dependientes o independientes de K^+ que han sido caracterizadas bioquímicamente. Sombreados en gris se representan las dos grandes subfamilias de H^+ -PPasas, las independientes de K^+ (gris oscuro) y las dependientes de dicho catión (gris claro). En fondo verde, se resalta el linaje evolutivo fotosintético eucariótico (triángulos) y otros protistas fotosintéticos con clorofilas como pigmentos accesorios mayoritarios (elipses) - prasinofíceas, ulvofíceas y eustigmatofíceas. En fondo rojo se resaltan las rodofíceas y las criptofíceas, derivadas de las primeras al ser productos de endosimbiosis secundarias de algas rojas (Durnford *et al.* 1999). El coanoflagelado *M. brevicollis*, del linaje evolutivo animal (Lang *et al.* 2002, Stechmann y Cavalier-Smith 2002), se encuentra subrayado y se señala con una flecha.

3.2. Generación de un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* carente de actividad sPPasa y su complementación con PPasas de membrana bacterianas y de plantas

Aunque todas las H⁺-PPasas estudiadas hasta la realización de esta Tesis Doctoral poseían actividad de hidrólisis de PPI *in vitro*, existía una cierta controversia acerca de la función fisiológica de estas proteínas *in vivo*, debido a que también se ha demostrado que pueden sintetizar PPI, a expensas de un gradiente de protones generado previamente en las membranas (Nyrén y Strid 1991, Façaña y de Meis 1998).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se han encontrado dos PPasas solubles muy similares, una localizada en el citosol y la otra en el interior de la mitocondria, donde interacciona de forma no covalente con un complejo proteico en la membrana interna (Kolakowski *et ál.* 1988, Lundin *et ál.* 1991). Los genes que codifican ambas proteínas han sido identificados. La sPPasa citosólica es codificada por el gen *IPPI* (Kolakowski *et ál.* 1988) y la enzima mitocondrial por *PPA2* (Lundin *et ál.* 1991). Intentos previos de interrumpir el gen *IPPI* no habían dado resultado, lo que sugería que la proteína codificada por este gen es esencial para la viabilidad de la célula de levadura (Lundin *et ál.* 1991). Por otra parte, no se ha identificado ningún gen que codifique una H⁺-PPasa en el genoma de *S. cerevisiae*, de acuerdo con la situación previamente descrita para animales metazoos y otras células de hongos (Rea y Poole, 1993, Kim *et ál.* 1994, Drozdowicz y Rea 2001).

En esta parte del trabajo de Tesis Doctoral, se planteó como objetivo la obtención de un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que careciese de actividad sPPasa en determinadas condiciones de crecimiento, con el fin de analizar su posible complementación con PPasas de membrana, tanto dependientes como independientes de K⁺. Dado que el gen *IPPI* parece ser esencial para la célula, se diseñó una estrategia en dos pasos, que consistía en introducir inicialmente un plásmido que contuviera una copia completa del gen bajo el control de un promotor inducible y, a continuación, interrumpir por recombinación homóloga la copia de dicho gen presente en el cromosoma de una estirpe haploide de levadura (Figura 3.2.1). Para ello, se amplificó el fragmento de DNA genómico correspondiente al gen *IPPI* mediante técnicas de PCR de alta fidelidad, con dos oligonucleótidos diseñados sobre los extremos de la secuencia de dicho gen (nucleótidos 1-21 y 845-863) y que contenían sitios de restricción artificiales *SalI* en sus

extremos 5'. El fragmento de 863 nt amplificado, se digirió con *SaII* y se clonó en el sitio único *XhoI* del plásmido autónomo de levadura pJR-1 (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001), obteniéndose así un nuevo plásmido denominado pYPC1, que contendría el gen *IPP1* bajo el control del promotor inducible por galactosa *GAL1* y un marcador de selección por crecimiento en ausencia de uracilo. El promotor *GAL1* se reprime hasta niveles despreciables en presencia de glucosa (Schneider y Guarente 1991). Por otro lado, se obtuvo el plásmido pYPC2 que posee una copia interrumpida del gen *IPP1* y carece de un origen de replicación de levadura, por lo que se integraría por recombinación homóloga en el cromosoma. Este plásmido se obtuvo ligando el gen *IPP1*, amplificado del modo descrito anteriormente, al plásmido comercial pGEM-T. A continuación, esta construcción se digirió con *BstXI* y *EcoRV*, eliminado así un fragmento de 355 nt del gen *IPP1*, y se ligó a un fragmento de restricción *BamHI* de 1,7 kb, que contenía una casete *HIS3* de levadura (promotor+ORF+terminador) que permite el crecimiento de las cepas auxótrofas en ausencia de histidina. Los extremos de los fragmentos se hicieron romos mediante tratamiento con T4 DNA polimerasa, para permitir la ligación de los sitios incompatibles.

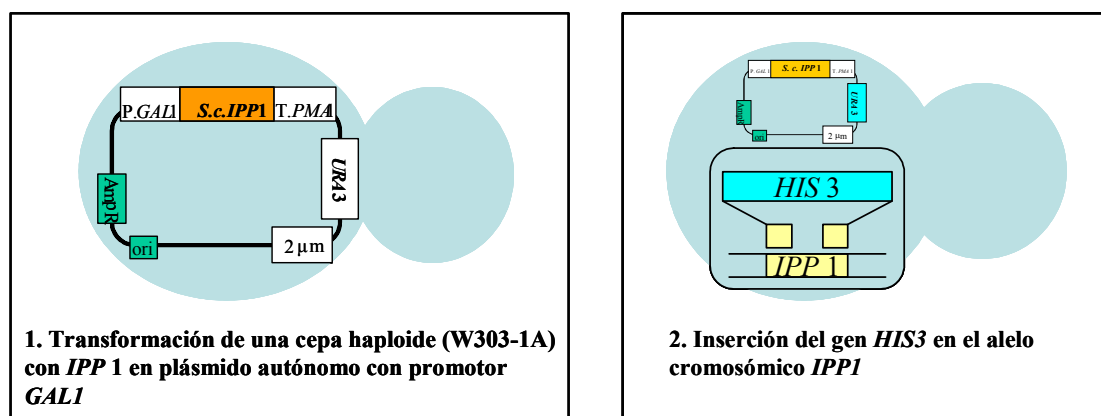


Figura 3.2.1: Obtención de la estirpe mutante de levadura YPC-1. En un primer paso, la estirpe haploide W303-1A se transformó con el plásmido pYPC1, que contenía el gen *IPP1* que codifica la sPPasa de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control del promotor inducible de la galactoquinasa (*GAL1*). Las levaduras obtenidas se transformaron, a su vez, con el plásmido YPC-2, produciéndose la interrupción de la copia cromosómica de *IPP1* por recombinación homóloga.

La estirpe haploide de levadura W303-1A, se transformó, en un primer paso, con el plásmido pYPC1, seleccionándose los putativos transformantes por su capacidad para

crecer en ausencia de uracilo en un medio con glucosa. Las levaduras que habían incorporado este primer plásmido, se transformaron entonces con el plásmido pYPC2 linealizado por digestión con *SacI* y *SacII*, lo que libera el inserto, seleccionándose en este caso en medio con galactosa como fuente de carbono y carente de histidina y uracilo. A continuación, se analizó la capacidad de los transformantes para crecer en glucosa, la fuente de carbono preferida por la levadura, encontrándose un clon (denominado en adelante estirpe mutante YPC-1), incapaz de crecer en presencia de dicho azúcar, pero que presentaba un crecimiento normal en galactosa, por lo que se seleccionó para su caracterización exhaustiva (Figura 3.2.2.A). El análisis por Southern Blot (Figura 3.2.2.B) se llevó a cabo con una sonda correspondiente a 675 nt (aproximadamente dos tercios) del gen *IPP1*, obtenida por digestión con *EcoRV* de la banda de PCR correspondiente a la ORF completa del gen. Cuando el DNA genómico se digería con *EcoRV*, esta sonda hibridaba con una banda de aproximadamente 3 kb para la estirpe mutante YPC-1, frente a la banda más pequeña encontrada en los controles. Además, las levaduras transformadas presentaban una banda adicional de aproximadamente 6 kb, correspondiente a la digestión del plásmido autónomo pYPC1. El análisis por PCR (Figura 3.2.2.C) permitió amplificar un fragmento de aproximadamente 0,9 kb en todas las estirpes de levadura, tanto la silvestre como las transformadas con pYPC1 o con los dos plásmidos (pYPC1 y pYPC2) a la vez, y una banda adicional de unas 2,3 kb, que estaba presente únicamente en el mutante YPC-1.

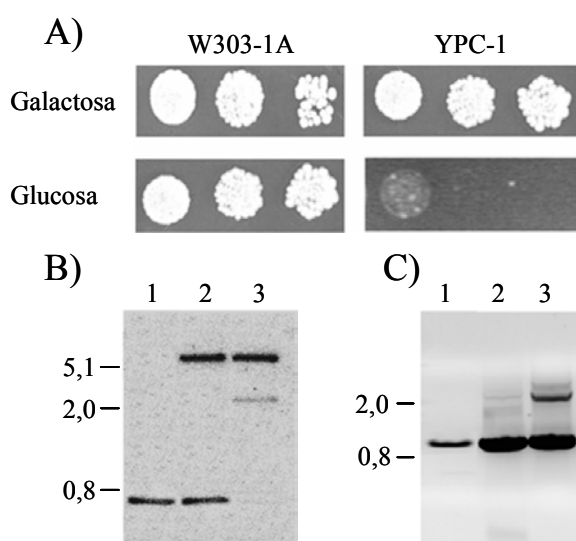


Figura 3.2.2: Crecimiento en distintos azúcares y caracterización molecular de la estirpe mutante YPC-1. A) Crecimiento comparativo en glucosa y galactosa de las estirpes silvestre (W303-1A) y mutante (YPC-1). Las células se crecieron hasta saturación en galactosa y se transfirieron a glucosa durante 18 h para parar la transcripción de *IPP1*. A continuación, se hicieron diluciones seriadas de los cultivos (10^2 , 10^3 y 10^4 veces) en agua estéril y 10 μ l de cada una de ellas se llevaron a placas con glucosa o galactosa como fuente de carbono, observándose el crecimiento al cabo de 5 días. B) Análisis por Southern Blot del DNA genómico de la estirpe silvestre (calle 1), la misma estirpe transformada con el plásmido pYPC1 (calle 2) y la estirpe mutante YPC-1 (calle 3), digeridos con *EcoRV* e hibridados con una sonda correspondiente a 675 nt de la secuencia del gen *IPP1*. C) Análisis por PCR de las estirpes antes indicadas. La reacción se llevó a cabo con oligonucleótidos correspondientes a los extremos de la ORF de *IPP1*. Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 0,7% en presencia de bromuro de etidio.

Los análisis por Northern Blot demostraron que los niveles de transcrito *IPPI* de la estirpe YPC-1, caían hasta valores indetectables 24 h después de que los cultivos se transfieran desde galactosa hasta glucosa (Figura 3.2.3.A). Para estos experimentos, se usó una sonda correspondiente a la secuencia completa del gen. Los análisis por Western Blot usando un anticuerpo policlonal contra la sPPasa citosólica de la microalga eucariótica *Chlamydomonas reinhardtii* (Gómez-García, Tesis Doctoral) y las medidas de actividad permitieron observar, sin embargo, que se necesitan periodos de tiempo más largos (al menos, 48 h) para conseguir niveles indetectables de sPPasa citosólica en YPC-1 (Figura 3.2.3.B). Los cultivos que carecían totalmente de actividad residual sPPasa eran incapaces de crecer cuando se inoculaban en medio fresco con glucosa (Figura 3.2.3.C).

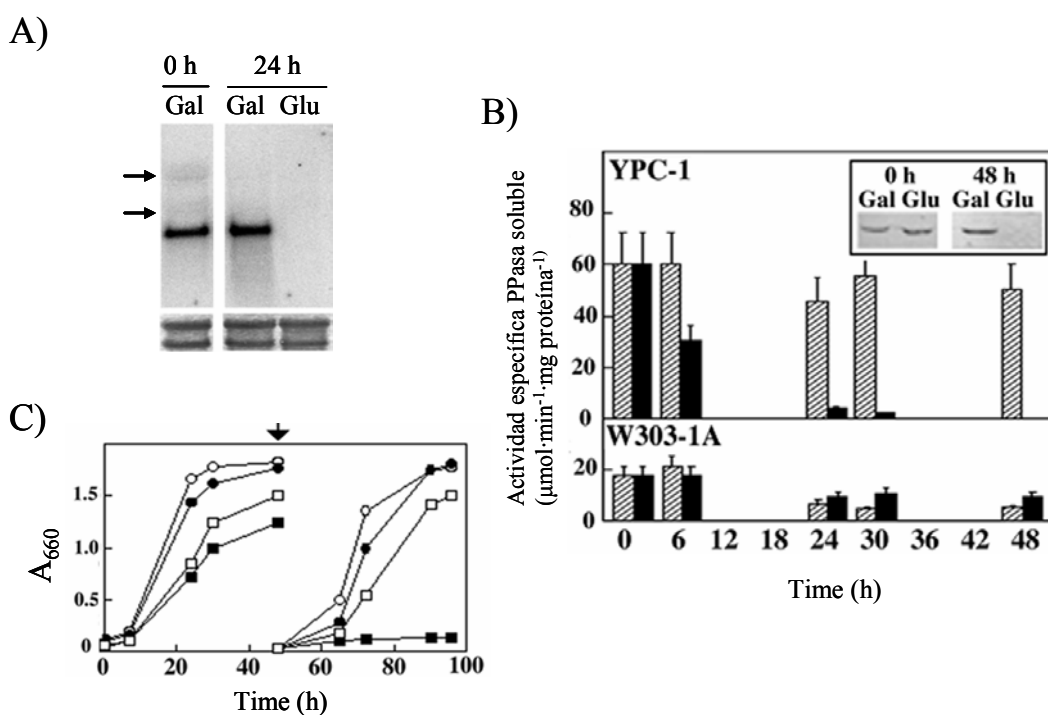


Figura 3.2.3: Análisis por Northern Blot y caracterización bioquímica de la estirpe mutante YPC-1. A) Análisis por Northern Blot de los niveles de transcrito *IPPI*. El RNA se extrajo de cultivos crecidos hasta saturación en galactosa y transferidos posteriormente a glucosa durante 24 horas. Las flechas indican la posición del RNA ribosómico (3,5 y 1,8 kb). En la parte inferior, se muestra la tinción de dicho RNA con azul de metileno, como control de carga. B) Cinética de actividad sPPasa de las estirpes W303-1A y el mutante YPC-1 crecidos en distintas fuentes de carbono. Dos mililitros de cultivo estacionario en galactosa de cada una de las estirpes anteriores se usaron para inocular matraces que contenían 200 ml de medio selectivo y se crecieron a 30°C con agitación. La actividad específica sPPasa se ensayó a distintos tiempos en extractos crudos solubles de YPC-1 y W303-1A, crecidos en galactosa (columnas punteadas) o glucosa (columnas en negro). Los valores de actividad son la media de tres experimentos independientes. En la esquina superior derecha, se muestra el análisis por Western Blot de los extractos solubles del mutante YPC-1, obtenidos al inicio del experimento y tras 48 h de crecimiento en glucosa y galactosa. C) curvas de crecimiento para las estirpes silvestre y mutante crecidas en las condiciones anteriores. El crecimiento de los cultivos se siguió mediante la medida de la densidad óptica de los mismos a 660 nm. Tras 48 h (indicado por una flecha), 2 ml de los cultivos estacionarios se inocularon en matraces que contenían 200 ml de medio selectivo y se dejaron crecer durante otras 48 h. ○, W303-1A en galactosa; ●, W303-1A en glucosa; □, YPC-1 en galactosa; ■, YPC-1 en glucosa.

Una vez caracterizado, el mutante YPC-1 se utilizó para realizar estudios de complementación funcional con distintas H⁺-PPasas. Para ello, el plásmido pRS1024 (Villalba *et ál.* 1992), que posee el gen marcador *LEU-2* que permite el crecimiento de estirpes auxótrofas en ausencia de leucina, se usó para clonar bajo el control de un promotor constitutivo de levadura los genes que codifican, respectivamente, la V-PPasa dependiente de K⁺ de *Arabidopsis thaliana* (AVP1) y una H⁺-PPasa, putativamente independiente de K⁺ según estudios filogenéticos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002), de la bacteria verde no sulfurosa *Chloroflexus aurantiacus* (*cvp*; contig 1051; http://spider.jgi-psf.org/JGI_microbial/html/). El promotor utilizado en este caso es el del gen *PMA1* de *S. cerevisiae*, que codifica la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de este organismo. Los dos genes de H⁺-PPasas se amplificaron por PCR con una polimerasa de alta fidelidad, usando como moldes, respectivamente, un clon de cDNA que contenía la secuencia completa de *AVP1* y DNA genómico de *C. aurantiacus*. Los oligonucleótidos usados correspondían, en cada caso, a los extremos 5' y 3' del gen correspondiente y presentaban sitios de restricción artificiales *SalI* en sus extremos. Los fragmentos de PCR se digirieron con *SalI* y se ligaron al sitio único *XhoI* del plásmido pRS1024, para dar pAVP1 y pCVP, respectivamente. De igual modo, se clonó el gen *IPP1* en el mismo plásmido, para dar pIPP1. Los genes que codifican las sPPasas bacterianas de *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodopseudomonas palustris*, se amplificaron por PCR de alta fidelidad, se clonaron en pGEM-T y, posteriormente, se ligaron al sitio *XhoI* del mismo plásmido anterior, a través de extremos romos. El mutante YPC-1 se transformó entonces con las nuevas construcciones y los transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en ausencia de leucina en un medio selectivo. Las células transformadas recuperaban la capacidad de crecimiento en glucosa, tanto en el caso de pAVP1 y pCVP, como en el caso de pIPP1 y los plásmidos que contenían sPPasas bacterianas, al contrario de lo que ocurría con las transformadas con el plásmido control pRS1024. Es importante destacar, que el crecimiento era más lento en el caso de los cultivos complementados con las PPasas de membrana que en el caso de IPP1 y las otras sPPasas, observándose además una clara sensibilidad al pH para pAVP1 y pCVP. Esta sensibilidad al pH del medio externo era mucho más significativa en el caso de las células transformadas con pAVP1, que prácticamente no crecían a pH 5, mientras que las

transformadas con sPPasas eran insensibles al pH en las mismas condiciones (Figura 3.2.4).

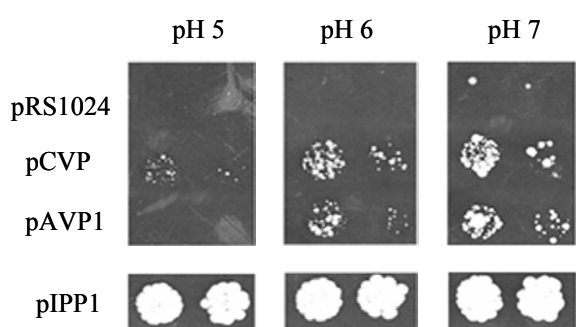


Figura 3.2.4: Complementación funcional del mutante YPC-1 en función del pH externo. La estirpe mutante YPC-1 se transformó con plásmidos que contenían los genes que codifican las H^+ -PPasas de *A. thaliana* (pAVP1), *C. aurantiacus* (pCVP) o la propia sPPasa de la levadura (pIPP1). Los cultivos se crecían en medio líquido con glucosa durante 18 h antes de hacer diluciones (10^3 y 10^4 veces) en agua estéril, que se depositaban sobre placas de medio selectivo con glucosa como fuente de carbono y tamponados al pH que se indica. El crecimiento se registró al cabo de cinco días.

Los niveles de PPi intracelular se determinaron a pH 7 mediante un método enzimático, tanto en el mutante YPC-1 transformado con el plásmido control, como en las células complementadas. Los niveles hallados fueron consistentes con la capacidad de cada estirpe para crecer en glucosa a este pH. De este modo, se estimó que las células transformadas con el plásmido pRS1024 contenían niveles de PPi en torno a $0,04 \pm 0,01$ μmol por 10^9 células (media de dos experimentos independientes), mientras que los de las células transformadas con pCVP (o pAVP1) y pIPP1 eran, respectivamente, un 50% y un 18% del valor para el control.

Los análisis por Northern Blot demostraron la presencia del transcrito de *AVP1* en las células transformadas con pAVP1. Dado que, a pesar de ser un promotor constitutivo, *PMA1* es además regulado positivamente por glucosa (Capieaux *et ál.* 1989), se observó que los niveles de transcrito eran significativamente mayores en presencia de este azúcar que en los cultivos crecidos en galactosa (Figura 3.2.5). Los niveles de transcrito para *IPP1* presentaban el mismo patrón que en la figura 3.2.3.A. Los mismos resultados se obtuvieron para pCVP1.

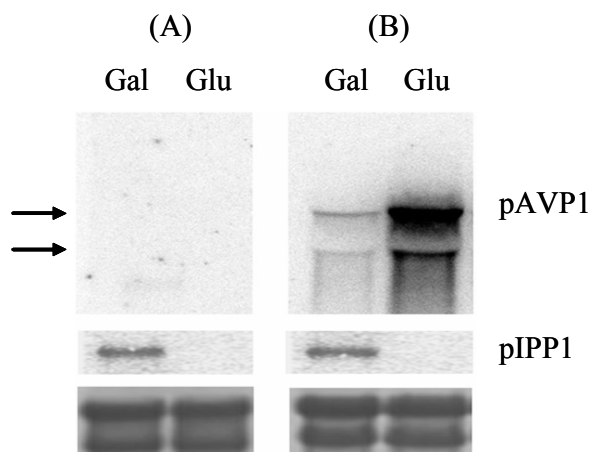


Figura 3.2.5: Análisis por Northern Blot de los niveles de transcrito de *AVP1* e *IPP1* en las células de YPC-1 transformadas con pRS1024 (A) y pAVP1 (B). Las células transformadas se crecieron hasta saturación en galactosa y se transfirieron entonces a medio con galactosa o glucosa durante 24 horas. La hibridación de los filtros se llevó a cabo con la secuencia codificante completa de los genes *AVP1* e *IPP1*. Las flechas indican la posición del RNA ribosomal (3,5 kb y 1,8 kb). En la parte inferior se muestra la tinción de dichas bandas con azul de metileno, como control de carga.

Con el fin de caracterizar la localización celular de las H⁺-PPasas expresadas heterológamente en la estirpe YPC-1, preparaciones de membrana obtenidas para las células complementadas con AVP1 y CVP, se sometieron a fraccionamiento en gradientes de sacarosa según se describe en Materiales y Métodos. Las fracciones obtenidas, se sometieron a análisis por Western Blot con el anticuerpo PAB_{TK} [TKAADVGADLSGKNE] (Drozdowicz *et ál.* 1999), obtenido contra un segmento hidrofílico común a todas las H⁺-PPasas descritas hasta el momento, lo que permitió detectar polipéptidos de aproximadamente 67 kDa en aquellas preparaciones provenientes de células transformadas con pAVP1 y pCVP. Estas bandas se hallaban asociadas, fundamentalmente, a aquellas fracciones de membrana que se equilibran entre un 35% y un 53,5% de sacarosa. El uso de un anticuerpo policlonal contra la H⁺-ATPasa de tipo P de *Saccharomyces cerevisiae* (PMA1), permitió detectar que una fracción de las proteínas expresadas heterológamente se encuentra asociada a la membrana plasmática (Figura 3.2.6.A). De acuerdo con estos datos, la mayor parte de la actividad específica H⁺-PPasa se encontró en las mismas fracciones. Además, esta actividad se estimuló más de 4 veces en presencia de K⁺ en el caso de AVP1, mientras que era independiente de la presencia de este ion en las membranas de las células transformadas con pCVP (Figura 3.2.6.B). La actividad de bombeo de protones dependiente de PPi pudo medirse en todas aquellas fracciones que presentaban una actividad PPasa significativa. Todas las preparaciones de membrana de las células transformadas con pAVP1 presentaban una mayor caída de fluorescencia ("quenching") que las correspondientes fracciones para las células transformadas con pCVP (Figura 3.2.6.C). El anticuerpo PAB_{TK} no reconoció ningún polipéptido de tamaño esperado en las fracciones de membrana de células transformadas con pRS1024 o con pIPP1 y, consecuentemente, no se observó ninguna actividad PPasa ni de bombeo de protones en estas preparaciones.

La localización de la H⁺-PPasa de *A. thaliana* en las membranas internas de la célula de levadura se observó mediante marcaje inmunofluorescente en esferoplastos fijados con formaldehído y permeabilizados con metanol y acetona. El patrón de fluorescencia de las células teñidas indicó claramente la localización de la proteína en las cisternas perinucleares, aunque también se observó una cierta inmunofluorescencia en las denominadas vesículas prevacuolares y, consistentemente con los resultados del fraccionamiento en gradientes de sacarosa, también en la membrana plasmática (Figura

3.2.7). En este caso, anticuerpo utilizado fue un anticuerpo policlonal obtenido contra la H^+ -PPasa de *Rhodospirillum rubrum*, que dio mejores resultados que el anticuerpo PAB_{TK} usado en el análisis por Western Blot. Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Dr. José Manuel Villalba de la Universidad de Córdoba.

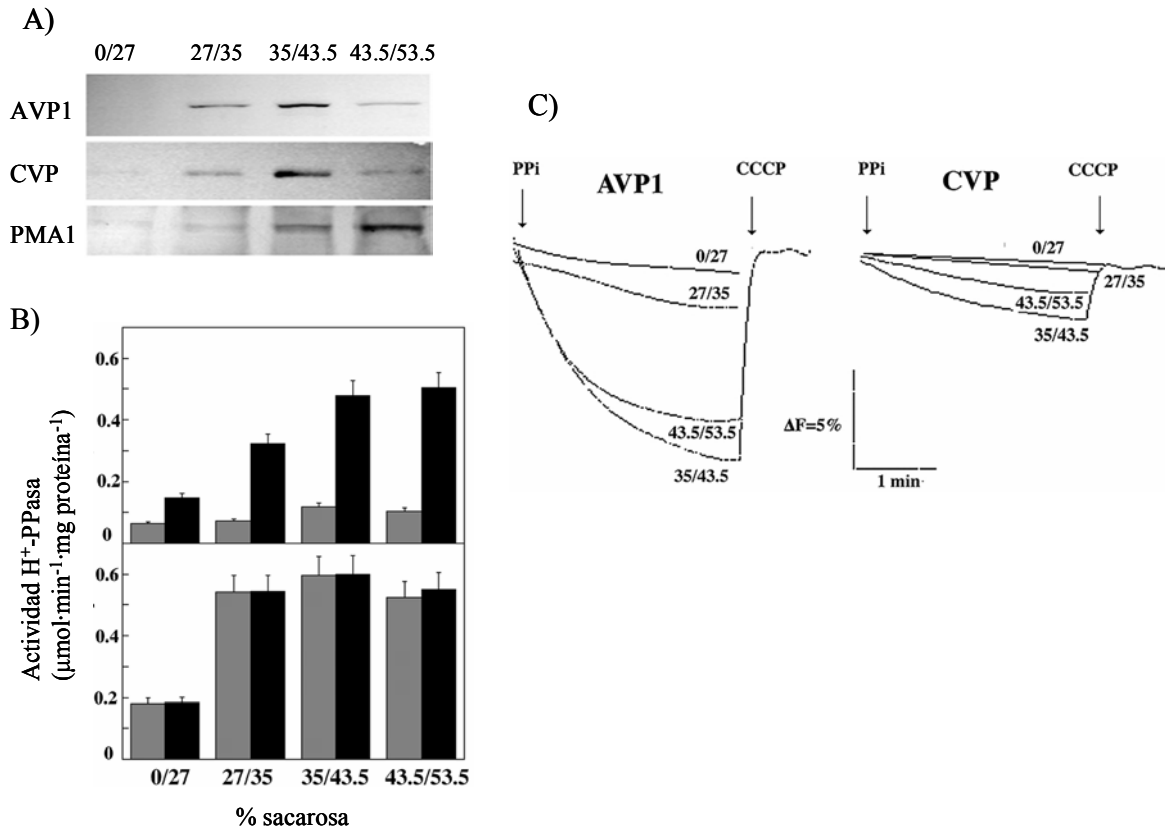


Figura 3.2.6: Localización subcelular de AVP y CVP. Las membranas totales de las células de YPC-1 transformadas con pAVP1 y pCVP se prepararon, se cargaron en gradientes de sacarosa y se centrifugaron como se describe en Materiales y Métodos. Las fracciones del gradiente se recolectaron y se sometieron a análisis de Western Blot con el anticuerpo PAB_{TK}. La H^+ -ATPasa de tipo P de la levadura (PMA1p) se usó como marcador de la membrana plasmática (A). Las actividades de hidrólisis de PPi (B) y de bombeo de protones (C) se ensayaron en todas las fracciones recolectadas del gradiente. Los ensayos de actividad PPasa se llevaron a cabo en ausencia (columnas grises) o presencia (columnas negras) de KCl 100 mM. Los resultados son la media \pm desviación típica de tres experimentos independientes

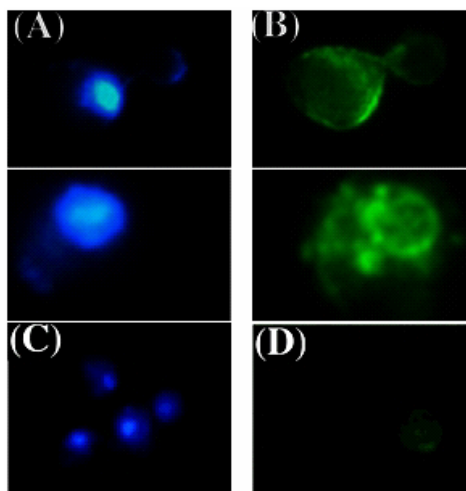


Figura 3.2.7: Microscopía de inmunofluorescencia de células del mutante YPC-1 transformadas con el plásmido pAVP1. (A) y (C), tinción de los núcleos con DAPI; (B) y (D), patrón de fluorescencia de un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína-5-tiocianato en las mismas células. Como primer anticuerpo se usó un anticuerpo policlonal contra la H^+ -PPasa de *Rhodospirillum rubrum*, que dio mejores resultados que el anticuerpo PAB_{TK}. (B) Detalle de dos patrones típicos de fluorescencia de las células de YPC-1 que expresan la H^+ -PPasa de *A. thaliana*. (D) Fluorescencia de las células control transformadas con el plásmido pRS1024. Ninguno de los anticuerpos usados produjo un patrón de fluorescencia claro en las células transformadas con pCVP.

3.3. Regulación de la PPasa de membrana translocadora de protones de *Rhodospirillum rubrum* en condiciones de estrés

3.3.1. Obtención de sondas de DNA: clonación del gen que codifica la sPPasa de *R. rubrum*

Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro grupo habían demostrado que la sPPasa de *R. rubrum*, en cultivos fotosintéticos, presenta un máximo de actividad específica al comienzo de la fase exponencial de crecimiento del cultivo, mientras que, hacia el final de dicha fase exponencial, se produce una disminución de dicha actividad específica (Gómez-García, Tesis Doctoral). Dado que las dos PPasas de *R. rubrum* conviven en el mismo compartimento celular y podrían presumiblemente competir por su sustrato (ver Introducción, Apdo. 1.6.2.2), era interesante analizar la existencia de una posible regulación coordinada de ambas enzimas. Con el fin de estudiar dicha regulación al nivel transcripcional, era necesario clonar el gen que codifica dicha sPPasa, lo que permitiría obtener fácilmente una sonda de DNA para los análisis por Northern Blot. Para ello, se diseñaron dos oligonucleótidos estrictos, usando los datos preliminares de secuencia hallados en la base de datos del proyecto genoma de *R. rubrum* (Ver Apdo. 2.11), **PPA1** (5'-GTCGACAACATGGATATCAAGAAAATTCC-3') y **PPA2** (5'-ACTAGTTTAGACCTTCTT-GTGGGC-3'). Estos dos oligonucleótidos se utilizaron en la amplificación por PCR de alta fidelidad de la secuencia codificante completa de este gen, usando DNA genómico como molde y con la adición de un 4% de DMSO. La única banda amplificada en esta reacción (0,6 kb) se clonó en el vector pGEM-T (Promega) originando el plásmido pRLppa. Después de un análisis por restricción exhaustivo de este fragmento, el plásmido se usó como molde de PCR con los dos oligonucleótidos anteriores para obtener la sonda de DNA.

Para obtener un fragmento de H⁺-PPasa que sirviera como sonda para las hibridaciones de los análisis por Northern Blot, se realizó una reacción de PCR usando como molde el clon original de la H⁺-PPasa de *R. rubrum*, cedido por la profesora Margareta Baltscheffsky de la Universidad de Estocolmo (Baltscheffsky M. *et ál.* 1998). Para la obtención de esta sonda, se usaron dos oligonucleótidos degenerados diseñados por comparación de la secuencia de aminoácidos de distintas H⁺-PPasas de plantas y de *R.*

rubrum, **PP1** [5'-GCIGGIGGIAT(A/C/T)(G/T)CIGA(A/G)ATG-3', I = Inosina] y **PP2** [5'-GC(A/G)TT(A/G)TCCCAIGCICCC-3', I = Inosina] (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 595 nt de la H⁺-PPasa de *R. rubrum*, que contiene parte del extremo 5' del gen. Las condiciones de la reacción de PCR se describen en Materiales y Métodos.

3.3.2. Regulación diferencial de las PPasas de *R. rubrum* en condiciones heterotróficas y fotosintéticas

La bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodospirillum rubrum*, es un organismo muy versátil metabólicamente, capaz de crecer de forma heterotrófica, en condiciones aeróbicas con una fuente de carbono añadido, y de forma fototrófica, realizando una fotosíntesis anoxigénica, en condiciones menos favorables energéticamente. Con el fin de estudiar la regulación de la H⁺-PPasa en ambas condiciones nutricionales, se desarrollaron cultivos tal como se indica en el apartado de materiales y métodos, tanto en medio Hutner modificado (rico en nutrientes), como en el medio descrito por Bose *et ál.* (1961), obteniéndose en ambos casos idénticos resultados. En ambos casos, se tomaron muestras de los cultivos a distintos tiempos y se midieron los niveles de RNA mensajero, proteína y actividad específica PPasa, tanto soluble como de membrana.

El transcrito para el gen *vpp*, que codifica la H⁺-PPasa, se detectó en cultivos anaeróbicos-fotosintéticos en todas las fases de crecimiento del cultivo, hasta fase estacionaria tardía, alcanzándose los niveles máximos a la mitad de la fase exponencial (12-24 h) (Figura 3.3.1.A y 3.3.1.C). Un patrón similar siguió la proteína detectada inmunológicamente (ca. 60 kDa) (Figura 3.3.1.B). El tamaño del transcrito de *vpp* (ca. 2,5 kb) sugiere un RNAm monocistrónico, que contenía las 2,1 kb de secuencia codificante (Baltscheffsky M *et ál.* 1998). Sin embargo, la actividad específica PPasa de membrana no se correlacionaba bien con estas variaciones de transcrito y proteína en las primeras fases del crecimiento, dado que presentaba un ligero y progresivo aumento a lo largo del desarrollo del cultivo (Figura 3.3.1.C). En contraste con la H⁺-PPasa, el transcrito de 1 kb del gen *ppa* (sPPasa), sufre un dramático descenso con el tiempo, llegando a ser indetectable en la fase estacionaria y presentando un nivel máximo al principio de la fase exponencial (cultivos de 12 h), cuando se esperaría una actividad anabólica máxima

(Figuras 3.3.1.A y 3.3.1.C). El análisis por *Western Blot* mostró también un patrón decreciente para los niveles de proteína, pero la banda de la sPPasa (aproximadamente 25 kDa) podía detectarse en todas las fases de crecimiento (Figura 3.3.1.B). La actividad específica PPasa soluble en los extractos presentó una progresión paralela, siendo máxima al principio de la fase exponencial y cayendo gradualmente con el tiempo, hasta que en la fase estacionaria temprana (48 h) sólo se detectó una actividad residual. En la fase estacionaria tardía se observaba una ligera recuperación de la actividad sPPasa (Figura 3.3.1.B).

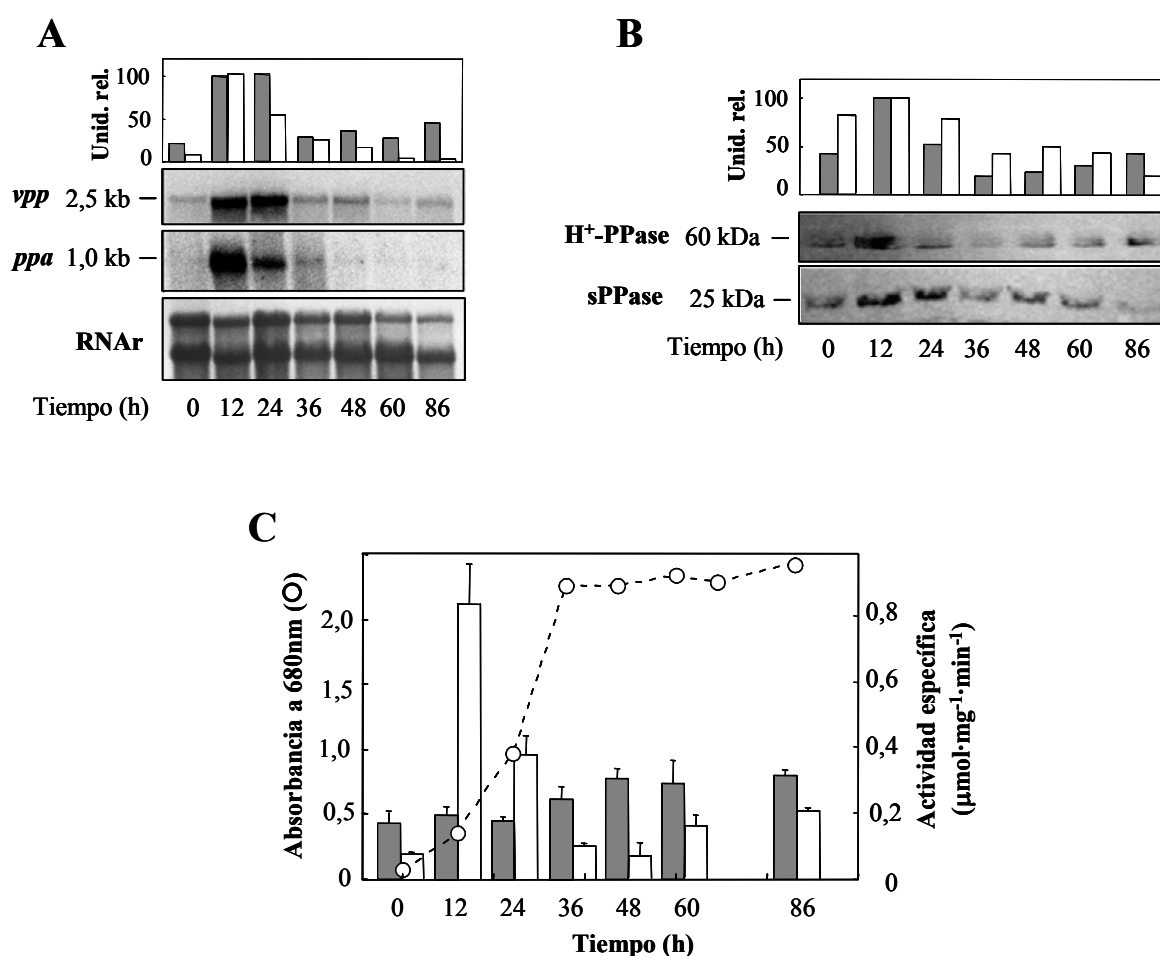


Figura 3.3.1: Cinéticas de los niveles de H⁺-PPasa y sPPasa durante el desarrollo de los cultivos anaeróbicos-fotosintéticos de *R. rubrum*. (A) Análisis por Northern Blot realizados sobre 20 µg de RNA total obtenidos a diferentes tiempos e hibridados con sondas internas de los genes *vpp* y *ppa*, y cuantificación normalizada de las bandas de hibridación. (B) Inmunodetección de las preparaciones de membrana y extractos solubles (100 µg de proteína por calle) llevados a cabo con anticuerpos mono-específicos contra la H⁺-PPasa y la sPPasa, respectivamente, y cuantificación de las bandas de proteína detectadas. (C) Curva de crecimiento y actividades PPasas específicas soluble y asociada a membrana a distintos tiempos. Los valores son medias ± desviación estándar de tres experimentos independientes. En los resultados cuantitativos presentados en los tres paneles, las barras grises corresponden a la H⁺-PPasa y las blancas a la sPPasa.

En condiciones aeróbicas-heterotróficas, los cultivos de *R. rubrum* mostraban una tasa de crecimiento en torno a 5 veces superior que en condiciones anaeróbicas-fotosintéticas (Figuras 3.3.1.C y 3.3.2.C). Cabe destacar, que los cultivos aeróbicos, que carecían de bacterioclorofila, no presentaban niveles detectables de transcrito de *vpp*. Por el contrario, el transcrito de *ppa* se detectó en todas las fases de crecimiento, con un pico máximo en fase exponencial temprana, aproximadamente 2 h después del inicio del cultivo (Figura 3.2.2.A). Debido a la gran inestabilidad de las preparaciones de RNA en estas condiciones, no fue posible realizar análisis por Northern Blot para las fases de crecimiento más tardías. Las detecciones inmunológicas y las medidas de actividad específica confirmaron que la H⁺-PPasa no se encuentra presente en las células crecidas aeróbicamente. De hecho, los análisis por Western Blot de las fracciones de membrana no permitieron observar ninguna banda de la masa molecular esperada para el polipéptido de la H⁺-PPasa en ninguna fase de crecimiento (Figura 3.2.2.B) y, consecuentemente, no se detectó actividad PPasa asociada a dichas membranas. Por otro lado, el análisis inmunocitoquímico de los extractos solubles con anticuerpos contra la sPPasa indicó la presencia del polipéptido de 25 kDa de la sPPasa en todas las fases de desarrollo del cultivo (Figura 3.3.2.B). Tanto la proteína como la actividad específica sPPasa presentaron un pico muy marcado en la fase exponencial temprana seguido de una dramática caída (Figuras 3.2.2.B y 3.2.2.C), en claro paralelismo con el transcrito de *ppa*. Los niveles máximos de actividad sPPasa en células aeróbicas fueron más de 4 veces mayores que los de los cultivos fotosintéticos, en concordancia con la mayor tasa metabólica y la ausencia de una segunda enzima capaz de hidrolizar el PPi (H⁺-PPasa) en las condiciones aeróbicas.

Con el fin de discernir si el oxígeno y/o la luz eran las posibles señales para la regulación transcripcional de las dos PPasas, un cultivo aeróbico de *R. rubrum*, crecido en oscuridad hasta la mitad de la fase exponencial, se dividió en dos cultivos paralelos, uno de los cuales se transfirió a condiciones fototróficas, mientras que el otro se mantuvo en condiciones heterotróficas como control. Tanto el transcrito de *vpp* como la H⁺-PPasa (proteína y actividad) respondieron rápidamente a las condiciones fototróficas- con la consecuente aparición de pigmentos fotosintéticos- y los altos niveles, típicos de los cultivos anaeróbicos-fototróficos, se alcanzaron tan sólo 12 h después del cambio (Figura 3.3.3). Sin embargo, no se observó ninguna inducción de la expresión del transcrito de

vpp, de la síntesis de la H^+ -PPasa o de la producción de pigmentos, cuando el cultivo original se transfería a condiciones aeróbicas en presencia de luz o a condiciones anaeróbicas en oscuridad.

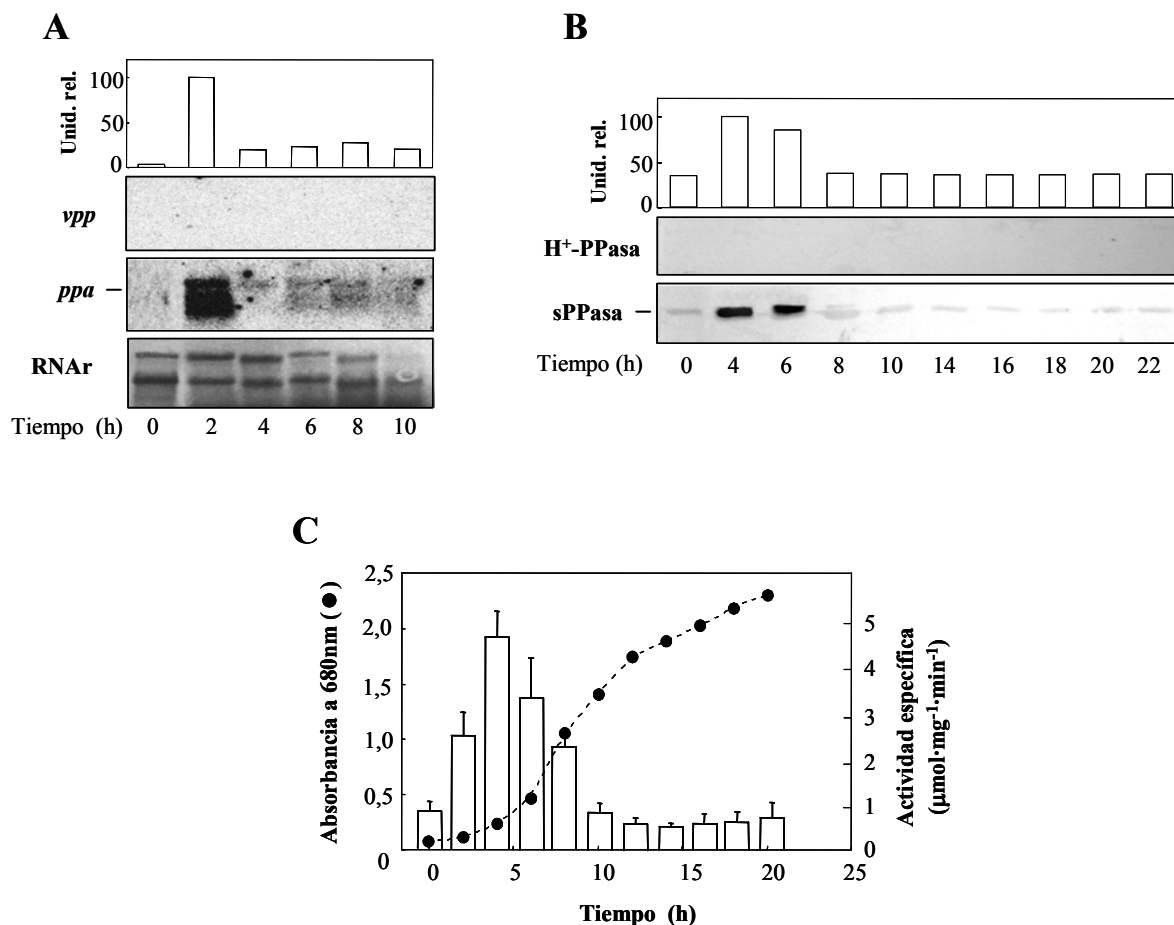


Figura 3.3.2: Cinéticas de los niveles de sPPasa y H^+ -PPasa durante el desarrollo de los cultivos aeróbicos-fototróficos de *R. rubrum*. Las muestras se tomaron cada 2 h y se procesaron como en la Figura 3.3.1. (A) Análisis por Northern Blot normalizados con la tinción del RNA ribosomal con azul de metileno. (B) Inmunodetección de las proteínas correspondientes. (C) Curva de crecimiento y actividades específicas. Los valores son medias \pm desviación típica. Cabe destacar la total ausencia de transcrito *vpp* y proteína H^+ -PPasa en estos cultivos, lo que sugiere una fuerte regulación a nivel genético. Por este hecho, las cuantificaciones se refieren sólo al transcrito *ppa* y la proteína sPPasa correspondiente.

La transferencia de los cultivos anaeróbicos-fotosintéticos a condiciones aeróbicas-heterotróficas no afectó significativamente a los niveles de transcrito *vpp* ni a la actividad específica de la H^+ -PPasa en un periodo de 8 h tras la transferencia (no mostrado).

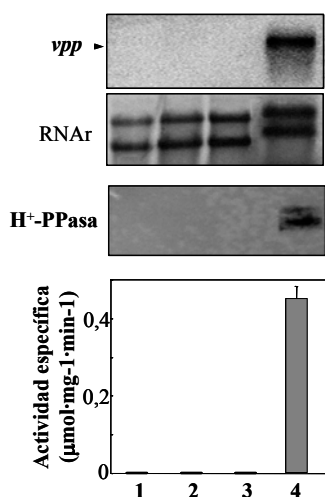


Figura 3.3.3: Efecto de la transición desde condiciones aeróbicas en oscuridad a condiciones aeróbicas/anaeróbicas en luz/oscuridad sobre la H⁺-PPasa de *R. rubrum*. Un cultivo aeróbico-heterotrófico de *R. rubrum* crecido hasta la mitad de la fase exponencial, se dividió en cuatro fracciones que se llevaron a distintas condiciones durante 12 h. Calle 1: control en aerobiosis-oscuridad; calle 2: aerobiosis-luz; calle 3: anaerobiosis-oscuridad; calle 4: anaerobiosis-luz. Arriba: análisis por Northern Blot y detección radiactiva del transcrito *vpp*, junto con la tinción del RNA ribosomal con azul de metileno; centro inmunodetección de la H⁺-PPasa. Abajo: medidas de actividad específica. Cabe destacar que el transcrito *vpp*, la proteína H⁺-PPasa y la actividad específica correspondiente sólo se detectaron en los cultivos anaeróbicos-fotosintéticos.

3.3.3. Expresión de la H⁺-PPasa de *R. rubrum* en distintas condiciones metabólicas anaeróbicas

Además de en las condiciones heterotróficas y autotróficas antes descritas, la versatilidad metabólica de *R. rubrum* le permite crecer en oscuridad con malato y/o fructosa, mediante mecanismos de respiración anaeróbica- en presencia de aceptores finales de electrones como TMAO o DMSO- o fermentando fructosa sin la adición de oxidantes (Schultz y Weaver 1982). En las condiciones experimentales usadas en este trabajo, el crecimiento de los cultivos con malato y DMSO añadido sólo se consiguió en presencia de fructosa. Cuando el crecimiento se producía sólo con fructosa, se alcanzaron valores de absorbancia a 680 nm en torno a 0,8, siempre y cuando el pH inicial del medio de cultivo se ajustase a 7,1-7,2 mediante la adición de NaHCO₃. Este pH inicial también era óptimo para conseguir disminuir el periodo de latencia de los cultivos respiratorios anaeróbicos. Las tasas de crecimiento en estas dos condiciones anaeróbicas en oscuridad fueron claramente inferiores a las encontradas en las condiciones aeróbicas y fotosintéticas. Los tiempos de generación de los cultivos respiratorios anaeróbicos fueron unas 10 veces inferiores a los de los cultivos fototróficos y más de 45 veces menores que en aerobiosis. Por su parte, para los cultivos fermentativos, las diferencias de crecimiento eran todavía mayores y se calcularon tiempos de generación cerca de 20 veces menores que en fotosíntesis y de entre 90 y 100 veces menores que los estimados para las condiciones aeróbicas (Figura 3.3.4.B). Cabe destacar que en estos cultivos anaeróbicos

en la oscuridad, se encontraron cantidades significativas de H^+ -PPasa y su transcrito en la fase exponencial. Sin embargo, aunque los niveles de transcrito del gen *vpp* eran mayores en la oscuridad que en condiciones fotosintéticas, el análisis por Western Blot demostró que los niveles de proteína eran menores. Las medidas de actividad específica H^+ -PPasa corroboraron los datos de la detección inmunológica, siendo los niveles en cultivos fototróficos de 1,3 a 1,8 veces mayores que cultivos respiratorios-anaeróbicos o fermentativos (Figura 3.3.4.A). También cabe destacar, que la cantidad de bacterioclorofila encontrada para los cultivos fotosintéticos era significativamente mayor que la estimada en los cultivos anaeróbicos, siendo 7 veces menor en condiciones fermentativas y 5 veces menor en condiciones anaeróbicas, a la mitad de la fase exponencial de crecimiento.

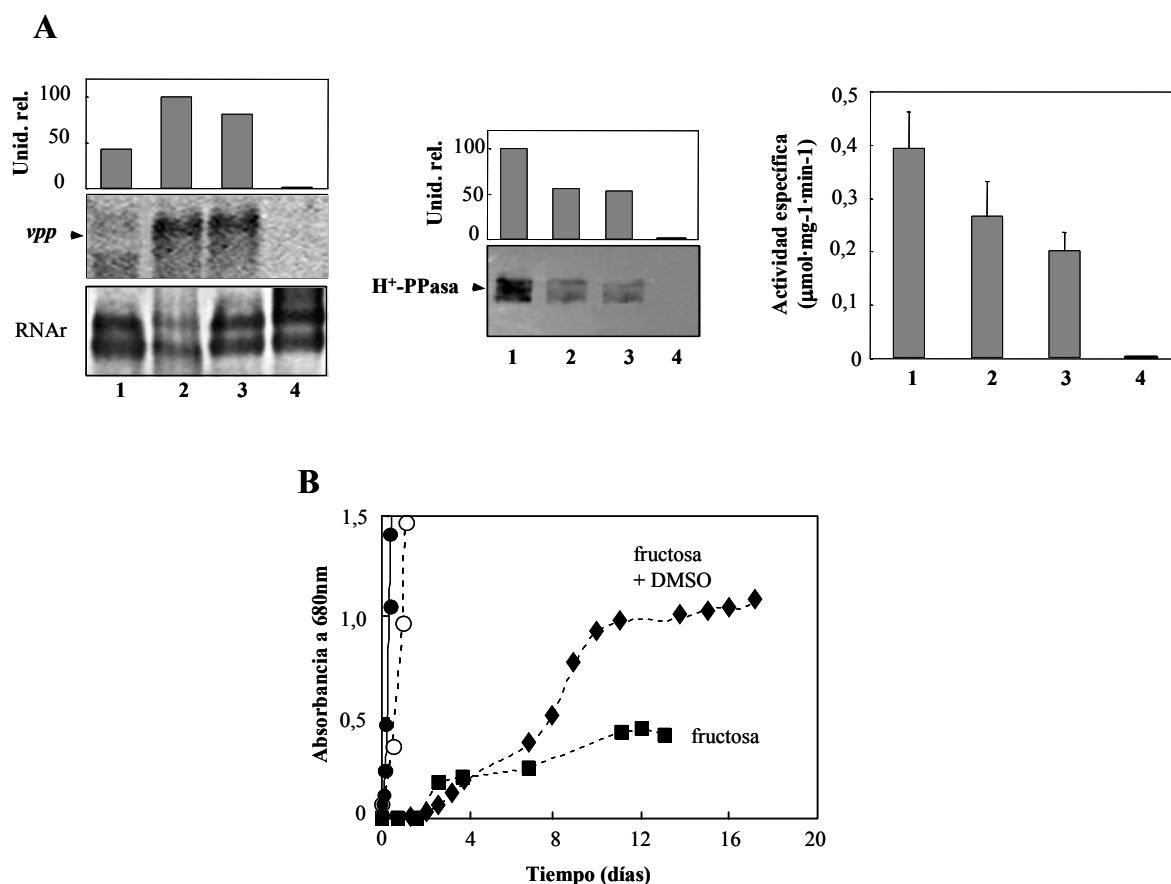


Figura 3.3.4: Análisis comparativo de los niveles de PPasa de membrana en cultivos de *R. rubrum* crecidos en distintas condiciones tróficas. (A) Calle 1: condiciones anaeróbico-fototróficas. Calle 2: fermentativas. Calle 3: anaeróbico-respiratorias. Calle 4: aeróbico-heterotróficas. Las muestras se tomaron a la mitad de la fase exponencial para cada cultivo. Izquierda: análisis por Northern Blot y normalización con la cuantificación del RNA ribosomal. Centro: análisis por Western Blot de las preparaciones de membrana. Derecho: actividad específica H^+ -PPasa asociada a membrana. Los valores son medias \pm desviación típica. (B) Curvas de crecimiento en las distintas condiciones ensayadas: \circ , fototróficas; \bullet , aeróbico-heterotróficas; \blacksquare , fermentativas; \blacklozenge , anaeróbico-respiratorias. Los tiempos de generación de cada cultivo fueron los siguientes: fototrófico, 9,8 h; aeróbico-heterotrófico, 1,9 h; fermentativo, 186,6 h; anaeróbico-respiratorio, 90,9 h.

3.3.4. Inducción de la PPasa de membrana en condiciones aeróbicas: efecto del estrés salino

Con el fin de encontrar condiciones de crecimiento que pudieran inducir la expresión de *vpp* en cultivos aeróbicos de *R. rubrum*, se estudió una posible implicación de la H⁺-PPasa en la respuesta a estrés salino. Para ello, los cultivos, tanto en condiciones aeróbicas-heterotróficas como en condiciones anaeróbicas-fototróficas, se crecieron hasta la mitad de la fase exponencial y se dividieron en varias fracciones. A tres de ellas se les añadieron distintas concentraciones de NaCl. A la última fracción (control) se le añadió un volumen equivalente de agua estéril para corregir los efectos de la dilución. Concentraciones finales de sal de 150 mM no produjeron ningún efecto ni sobre el crecimiento, ni sobre los niveles de transcrito o de proteína para la H⁺-PPasa en ninguna de las dos condiciones nutricionales (Figura 3.3.5). Sin embargo, la presencia de 0,5 M de NaCl en el medio de cultivo provocó una parada en el crecimiento de los cultivos fotosintéticos, aunque no se observaron cambios significativos ni en los niveles de transcrito ni en los de proteína tras 12 h de tratamiento salino (Figura 3.3.5.A). En presencia de 1 M de NaCl, se producía una muerte celular muy rápida en condiciones fotosintéticas, pero no así en los cultivos aeróbicos, que continuaban creciendo, aunque a un ritmo algo más lento (Figura 3.3.5.B). Es interesante resaltar que este estrés iónico agudo en aerobiosis producía una fuerte inducción de la H⁺-PPasa, como se observó en los análisis por Northern y Western Blot (Figura 3.3.5.B), llegando a alcanzarse niveles de actividad específica H⁺-PPasa comparables a los de los cultivos fotosintéticos. Por el contrario, el estrés salino no produjo variaciones significativas en los niveles de proteína o actividad específica sPPasa (ver Figura 3.3.5).

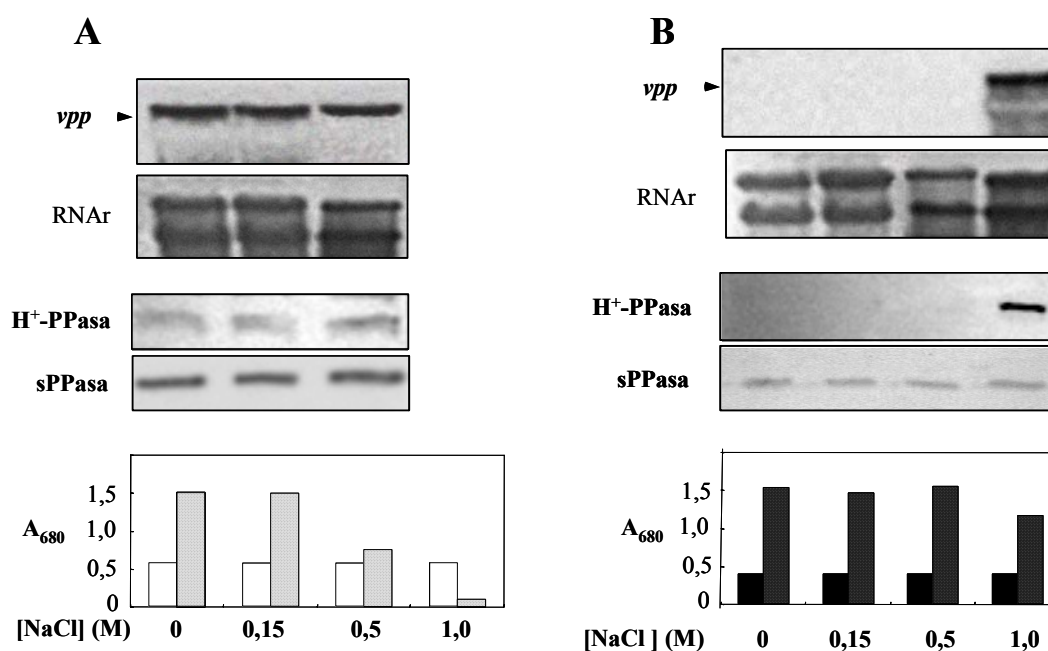


Figura 3.3.5: Inducción por estrés salino de la H⁺-PPase de *R. rubrum*. Cultivos crecidos en condiciones anaeróbicas-fototróficas (A) y aeróbicas-heterotróficas (B) hasta la mitad exponencial se suplementaban en este punto con agua o con una solución concentrada de NaCl. En cada caso, se realizaron análisis por Northern Blot (parte superior) y Western Blot (parte central) al cabo de 12 h. El crecimiento de los cultivos durante este intervalo de tiempo se muestra también en forma de histograma de barras (parte inferior; blanco, punto inicial; gris, tras 12 h de tratamiento salino). La concentración salina añadida, hasta 1 M, se indica en cada caso.

3.3.5. Clonación de las secuencias promotoras del gen *vpp*, determinación de los puntos de inicio de la transcripción (TSPs) y análisis de posibles secuencias reguladoras

Con el fin de determinar la posición de los puntos de inicio de la transcripción (TSP) del transcrito de la H⁺-PPase de *R. rubrum*, se llevaron a cabo experimentos de extensión del cebador en las distintas condiciones fisiológicas estudiadas en este trabajo. Para ello fue necesario aislar y clonar un fragmento de DNA que contuviera las secuencias promotoras del gen *vpp*. Tres fracciones de 20 µg de DNA genómico de la bacteria fotosintética se digirieron, respectivamente, con las enzimas *Bam*HI, *Bcl*II y *Bgl*II, y la mitad de cada una de ellas se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 %, transfiriéndose posteriormente a una membrana de nylon. Esta membrana se hibridó con la sonda de DNA correspondiente a parte del extremo 5' del gen descrita en el apartado 3.3.1. Como resultado de esta hibridación (Fig 3.3.6.A), se identificó un fragmento de aproximadamente 1,9 kb, que debía contener el extremo 5' del gen *vpp*, hasta el sitio *Bcl*II

(1175 nt) y unos 700 nt de zona 5' no-codificante. Este fragmento se clonó sometiendo a electroforesis en gel la otra mitad de la fracción de DNA genómico digerida con *BclI*, aislando el DNA de tamaño en torno a 1,9 kb y ligándolo a un plásmido pBluescript KS⁺ (Stratagene) digerido con *BamHI* (compatible con *BclI*) y desfosforilado. Tras transformar en *E. coli*, se obtuvieron 11 colonias, a partir de las cuales se aislaron los plásmidos correspondientes. Fracciones de 1 µg de cada uno de estos plásmidos se digirieron con *KpnI* y *SacII*, se sometieron a electroforesis y se transfirieron a una membrana de Nylon, volviendo a hibridarse con la sonda indicada anteriormente. De todos los clones probados, sólo uno dio una banda de hibridación de tamaño esperado y poseía al mismo tiempo el patrón de restricción adecuado (Figura 3.3.6.B). Este plásmido, denominado en adelante pRLM1, se secuenció en un secuenciador automático para confirmar la identidad de las secuencias de DNA buscadas. Sin embargo, la presencia en el cromatograma de grandes cantidades de indeterminaciones ponía de manifiesto la dificultad para secuenciar el fragmento, debido a su alto contenido en G+C (61,5%). Se procedió a la eliminación de una gran parte de secuencia codificante, no necesaria para los experimentos de extensión del cebador, y reducir así el contenido en G+C, el plásmido pRLM1 se digirió con las enzimas *SphI* y *SpeI* y se religó tras hacer los extremos romos, obteniéndose así el plásmido pRLM2. Tras secuenciar manual y automáticamente este plásmido, se demostró que el inserto de 1078 nt contenía el extremo 5' del gen hasta el sitio *SphI* (385 nt) y 693 nt de la región 5' no-codificante adyacente, que era virtualmente idéntica a la secuencia correspondiente en la página web del proyecto genoma inacabado de *R. rubrum* (contig 127, cadena antisentido, nt 172937-172014). Sin embargo, la secuenciación manual de este fragmento tuvo que ser optimizada, dado que el procedimiento habitual sobre DNA de cadena doble con un 21% de DMSO añadido (Baltscheffsky M. *et ál.* 1998), presentaba un alto número de compresiones que impedían su lectura. El primer paso de la optimización implicó la preparación de DNA de cadena simple para la secuenciación, por el procedimiento que se indica en Materiales y Métodos. Este DNA, en presencia de DMSO, permitía una mejor lectura, sin que las compresiones llegaran a eliminarse por completo. Por ello, se prepararon geles de acrilamida con un mayor contenido en urea y que se corrieron a una mayor potencia para mantener una mayor temperatura durante el desarrollo de la electroforesis. Aún en este caso, no se obtuvieron secuencias perfectamente legibles cuando las reacciones de

secuenciación no se preparaban justo antes de cargar en el gel y se desnaturalizaban a 100°C durante 4-5 min, al menos. El protocolo final de secuenciación de este DNA se describe el apartado 2.8.6.3.

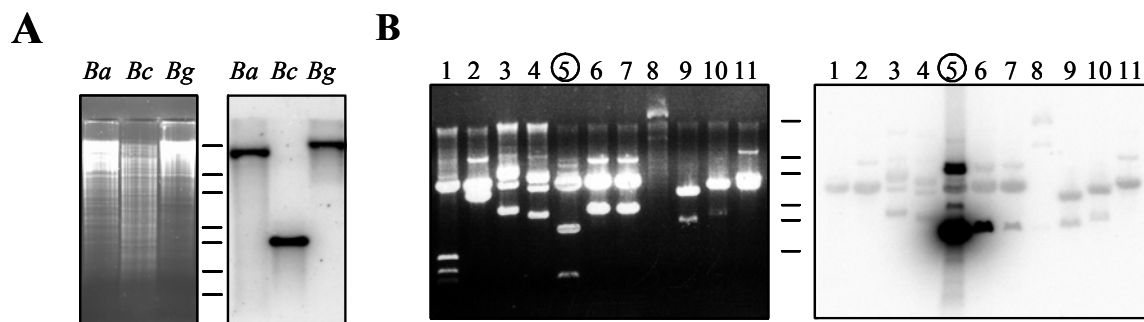


Figura 3.3.6: Clonación de las secuencias promotoras del gen *vpp*. (A) DNA genómico de *R. rubrum* fue digerido con las enzimas *Bam*HI (*Ba*), *Bcl*I (*Bc*) y *Bgl*II (*Bg*) y sometido a análisis por Southern Blot. Se indica la posición de los patrones de peso molecular (de abajo arriba: 0,56; 0,9; 1,6; 2,0; 3,5; 5,1 y 21,3 kb). La banda de 1,9 kb de la digestión con *Bcl*I se ligó al plásmido pBS KS⁺ y los clones obtenidos (B) se analizaron por restricción con *Kpn*I y *Sac*II y se sometieron a análisis por Southern Blot. Sólo un clon presentó simultáneamente un patrón de restricción adecuado y bandas de hibridación del tamaño esperado (clon 5, marcado con un círculo).

La secuencia definitiva, obtenida tras secuenciación automática y manual, se encuentra en la base de datos DDBJ/EMBL/Gene Bank con el número de acceso AJ549291.

Una vez optimizado el protocolo de secuenciación, fue necesario encontrar las condiciones adecuadas para la reacción de extensión del cebador, que dado el contenido en G+C del gen, presentaba un gran número de bandas correspondientes a hibridaciones no específicas de los oligonucleótidos en las condiciones estándar (usando la enzima Superscript™). Para estos experimentos, se diseñaron dos oligonucleótidos estrictos, TSP1 (5'-TGAATGGGCCTAACGGC-3') situado en la zona entre -36 y -20 aguas arriba del codón de inicio de la traducción del gen *vpp* de *R. rubrum* (Baltscheffsky M. *et ál.* 1999), y TSP2 (5'-GCCATGATTGTTTTGATGGTG-3') correspondiente a la región entre +64 y +85 del gen. Con el fin de eliminar la mayor parte posible de las estructuras secundarias del RNA, se aumentó la temperatura de desnaturalización y se eliminaron las incubaciones a temperatura ambiente o en hielo, y se buscó una transcriptasa reversa que permitiera llevar a cabo la reacción a una mayor temperatura. De este modo, se llegó tras múltiples pruebas al protocolo de extensión del cebador a alta temperatura expuesto en el apartado 2.9.8.2.

Una vez optimizadas las reacciones, tanto de secuenciación, como de extensión del cebador, se procedió a la determinación de los puntos de inicio de la transcripción en las distintas condiciones fisiológicas usadas en este trabajo. Los resultados obtenidos con los dos oligonucleótidos usados fueron análogos. Aunque la fotosíntesis, la respiración anaeróbica y la fermentación representan situaciones metabólicas muy distintas, para todas ellas se encontraron dos promotores en tándem cuyos TSPs se encuentran en las posiciones -135 (tsp 1) y -296 (tsp 3) respecto al ATG del gen (Figura 3.3.7.B).

Una vez conocidos los TSPs, se llevó a cabo un análisis de las secuencias promotoras con el fin de identificar putativas secuencias consenso típicas de los promotores anaeróbicos. Para tsp 1, se localizaron dos secuencias casi idénticas a la secuencia consenso para el sitio de unión del regulador de respuesta anaeróbica de *Rhodobacter sphaeroides* RegA, localizadas en las posiciones -23 a -37 y -67 a -79 (Figura 3.3.7.A, sombreado gris oscuro). RegA es un activador que forma parte de un sistema regulador de dos componentes, RegA/RegB, que activa la transcripción en condiciones anaeróbicas de muchos genes involucrados en el metabolismo fotosintético y la asimilación de carbono y nitrato (Bauer *et ál.* 1988, Joshi y Tabita 1996, Qian y Tabita 1996). RegB es una histidin-quinasa que se activa en condiciones de baja tensión de oxígeno y sufre una autofosforilación. Este grupo fosfato es transferido, a continuación, al regulador de la respuesta, RegA, aumentando su capacidad de unión al DNA y provocando la activación transcripcional (Laguri *et ál.* 2003).

Además, pudieron identificarse posibles sitios de unión del factor σ^{54} en las posiciones -13 y -24, que contienen el motivo GG-GC característico de este factor de transcripción (Figura 7A, letra negrita y subrayada). Para tsp3, se encontró una secuencia de 14 nt centrada en la posición -63 (Figura 3.3.7.A, sombreada en gris claro), que presentaba una cierta similitud con la secuencia consenso de FNR (Blake *et ál.* 2002). FNR es un factor de transcripción que responde a la falta de oxígeno mediante la unión de agrupaciones de Fe-S, que son lábiles en presencia de oxígeno. La unión de dichas agrupaciones permite la dimerización de FNR, que se une entonces más eficientemente al DNA y favorece la actividad de la RNA polimerasa (Bauer *et ál.* 1999). Este mecanismo permite controlar la transcripción de muchos genes-diana involucrados en funciones anaeróbicas en enterobacterias, tales como los operones que codifican las nitrato, nitrito o fumarasa reductasa. En este caso, se propone la existencia de un sitio de unión de σ^{70} en

la posición -10 (Figura 3.7.7.A, identificada con una línea encima), pero no pudo identificarse ninguna región -35 análoga al consenso para *E. coli*. Los experimentos de extensión del cebador también se llevaron a cabo para los cultivos aeróbicos sometidos a estrés salino, lo que permitió identificar dos promotores en tándem también en estas condiciones. El primero, localizado en la posición -185 con respecto al ATG (tsp 2) era completamente distinto a los encontrados en condiciones anaeróbicas, mientras que el segundo, en posición -301 parecía ser el mismo que tsp 3. Una vez más, se identificó una secuencia -10 para tsp 2 (Figura 7A, indicada con una línea encima), pero no se pudo establecer ninguna caja consenso -35.

La región 3' -no codificante del gen *vpp* presenta además un secuencia invertida (13 nt, lazo de 6 nt), seguido de una región rica en T 25 nt por debajo del codón de stop TAA. El ΔG calculado para el lazo formado por esta región invertida es de $-78 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Estos datos sugieren la existencia de un terminador transcripcional bacteriano independiente de factores de terminación.

Todos los resultados expuestos anteriormente están en concordancia con el tamaño encontrado para el transcrito de *vpp* (ca. 2,5 kb) en los experimentos de Northern Blot, por lo que el gen *vpp* (secuencia codificante ca. 2,1 kb) debería transcribirse como un RNAm monocistrónico. La organización genética de las regiones del genoma de *R. rubrum* en torno a los genes *vpp* y *ppa*, extraídas de datos preliminares del proyecto genoma de este organismo, indican, de hecho, que estos genes muy probablemente no se encuentran incluidos en operones (Figura 3.7.7.C). La distancia intergénica existente entre *vpp* y la ORF más próxima aguas arriba, relativamente larga, sería consistente con la regulación transcripcional bastante compleja que parece derivarse de los análisis anteriores.

El alineamiento de la secuencia promotora obtenida en este trabajo del gen *vpp* de *R. rubrum*, con la correspondiente secuencia para otra bacteria púrpura fototrófica, *Rhodopseudomonas palustris*, obtenida de la página web del proyecto genoma para este organismo (*Rps. palustris* DOE JGI genome project database, http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/rhopa/rhopa.home.html) (Figura 3.3.8), permitió observar la existencia en esta última de posibles sitios de unión para FNR y RegA, así como también para σ^{54} , en la zona adyacente aguas arriba del gen *vpp*. Aunque no existen en la literatura datos sobre los puntos de inicio de la transcripción para el gen *vpp* de *Rps. palustris*, la

localización de estas secuencias en la zona próxima a las correspondientes del gen de *R. rubrum* sugeriría un mecanismo de regulación común para estos genes en bacterias púrpuras.

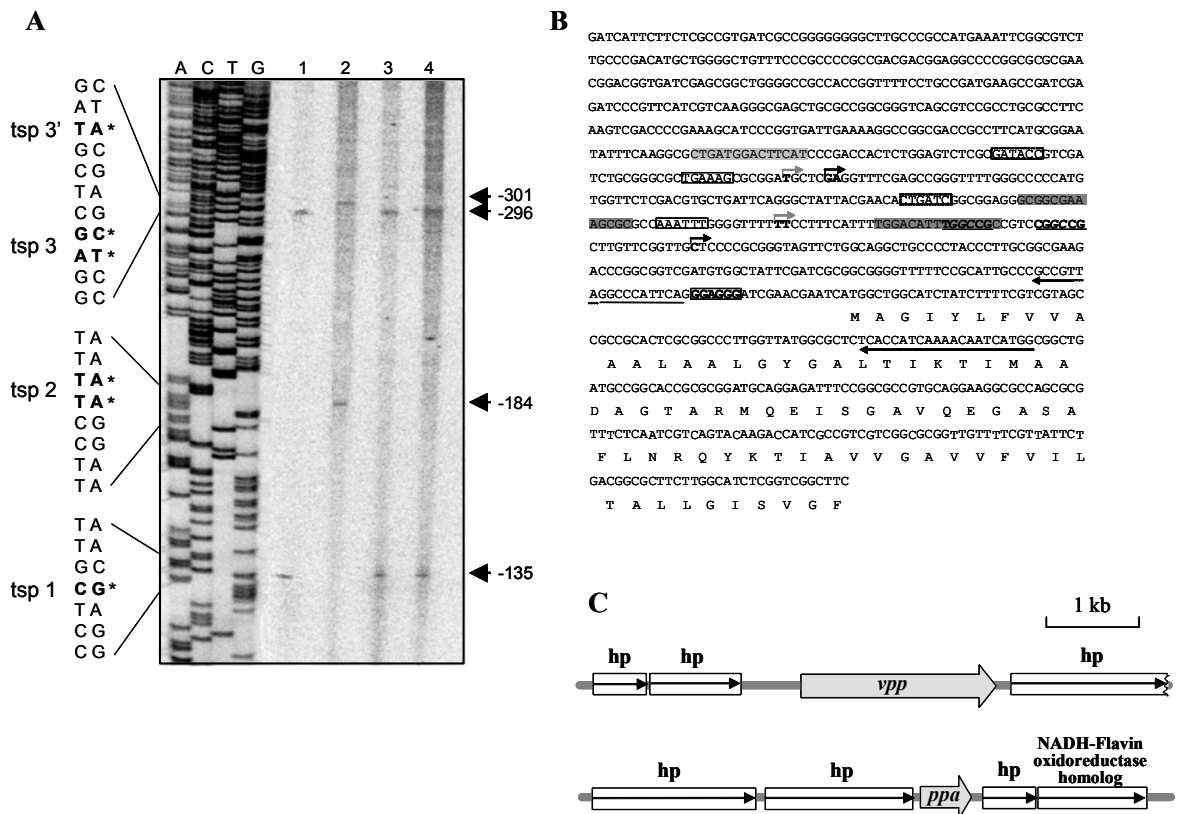


Figura 3.3.7: Secuencia de la región promotora y análisis de extensión del cebador para el gen de la H⁺-PPasa de *R. rubrum*. (A) Análisis de extensión del cebador en el que se muestra la secuencia de DNA alrededor de los puntos de inicio de la transcripción (TSPs, en negrita y señalados con asteriscos) y los productos de la extensión del cebador obtenidos con dos oligonucleótidos distintos, diseñados en la zona próxima al codón de inicio de la traducción, y RNA total de: calle 1, cultivos fototróficos; calle 2, cultivos aeróbicos bajo estrés salino; calle 3, cultivos fermentativos; calle 4, cultivos respiratorios anaeróbicos. La posición de los nucleótidos de inicio de la transcripción aguas arriba del codón de inicio de la traducción se muestra a la derecha. Un producto correspondiente a la hibridación no específica del oligonucleótido usado en los análisis de extensión del cebador, y que no se encontró en otros experimentos, puede observarse en la calle 4. (B) Secuencia de un fragmento de 923 nt de DNA genómico que incluye 693 nt de zona no-codificante aguas arriba del gen *vpp* y que incluye la región promotora de dicho gen. Los nucleótidos marcados en negrita y señalados con flechas corresponden a las posiciones encontradas para los TSPs. La región de unión del ribosoma propuesta por Blatscheffsky M *et al.* (1999) aparece en negrita y marcada con una caja. Los dos oligonucleótidos usados para los experimentos de extensión del cebador se muestran con una flecha debajo. Las secuencias que muestran similitudes con la caja -10 consenso de *E. coli* se encuentran marcadas con cajas. Putativas regiones -35 para factores de transcripción distintos de σ^{70} se señalan con cajas de líneas discontinuas. Un posible sitio de unión de FNR, similar a la secuencia bacteriana consenso, se resalta con un sombreado gris claro. Los posibles sitios de unión de RegA se encuentran sobre un sombreado gris oscuro. Las letras subrayadas y en negrita representan una posible zona de reconocimiento del factor σ^{54} . El motivo TGGC-CG, característico de este tipo de factor, se marca además en *italica*. (C) Organización genética de las regiones alrededor de los genes *vpp* y *ppa*. Los datos preliminares de secuencia del genoma de *R. rubrum* son de la correspondiente página web de genomas microbianos del DOE-JGI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/MICROBES/Complete.html>).

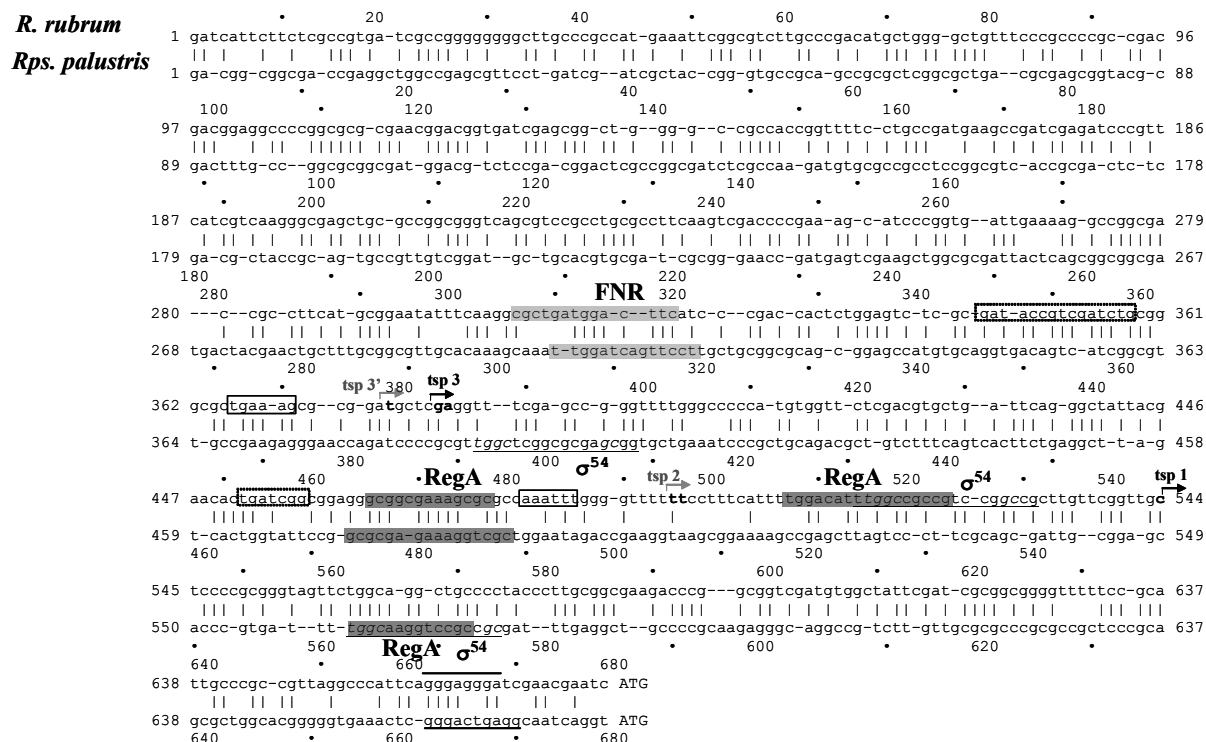


Figura 3.3.8: Alineamiento de las secuencias de las regiones promotoras de los genes *vpp* de las bacterias púrpura fotosintéticas *R. rubrum* y *Rhodospseudomonas palustris*. La zona no codificante del DNA (679 nucleótidos) aguas arriba del gen *vpp* de *R. rubrum* (parte del DNA clonado para los experimentos de extensión del cebador, número de acceso AJ549291) se alineó usando el programa DNASTrider™ v 1.3f4 (Método Needleman-Wunsh, mínimas restricciones para huecos y errores) con la correspondiente secuencia aguas arriba del gen *vpp* de *Rps. palustris*, especie cercana evolutivamente (Scaffold_1, nucleótidos 4589887-4590565; secuencia obtenida usando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1997) a partir de la página web del proyecto genoma de *Rps. palustris* del DOE-JGI, <http://aluminium.jgi-psf.org/prod/bin/browseBlast.pl>). La identidad entre ambas secuencias fue del 53,3%. Los puntos de inicio de la transcripción (TSP) determinados para *R. rubrum* en esta Tesis Doctoral se indican con flechas. No existen en la literatura datos sobre los TSPs del gen de *Rps. palustris*. Sin embargo, posibles sitios de unión para FNR (sombreado gris claro) y RegA (sombreado gris oscuro), así como para el factor σ^{54} (subrayado y con el motivo característico TGGC-GC en *italica*) pueden identificarse para ambas bacterias púrpura, que poseen características metabólicas similares, lo que sugiere la existencia de mecanismos de regulación comunes. También se indica la posición de putativas cajas -10 y -35 que pueden ser usadas por σ^{70} , pero también por factores σ inducibles por estrés (S, H, B).

3.3.6. Intentos de obtención de un mutante de *R. rubrum* carente de H⁺-PPasa

Con el fin de completar los experimentos fisiológicos en *Rhodospirillum rubrum* y profundizar en el conocimiento de la regulación de la H⁺-PPasa en este organismo, se planteó como objetivo la obtención de un mutante carente de H⁺-PPasa. Inicialmente, se planteó una estrategia de transformación directa con un plásmido que contuviera una copia interrumpida del gen *vpp*, de forma que la interrupción de las copias del cromosoma se produjera por recombinación homóloga. Para la obtención de este plásmido, se

amplificó mediante PCR la secuencia correspondiente a la ORF completa del gen, a partir del clon original que se describe al inicio de este capítulo de Resultados, y se clonó en el vector comercial pGEM-T. A continuación, se digirió el plásmido obtenido con *Bam*HI y *Hind*III, lo que eliminaría un fragmento de unos 500 nt del gen *vpp*, y se insertó en su lugar una casete de resistencia al antibiótico kanamicina (Km^r), mediante ligación en extremos romos tras tratamiento con T4 DNA polimerasa. Esta ligación generó dos construcciones distintas, cada una de las cuales poseía la casete de Km^r en una orientación distinta con respecto a *vpp*, pINTvpp1 y pINTvpp2. Células de la estirpe UR2 de *R. rubrum* crecidas en condiciones aeróbicas se transformaron con cada uno de estos plásmidos por choque térmico y se seleccionaron en placas con kanamicina. Esta estrategia no aportó ningún resultado positivo. Las células de *R. rubrum* crecidas en condiciones aeróbicas parecían adquirir una cierta resistencia intrínseca a la kanamicina, por lo que la selección a concentraciones inferiores a 200 $\mu\text{g/ml}$ no permitía distinguir colonias aisladas. El uso de concentraciones superiores no permitió aislar ninguna colonia especialmente resistente al antibiótico.

La segunda estrategia utilizada para la obtención del mutante consistió en la conjugación de las células de *R. rubrum* con una estirpe de *E. coli* transformada con un plásmido que contuviera la copia interrumpida del gen, para lo cual, los insertos de las construcciones pINTvpp1 y pINTvpp2 se liberaron de los plásmidos correspondientes mediante digestión con *Pst*I y *Nsi*I y se ligaron al plásmido conjugativo pSUP202, digerido con las mismas enzimas. Células de la estirpe S-17 de *E. coli* se transformaron por electroporación con las nuevas construcciones y se seleccionaron en placas que contenían 10 μg de tetraciclina, 50 μg de kanamicina y 30 μg de cloranfenicol por mililitro. Una vez comprobada la presencia de la construcción deseada en las colonias de *E. coli* obtenidas, se procedió a la transformación de la estirpe UR2 de *R. rubrum* por conjugación. Esta estrategia, una vez más, no dio resultados positivos, no pudiendo obtenerse tras varios intentos ninguna colonia de la bacteria fotosintética resistente a kanamicina.

3.4. Regulación transcripcional de la H⁺-PPasa en las microalgas eucarióticas *Chlorella fusca* y *Chlamydomonas reinhardtii*

3.4.1. Estudios fisiológicos sobre la regulación transcripcional de las H⁺-PPasas de *C. fusca* y *C. reinhardtii*

Al comenzar este trabajo de Tesis Doctoral, no se había publicado ningún dato acerca de la regulación de la H⁺-PPasa en los organismos fotosintéticos unicelulares, aunque sí existía alguna información acerca de esta proteína en plantas, que sugería una posible regulación de la misma en distintos tejidos por factores como el estrés salino (Colombo y Cerana 1993, Zingarelli *et ál.* 1994, Ballesteros *et ál.* 1996), el frío (Carystinos *et ál.* 1995, Darley *et ál.* 1995) o la anoxia (Carystinos *et ál.* 1995). Por esta razón, en esta parte del trabajo se decidió estudiar los efectos de diversos factores nutricionales y de estrés en la posible regulación transcripcional de la H⁺-PPasa de distintas microalgas eucarióticas. Aunque *Chlamydomonas reinhardtii* se ha considerado como un organismo modelo, al comienzo de estos estudios, no se disponía de un fragmento de DNA correspondiente a la H⁺-PPasa de este organismo. A pesar de haberse realizado numerosos intentos para amplificar y clonar, tanto a partir de DNA genómico como de cDNA, el fragmento descrito en el capítulo 3.1 (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002), debido al alto contenido en G+C de este organismo y a la relativamente baja temperatura de hibridación de los oligonucleótidos degenerados usados, no había sido posible obtener resultados positivos. Sin embargo, esta misma estrategia de PCR había permitido amplificar y clonar en pGEM-T el fragmento análogo para la microalga cloroficea *Chlorella fusca* (*Scenedesmus vacuolatus*), por lo que los primeros estudios fisiológicos se realizaron en este organismo.

Dado que la H⁺-PPasa se encuentra en la membrana del tonoplasto, bombeando protones hacia el interior de la vacuola en plantas superiores (Rea y Poole 1993), parecía lógico pensar que esta proteína podría tener un papel similar en algas eucarióticas y, por tanto, estar sometida a una regulación por factores que afectaran a la acidificación vacuolar o que implicaran un transporte más activo de solutos hacia el interior de dicha vesícula, por lo que se estudió, en una primera aproximación, el efecto de la presencia de distintas sales y osmolitos en el medio. Para los experimentos fisiológicos, las microalgas

se cultivaron en medio Sueoka con amonio como fuente de nitrógeno y con un gaseo constante de aire suplementado con un 3% de CO₂ hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento. En este punto, los cultivos se suplementaban con la sustancia deseada a partir de disoluciones estériles concentradas de la misma y se desarrollaban durante otras 24 h, con lo que se llegaba a alcanzar en los cultivos control el inicio de la fase estacionaria. Las concentraciones de sales y osmolito usadas en esta experiencia fueron: 15 mM LiCl, 150 mM NaCl, 150 mM KCl y 300 mM sorbitol. Los cultivos control se suplementaron con un volumen de agua idéntico al volumen de disolución concentrada usado. En el caso de *Chlorella fusca*, todas las sustancias usadas permitieron observar un aumento en el nivel de transcrito de la H⁺-PPasa en este organismo de entre un 50 y un 70% con respecto al control, sin que se observara ninguna diferencia en el comportamiento frente a los iones o el sorbitol en los experimentos de Northern Blot. El crecimiento de los cultivos, medido tanto como cantidad de clorofila en el cultivo, como densidad óptica final, no pareció verse afectado significativamente por la presencia de las sustancias estresantes en el medio, alcanzándose valores de ambos parámetros análogos a los medidos para los cultivos control (Figura 3.4.1).

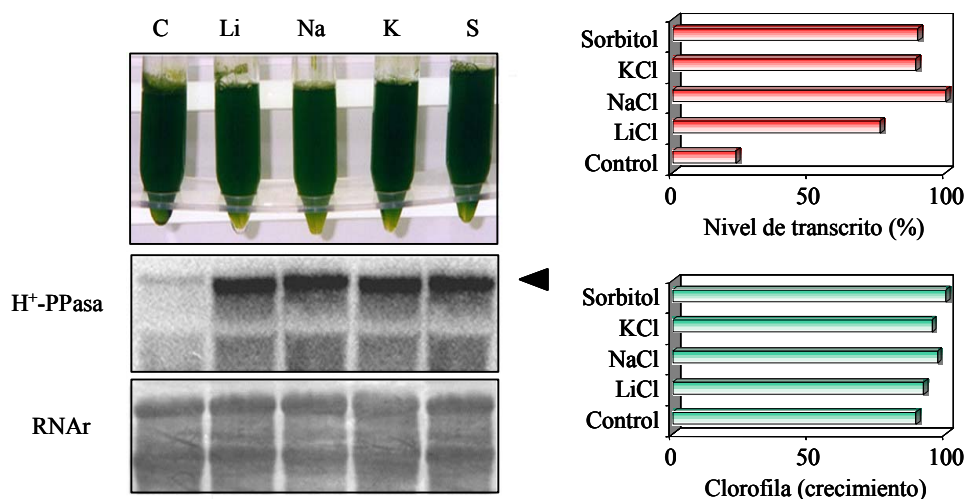


Figura 3.4.1: Efecto del estrés iónico y osmótico sobre los niveles de transcrito para la H⁺-PPasa de *Chlorella fusca*. Izq.: los cultivos de la microalga se desarrollaron hasta la mitad de la fase exponencial antes de añadir: Li, 15 mM LiCl; Na, 150 mM NaCl; K, 150 mM KCl; S, 300 mM sorbitol; C, un volumen de agua idéntico al usado para añadir las sales u osmolitos (control). La Figura recoge el aspecto de los cultivos (parte superior), el análisis por Northern Blot con una sonda correspondiente a la H⁺-PPasa de *C. fusca* (parte central) y la tinción con azul de metileno del RNA ribosomal como control de carga (parte inferior). Derecha: Cantidades relativas de clorofila (indicador del crecimiento, abajo) y transcrito (arriba) para los cultivos. 100% de clorofila suponen 25 µg/ml cultivo.

Dado que los cultivos han llegado en este punto hasta el principio de la fase estacionaria, se planteaba la duda de si el efecto observado en el nivel de transcrito se debía a un aumento del mismo en los cultivos sometidos a estrés o a una disminución en los controles en este punto del crecimiento. Por ello, se planteó el seguimiento de las variaciones del transcrito a lo largo del experimento, para lo que se tomaron muestras cada dos horas a partir de la adición de la sal. Dada la dificultad para procesar un número demasiado elevado de muestras de los cinco cultivos a la vez, la primera experiencia se limitó al cultivo suplementado con NaCl. El análisis por Northern Blot de las muestras de RNA obtenidas, demostró que los niveles de transcrito en cultivos control y en cultivos suplementados con Na⁺ no presentaban diferencias significativas a lo largo del desarrollo de los mismos hasta el final de la fase exponencial y principio de la fase estacionaria (aproximadamente, 12 horas después de la adición de la sal). En este punto, se producía una disminución en el nivel de transcrito en el control, mientras que se mantenía dicho nivel en los cultivos sometidos a estrés (Figura 3.4.2). Estas experiencias se llevaron a cabo con cultivos suplementados con sorbitol, obteniéndose resultados análogos.

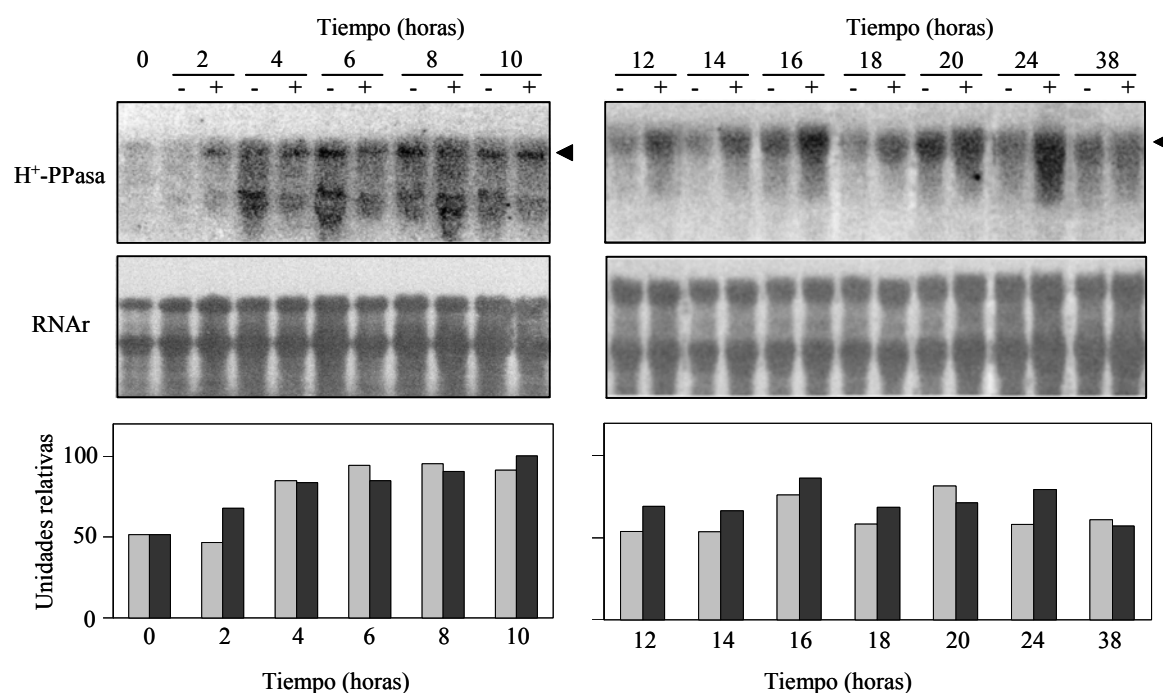


Figura 3.4.2: Cinética de la variación de los niveles de transcrito para la H⁺-PPasa en cultivos de *C. fusca* suplementados con NaCl. Cultivos desarrollados hasta la mitad de la fase exponencial (0 h), se suplementaron con NaCl 150 mM (+) o con un volumen análogo de agua estéril (-), tomándose muestras de los mismos a distintos tiempos, que se sometieron a análisis por Northern Blot. En la parte superior, hibridación de los RNA totales con una sonda de DNA para la H⁺-PPasa de *C. fusca*. En el centro, tinción del RNA ribosomal con azul de metileno como control de carga. Abajo, cuantificación de la intensidad relativa de las bandas obtenidas en el análisis por Northern Blot. Columnas negras, cultivos bajo estrés salino; columnas grises, cultivos control sin NaCl.

Dado que las variaciones en el nivel de transcrito de la pirofosfatasa se producían hacia el final de la fase exponencial y el comienzo de la fase estacionaria cuando la carencia de nutrientes impide a las células el mantenimiento de un alto contenido energético, la siguiente experiencia consistió en el análisis de una posible regulación transcripcional en cultivos desarrollados en distintas condiciones nutricionales. Para ello, las microalgas se cultivaron hasta la mitad de la fase exponencial en medio Sueoka (fototrofia) o en el mismo medio suplementado con glucosa, desarrollándose los cultivos, en este último caso, tanto en la luz (mixotrofia) como en la oscuridad (heterotrofia). Los análisis por Northern Blot permitieron observar la presencia de un menor nivel de transcrito en los cultivos desarrollados en presencia de glucosa en la oscuridad (aproximadamente el 45% respecto a las condiciones fototróficas o mixotróficas), mientras que en la luz, los cultivos desarrollados con el azúcar presentaban una cantidad de transcrito ligeramente mayor (aproximadamente un 4%) que la de los controles (Figura 3.4.3).

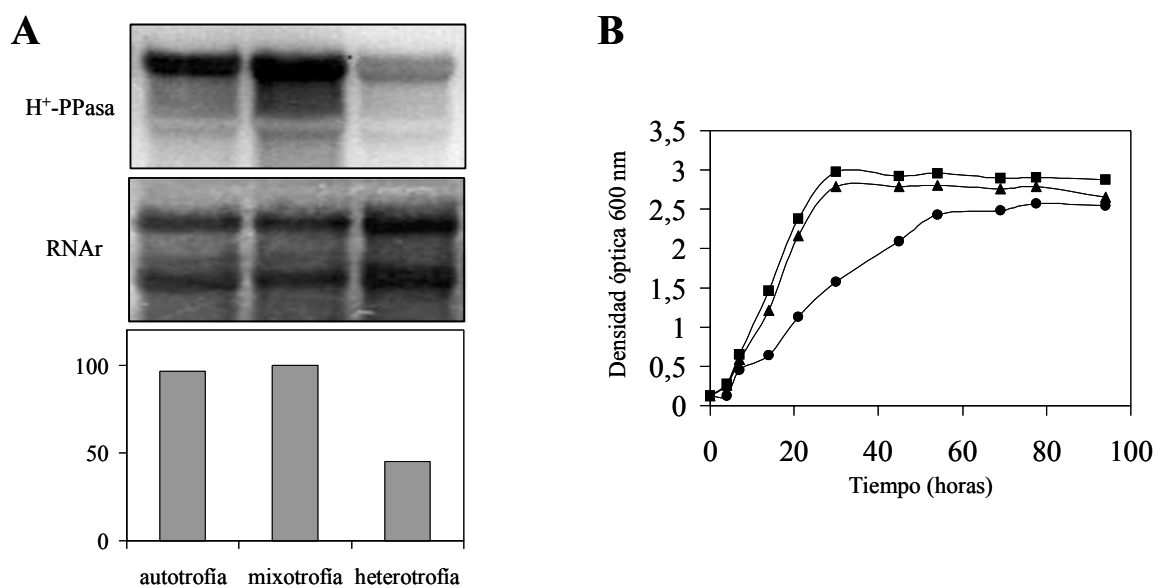


Figura 3.4.3: Análisis de los niveles de transcrito de la H⁺-PPasa de *Chlorella fusca* en distintas condiciones nutricionales. Los cultivos se desarrollaron hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento en condiciones autotróficas (Sueoka, luz), mixotróficas (glucosa, luz) o heterotróficas (glucosa, oscuridad). A) Análisis por Northern Blot. En la parte superior, hibridación del RNA con una sonda radiactiva contra la H⁺-PPasa de *C. fusca*; en el centro, tinción del RNA ribosomal con azul de metileno como control de carga. En la parte inferior, cuantificación normalizada de las bandas de hibridación obtenidas. B) Curvas de crecimiento en las distintas condiciones nutricionales: ●, cultivos autotróficos; ■, cultivos mixotróficos; ▲, cultivos heterotróficos.

Mientras se estaban llevando a cabo los experimentos fisiológicos con *C. fusca*, la búsqueda en la base de datos de ESTs de *C. reinhardtii* (Kazusa DNA Research Institute, Japón) permitió la identificación de clones que podrían contener las secuencias de cDNA que codifican la H⁺-PPasa de este organismo. Estos clones se secuenciaron, encontrándose que uno de ellos contenía el cDNA completo para el gen buscado, el cual se amplificó por PCR de alta fidelidad con oligonucleótidos diseñados en los extremos del gen y se clonó en un plásmido pGEM-T. El plásmido con la secuencia completa de cDNA se utilizó como molde para obtener una sonda para los análisis por Northern Blot, usando oligonucleótidos específicos para los extremos del gen, dado que los oligonucleótidos degenerados usados en el caso de *Chlorella fusca* no permitieron obtener resultados positivos.

Una vez más, se iniciaron los experimentos fisiológicos con la adición de distintas sales o sorbitol a los cultivos desarrollados hasta la mitad de la fase exponencial. En este caso, al contrario de lo observado para la otra microalga, la adición de los distintos iones tuvo un efecto dramático para la supervivencia de los cultivos, llegando a producirse incluso una disminución en la densidad óptica final (aproximadamente 50% para NaCl, 35% para LiCl y 70% para KCl). La cantidad de clorofila de estos cultivos con respecto al control fue del 44% para el Li⁺, 24% para el Na⁺ y 5% para el K⁺. En todos los casos, se observó una clara inducción del transcrito de la H⁺-PPasa, siendo el nivel del mismo 20 veces mayor que para el control en presencia de KCl. Por otra parte, aunque el sorbitol produce un efecto de disminución del crecimiento del cultivo (50%) y de la cantidad de clorofila (60%), no se observó ningún efecto claro sobre el nivel de transcrito en estas condiciones (Figura 3.4.4). Aunque no se tomaron muestras a distintos tiempos a lo largo del desarrollo de esta experiencia, el efecto sobre el crecimiento de los cultivos podía observarse tan sólo 4 horas después de la adición de la sal o el sorbitol.

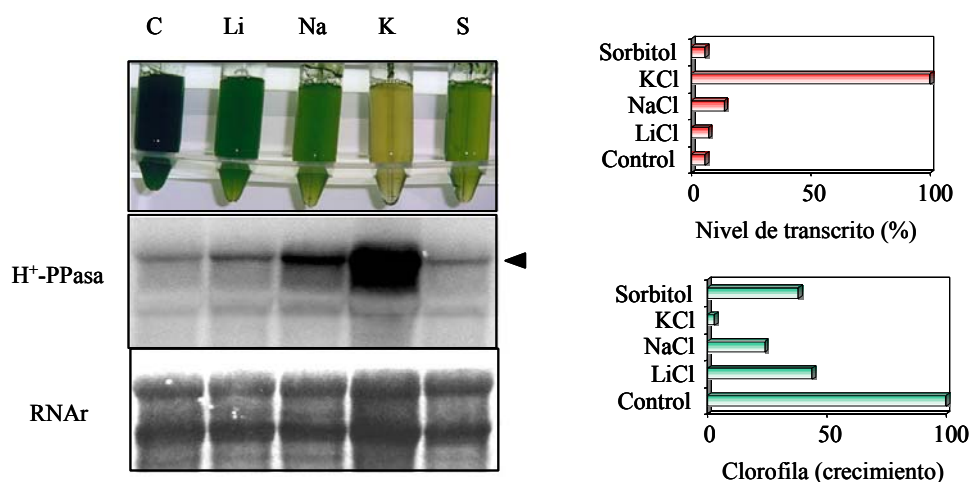


Figura 3.4.4: Efecto del estrés iónico y osmótico sobre los niveles de transcrito para la H⁺-PPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*. Izq.: los cultivos de la microalga se desarrollaron hasta la mitad de la fase exponencial antes de añadir: Li, 15 mM LiCl; Na, 150 mM NaCl; K, 150 mM KCl; S, 300 mM sorbitol; C, un volumen de agua análogo al usado para añadir las sales u osmolitos (control). La Figura recoge el aspecto de los cultivos (parte superior), el análisis por Northern Blot con una sonda correspondiente a la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* (parte central) y la tinción con azul de metileno como control de carga (parte inferior). Derecha: Cantidades relativas de clorofila (indicador del crecimiento, abajo) y transcrito (arriba) para los cultivos. 100% de clorofila suponen 30 µg/ml cultivo.

Con el fin de determinar el efecto de las distintas condiciones nutricionales sobre la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*, cultivos de esta microalga se desarrollaron hasta la mitad de la fase exponencial en medio Sueoka (fototrofia) o en el mismo medio suplementado con acetato. En este último caso, los cultivos se desarrollaron tanto en presencia de luz (mixotrofia) como en oscuridad (heterotrofia). Los análisis por Northern Blot permitieron observar la presencia de un menor nivel de transcrito para los cultivos en acetato. Si bien la disminución en los niveles de transcrito era muy pequeña en el caso de los cultivos mixotróficos (8% respecto al control), los cultivos heterotróficos presentaban cantidades mucho menores de transcrito (aproximadamente un 10% respecto a las condiciones fotosintéticas o mixotróficas) (Figura 3.4.5).

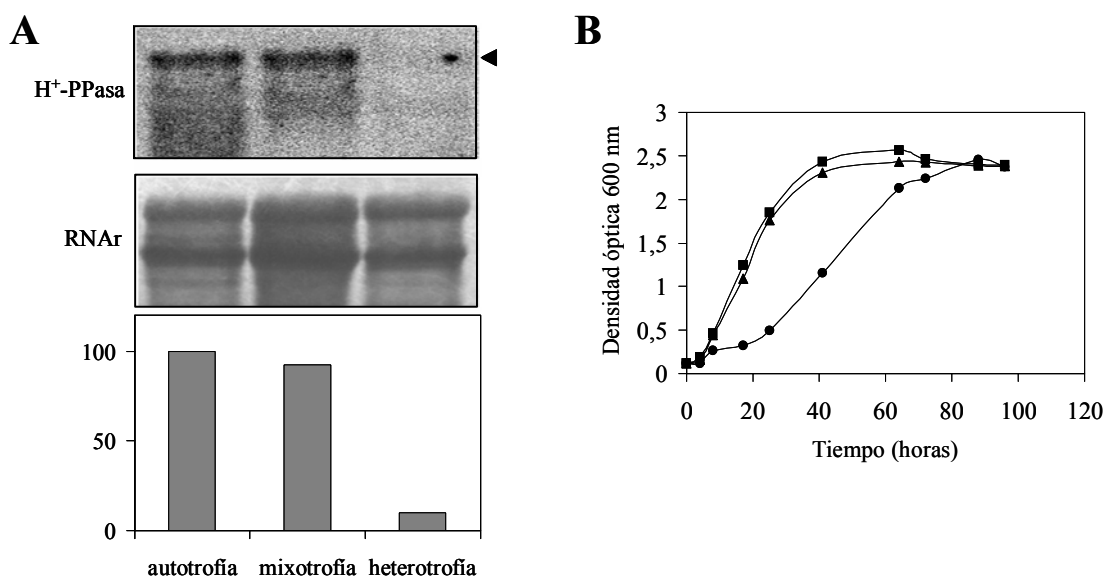


Figura 3.4.5: Efecto de las condiciones nutricionales en los niveles de transcrito para la H⁺-PPasa en la microalga *C. reinhardtii*. Los cultivos se desarrollaron hasta la mitad de la fase exponencial en condiciones autotróficas (Sueoka, luz), mixotróficas (Acetato, luz) y heterotróficas (Acetato, oscuridad). A) Análisis por Northern Blot. En la parte superior, hibridación con una sonda radiactiva contra la H⁺-PPasa; en el centro, tinción con azul de metileno del RNA ribosomal. En la parte inferior se muestra la cuantificación del análisis por Northern Blot. B) Curvas de crecimiento en las distintas condiciones nutricionales: ●, cultivos autotróficos; ■, cultivos mixotróficos; ▲, cultivos heterotróficos.

3.4.2.- Obtención de mutantes de antisentido y sobreexpresión de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*: clonación del fragmento de DNA genómico correspondiente al gen para dicha proteína.

Con el fin de completar los experimentos fisiológicos, se abordó la obtención de mutantes de *C. reinhardtii* que sobreexpresaran la H⁺-PPasa o presentaran niveles reducidos de la misma, en colaboración con el grupo del Profesor Emilio Fernández de la Universidad de Córdoba.

Para la confección de las construcciones adecuadas para la obtención de mutantes que poseyeran niveles reducidos de la H⁺-PPasa se siguieron varias estrategias. En todas ellas, era necesario clonar el cDNA correspondiente a la H⁺-PPasa bajo el control de un promotor fuerte inducible y en sentido opuesto a la orientación del promotor, con el fin de que la transcripción del mismo produjera un RNA antisentido una vez dentro de la célula de la microalga. El fragmento de cDNA deseado se obtuvo mediante PCR sobre clones

obtenidos del Kazusa Research Institute (números de acceso: AV390232, AV396820), que habían sido identificados mediante búsqueda con BLAST sobre la base de datos de ESTs de *Chlamydomonas*, y posterior clonación en el plásmido comercial pGEM-T. La primera estrategia consistió en la clonación del cDNA en la orientación adecuada en el plásmido pAD35, que contiene el fragmento de DNA genómico completo que codifica la nitrato reductasa (*nia1*) de *C. reinhardtii*, incluyendo las regiones promotoras y terminadoras (Figura 3.4.6). Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción *StuI* y *ApaI* y se ligó al cDNA de la H⁺-PPasa digerido con *SalI* y *ApaI*. El extremo *SalI* del inserto se hizo romo por tratamiento con T4 DNA polimerasa, con el fin de hacerlo compatible con el sitio *StuI*. Este proceso generó un plásmido que contenía el cDNA para la H⁺-PPasa, un fragmento del extremo 3' del gen *nia1* (aproximadamente 1,5 kb) y el terminador de dicho gen y que se digirió, a continuación, con *ApaI* y *EcoRI*. El fragmento liberado se ligó al plásmido pAD35 digerido a su vez con *HindIII* y *EcoRI*. Tras la restricción, los extremos *ApaI* y *HindIII* se hicieron romos para permitir la ligación de ambos. El plásmido obtenido finalmente, denominado pAsVPP1, contenía el gen de la H⁺-PPasa en sentido opuesto al del promotor y al terminador del gen *nia1*, pero también un fragmento de 1,5 kb correspondiente al gen *nia1* del plásmido original pAD35.

Dado que el fragmento de gen *nia1* presente en el plásmido pAsVPP1 no podía eliminarse fácilmente por restricción, se diseñaron oligonucleótidos en los extremos 5' y 3', tanto del terminador como del promotor del gen *nia1*, que contenían sitios de restricción artificiales. De este modo, mediante una estrategia de PCR, ambos fragmentos de DNA se clonaron en la orientación adecuada en un plásmido pBS SK⁺, dando un nuevo plásmido, denominado pNia (Figura 3.4.7). Para la introducción del cDNA de la H⁺-PPasa en sentido opuesto al del promotor, se siguió una estrategia en dos pasos análoga a la anterior. El cDNA se obtuvo por digestión con las enzimas de restricción *ApaI* y *SalI*, y se ligó a pNia cortado con *ApaI* y *SmaI*, tras tratamiento con T4 DNA polimerasa del extremo *SalI*. A continuación, la nueva construcción se digirió con *SpeI* y *EcoRI* y volvió a ligarse a pNia1 digerido, ésta vez, con *EcoRI* y *XhoI*, tras hacerse romos los extremos incompatibles, obteniéndose el plásmido pAsVPP2.

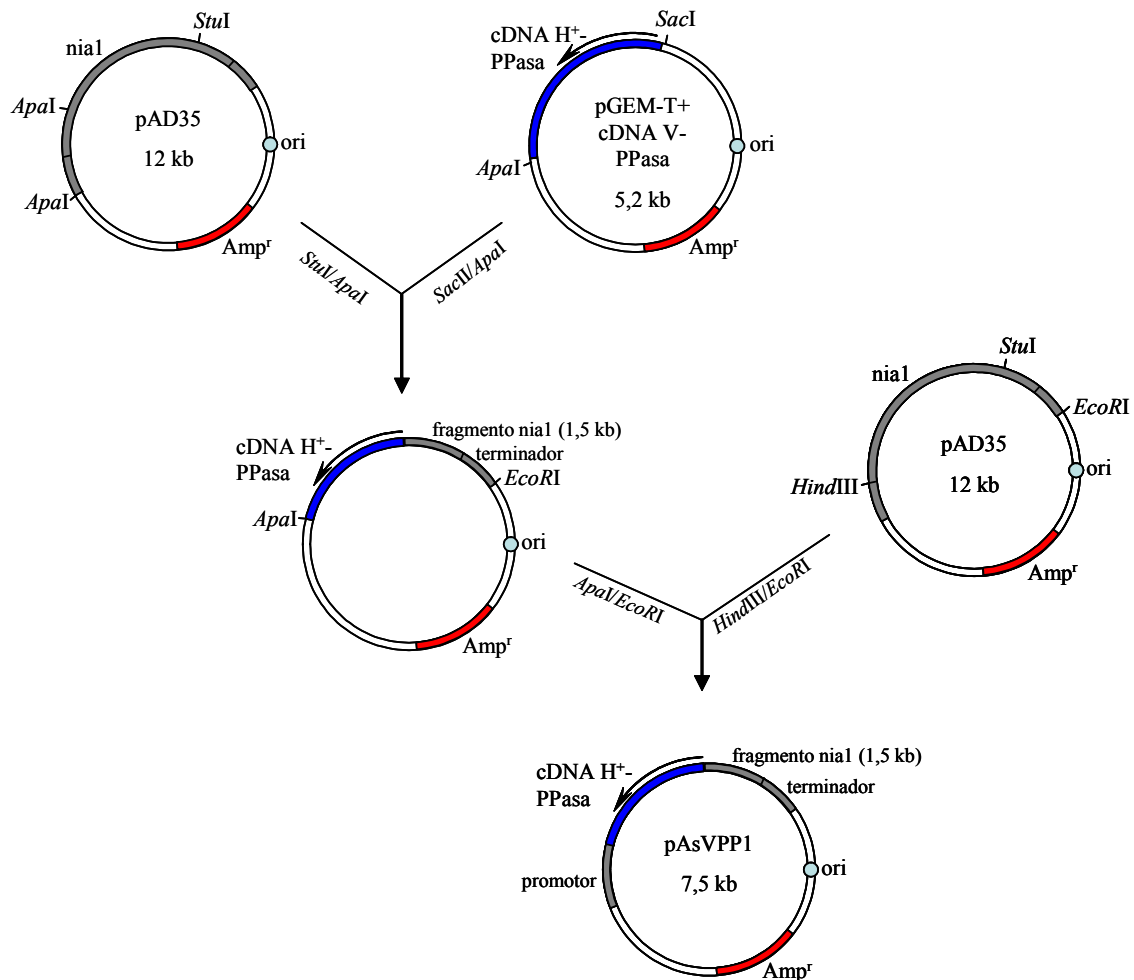


Figura 3.4.6: Obtención del plásmido pAsVPP1 para la obtención de un RNA antisentido de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*. El plásmido se digirió con las enzimas *ApaI* y *StuI* y se ligó al cDNA de la H⁺-PPasa obtenido por digestión con *SacII*, tratamiento con T4 DNA polimerasa, y digestión con *ApaI*. El plásmido obtenido se digirió una vez más con *ApaI* y *EcoRI* y se ligó a pAD35 digerido con *HindIII* y *EcoRI*, tras hacer romos los extremos incompatibles. El plásmido final (pAsVPP1) contiene el gen de la H⁺-PPasa en antisentido y un fragmento del extremo 3' del gen *nial*, entre el promotor y el terminador de este último gen.

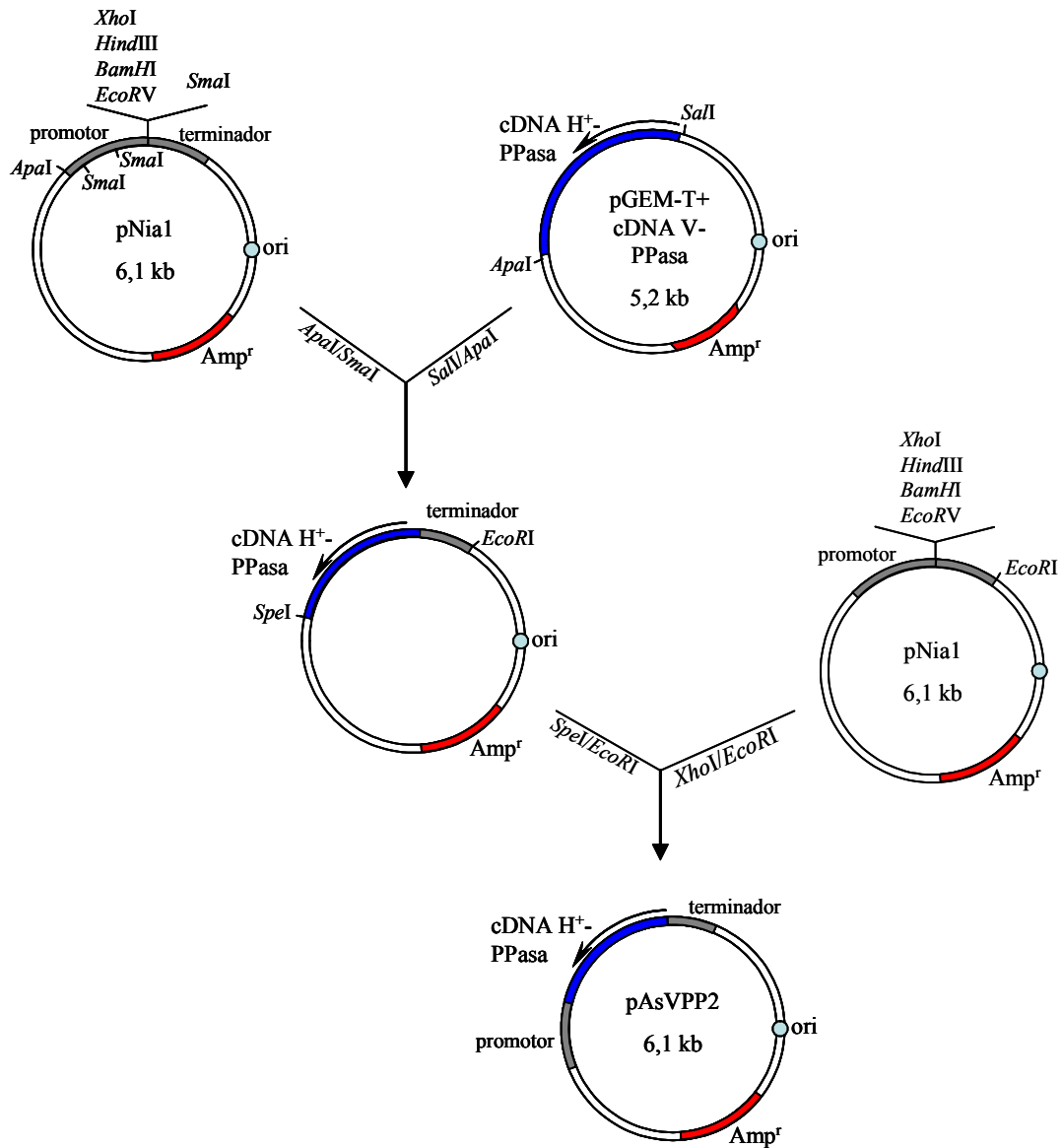


Figura 3.4.7: Obtención del plásmido pAsVPP2 para la obtención de un RNA antisentido de la H^+ -PPasa de *C. reinhardtii*. El plásmido se digirió con las enzimas *ApaI* y *SmaI* y se ligó al cDNA de la H^+ -PPasa obtenido por digestión con *SmaI*, tratamiento con T4 DNA polimerasa, y digestión con *ApaI*. El plásmido obtenido se digirió una vez más con *SpeI* y *EcoRI* y se ligó a pAD35 digerido con *XhoI* y *EcoRI*, tras hacer romos los extremos incompatibles. El plásmido final (pAsVPP2) contiene el gen de la H^+ -PPasa en antisentido, entre el promotor y el terminador del gen *nia1*.

Por último, desde el grupo del Profesor Fernández, se sugirió la posibilidad de hacer construcciones que contuvieran dos copias del gen de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*, una en el sentido del promotor y otra en sentido opuesto, lo que parece mejorar la eficiencia del proceso de bloqueo de la transcripción del gen para la proteína deseada en los transformantes de este organismo. Para ello, el plásmido pAsVPP2 se digirió con *Sph*I y *Cla*I y se ligó al cDNA de la H⁺-PPasa obtenido por digestión con *Sph*I y *Sal*I, tras hacer romos los extremos incompatibles, generándose un plásmido, denominado pAsVPP3, que contiene el promotor y el terminador del gen *nial* flanqueando una secuencia de DNA de aproximadamente 2,8 kb, que corresponde a dos copias sucesivas de un fragmento de la secuencia del cDNA para la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* (aproximadamente 1,4 kb), la primera en el sentido del promotor y el terminador y la segunda en sentido opuesto (Figura 3.4.8).

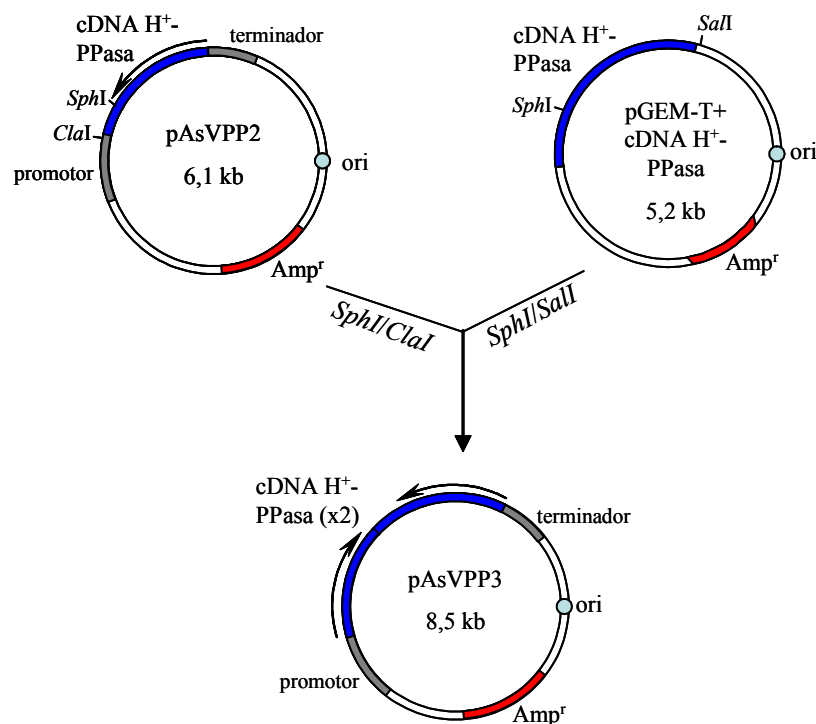


Figura 3.4.8: Obtención del plásmido pAsVPP3 para la obtención de un RNA antisentido de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*. El plásmido pAsVPP2 se digirió con *Sph*I y *Cla*I y se ligó a una nueva copia del cDNA de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*, obtenida por digestión con *Sph*I y *Sal*I, tras tratar los extremos incompatibles con T4 DNA polimerasa, con el fin de generar extremos romos. El plásmido final se denominó pAsVPP3.

Para la obtención de construcciones que permitieran sobreexpresar la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* en este mismo organismo, era necesaria la clonación de los fragmentos de DNA genómico que codifican esta proteína. Para ello, los oligonucleótidos diseñados para los extremos 5' y 3' del gen con sitios artificiales *SalI* y *SpeI*, respectivamente, se utilizaron en reacciones de PCR con la enzima de alta fidelidad ECOTAQ Plus (Ecogen), con un tiempo de elongación de 10 min, en presencia de concentraciones variables de DMSO, y siguiendo las instrucciones del fabricante, obteniéndose un número muy elevado de productos artefactuales de la reacción. Por ello, se decidió transferir el resultado de la electroforesis de dichos productos a una membrana de Nylon, del mismo modo que en el caso de los análisis por Southern Blot, e hibridar la misma con una sonda correspondiente al cDNA completo para la H⁺-PPasa (Figura 3.4.9). Esta estrategia permitió identificar una banda de aproximadamente 4,2 kb como el fragmento de DNA genómico buscado. Tras llevar a cabo una nueva serie de reacciones de PCR, el producto de tamaño adecuado se clonó en un plásmido pGEM-T, lo que generó tres tipos de clones con patrones de restricción distintos (Figura 3.4.9). Dado que la secuencia de DNA genómico no estaba disponible en ese momento en la base de datos del proyecto genoma de *C. reinhardtii*, no era posible identificar el patrón de restricción correcto, debido al desconocimiento de las secuencias de los intrones, por lo que se decidió transferir los fragmentos de restricción de los clones a una membrana e hibridar, una vez más, con la sonda radiactiva anterior, con el fin de identificar si alguno de ellos contenía como inserto una banda artefactual que no correspondiera a la H⁺-PPasa. Esta estrategia, sin embargo, no permitió descartar ninguno de los tres clones distintos obtenidos. Estos clones se secuenciaron en un secuenciador automático, encontrándose que uno de ellos carecía de la secuencia de uno de los oligonucleótidos usados para la reacción de PCR (clon 1) y los otros dos poseían una secuencia idéntica de exones que la secuencia del cDNA de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* clones 2 y 3). Algo después, los avances en el proyecto genoma de *C. reinhardtii*, permitieron localizar la secuencia de DNA genómico para la H⁺-PPasa de este organismo, confirmándose las secuencias obtenidas y observándose que las mutaciones puntuales que daban lugar a distintos patrones de restricción se encontraban en distintos intrones.

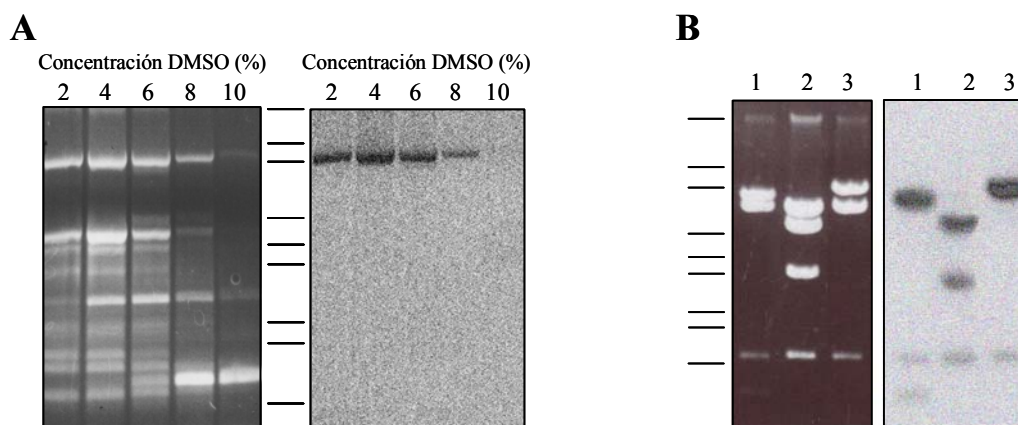


Figura 3.4.9: Clonación del fragmento de DNA genómico para la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*. A) Usando oligonucleótidos diseñados sobre los extremos 5' y 3' del gen de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*, se llevaron a cabo reacciones de PCR sobre el DNA genómico de la microalga, en presencia de distintas concentraciones de DMSO. A la izquierda, tinción con bromuro de etidio de los productos de PCR sometidos a electroforesis. A la derecha, los productos de PCR se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con una sonda de DNA correspondiente a la totalidad del gen para la H⁺-PPasa. B) La ligación en el plásmido pGEM-T del producto de PCR que contenía el fragmento de DNA genómico para la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* generó tres tipos de clones con distintos patrones de restricción. A la izquierda se muestra la tinción con bromuro de etidio de los fragmentos obtenidos por restricción con *ApaI* y *SacI*. A la derecha, hibridación de dichos fragmentos con una sonda radiactiva correspondiente al cDNA completo del gen. La secuenciación de estos clones demostró que el número 1 contenía una versión del gen truncada en el extremo 3' y los números 2 y 3 presentaban variaciones de la secuencia en la zona de los intrones, lo que no debería afectar a la sobreexpresión del gen. Las posiciones de los patrones de peso molecular se indican con líneas. De arriba abajo, 21,3; 5,1; 3,5; 2; 1,6; 1,3; 0,9; 0,83 y 0,56 kb.

Con el fin de obtener las construcciones para la sobreexpresión, fue necesario eliminar uno de los sitios *EcoRI* del plásmido pNia, con el fin de generar un sitio único entre el promotor y el terminador del gen *nia1*, problema que se resolvió mediante la digestión parcial del plásmido con dicha enzima, tratamiento con T4 DNA polimerasa y posterior religación. El nuevo plásmido, pNia2, se digirió con las enzimas *XhoI* y *EcoRI* y se ligó a los fragmentos de DNA genómico de 4,2 kb, obtenidos mediante digestión de los clones 2 y 3 del DNA genómico para la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* en pGEM-T con *SaII* y *SpeI*, tras tratar el extremo *SpeI* con T4 DNA polimerasa, dando los plásmidos pVPPse2 y pVPPse3 (Figura 3.4.10). La obtención de todas las construcciones descritas en este capítulo presentó graves dificultades técnicas, siendo necesario en la mayor parte de los casos el cultivo a 30°C de las bacterias usadas para extender dichas construcciones con el fin de evitar recombinaciones de los plásmidos y la pérdida de parte del material genético deseado. En muchos casos fue también necesario diseñar varias estrategias distintas hasta encontrar una que pudiera llevarse a cabo con éxito.

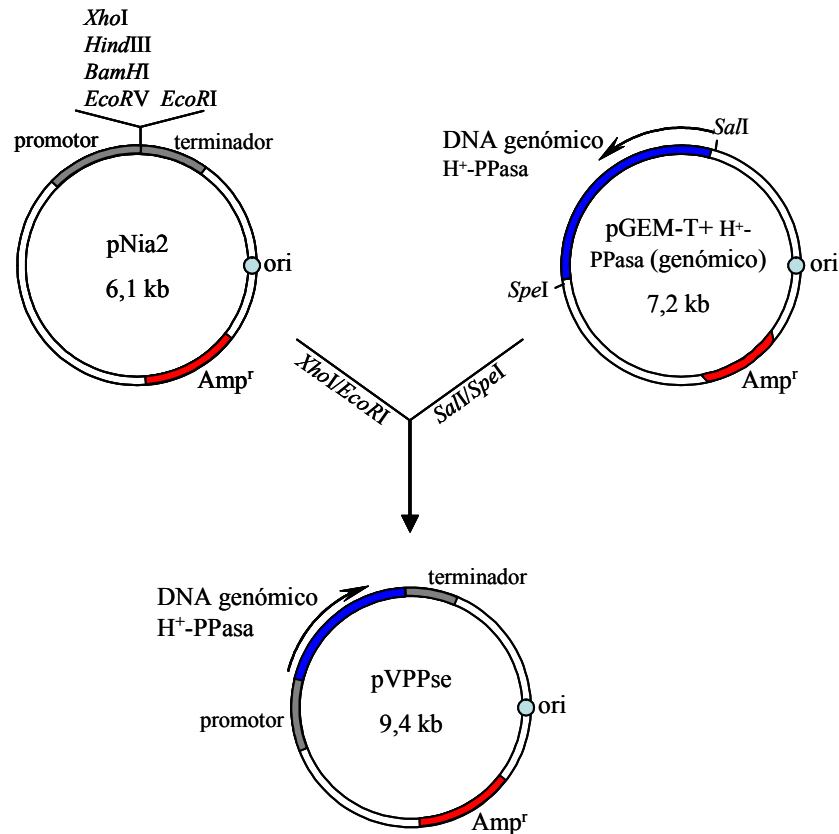


Figura 3.4.10: Construcción de un plásmido para la sobreexpresión del gen para la H⁺-PPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*. Los clones en pGEM-T (números 2 y 3) que tenían el fragmento de genómico para la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* se digirieron con *SpeI*, se trataron con T4 DNA polimerasa y a continuación volvieron a someterse a restricción con *SalI*. Los fragmentos de 4,2 kb así obtenidos se ligaron en los sitios únicos *XhoI* y *EcoRI*, generando los plásmidos pVPPse (2 y 3).

Los plásmidos obtenidos, tanto para la sobreexpresión como para la obtención de un RNA antisentido, se usaron para transformar células de *C. reinhardtii* de la estirpe 704, carente de pared celular. Para la selección de las posibles inserciones de las construcciones deseadas en el DNA genómico de la microalga, se llevó a cabo una co-transformación con el plásmido pSI104, que contiene una casete de resistencia al antibiótico paromomicina, y los plásmidos obtenidos durante este trabajo, linearizados con *KpnI* y *ScaI*, respectivamente, para facilitar la integración. Los transformantes se seleccionaron en placas que contenían 25 μ g de antibiótico por mililitro y se mantuvieron en placas de medio TAP con amonio como fuente de carbono. Se han llevado a cabo algunos experimentos preliminares con el fin de determinar la integración de los fragmentos de DNA deseados en el DNA nuclear de la microalga. La primera aproximación consistió en una estrategia de PCR sobre el DNA genómico de los transformantes usando un oligo correspondiente al promotor del gen *nial1* y otro

específico del gen de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii*, según el protocolo descrito en el apartado 2.8.3.7 de Materiales y Métodos. Este proceso, sin embargo, resultó poco esclarecedor. Debido al alto contenido en G+C de este organismo, se obtuvieron un gran número de bandas, tanto en los transformantes como en los controles, lo que no permitió determinar con claridad la integración del DNA foráneo. Por este motivo, la siguiente aproximación consistió en llevar a cabo análisis tanto por Northern como por Southern Blot en los transformantes. Dado el elevado número de los mismos (en torno a 120), se decidió reducir el volumen de trabajo intentando identificar transformantes que presentaran algún tipo de sensibilidad, en el caso de los posibles mutantes de antisentido, a la presencia de NaCl o KCl en el medio de cultivo y una mayor resistencia, en el caso de los mutantes de sobreexpresión. Para ello, los transformantes se desarrollaron en placas de amonio y nitrato, sin sales o en presencia de cantidades variables de NaCl y KCl, desde 25 a 150 mM. En algunos casos, parecía apreciarse una ligera variación en el crecimiento, que podría deberse a la inserción del DNA deseado, aunque no pudo descartarse la posibilidad de que estas diferencias se debieran a variaciones en la cantidad de células presentes inicialmente en las placas. Además, el crecimiento de la estirpe de *C. reinhardtii* usada para la transformación era más rápido en medio TAP en presencia de nitrato que en presencia de amonio, lo que presentaba una dificultad añadida a la hora de intentar detectar diferencias de crecimiento, problema que era más acusado en el caso de los posibles mutantes de antisentido que en los de sobreexpresión. Por esta razón, se seleccionaron algunos transformantes de sobreexpresión, que parecían presentar algún tipo de fenotipo, para comenzar los experimentos de caracterización, para lo cual, se desarrollaron en medio líquido Sueoka con amonio o nitrato como fuente de nitrógeno, tal como se describe en el apartado 2.10 de materiales y métodos, con el fin de obtener preparaciones de RNA y DNA para el análisis por Northern y Southern Blot. Los primeros análisis por Northern Blot demostraron la presencia de algunos transformantes cuyos niveles de transcrito para la H⁺-PPasa eran más elevados en presencia de nitrato que en la estirpe silvestre de *C. reinhardtii* usada para la transformación (Figura 3.4.11). El transformante 4-1 (calle 2, Figura 3.4.11), presentaba niveles muy bajos de transcrito para la H⁺-PPasa en condiciones de crecimiento con amonio como fuente de cultivo (aproximadamente un 10% respecto a los niveles en nitrato o frente al control), lo que podía deberse a una integración de la construcción exógena en la zona promotora o el gen

de la H^+ -PPasa del cromosoma de la microalga transformada. Por otra parte, el mutante 3-21, presentó una disminución de los niveles de transcrito en presencia de amonio de aproximadamente el 18% frente a los niveles detectados en presencia de nitrato. Para el resto de los mutantes de sobreexpresión probados, no se apreciaron diferencias significativas en el nivel de transcrito de la H^+ -PPasa en las dos fuentes de nitrógeno.

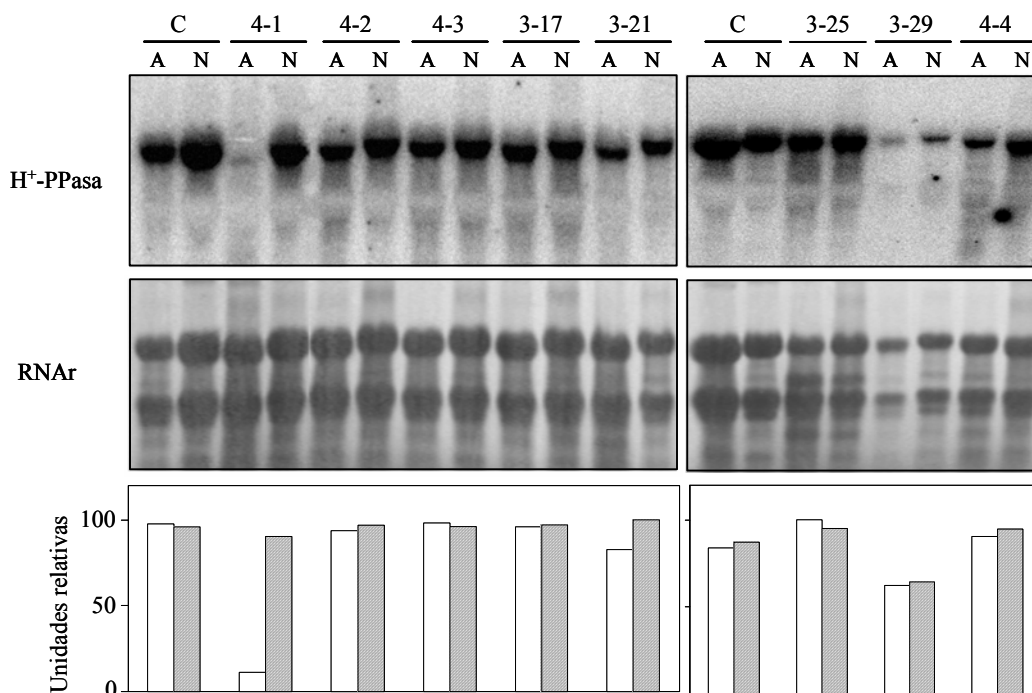


Figura 3.4.11: Caracterización de los posibles mutantes de sobreexpresión de la H^+ -PPasa de *C. reinhardtii* (1): análisis por Northern Blot. Los transformantes que presentaban ligeros fenotipos en placas de medio Sueoka suplementadas con KCl o NaCl, se desarrollaron hasta la mitad de la fase exponencial en medio líquido con amonio o nitrato como fuente de nitrógeno. Fracciones de 10 μ g de RNA total se sometieron a electroforesis y a análisis por Northern Blot con una sonda correspondiente al gen completo para la H^+ -PPasa. En la parte superior, hibridación con la sonda marcada radiactivamente. En el centro, tinción del RNA ribosomal con azul de metileno como control de carga. En la inferior, cuantificación normalizada de los análisis por Northern Blot.

El análisis por Southern Blot de los transformantes anteriores permitió identificar una banda de tamaño distinto a las de los controles en el caso del mutante 3-21 (calle 7, Figura 3.4.12), pero no así en el caso del mutante 4-1 (calle 2, Figura 3.4.12), lo que podría indicar que la variación de los niveles de transcrito observados para este último no es debida a la inserción del DNA exógeno.

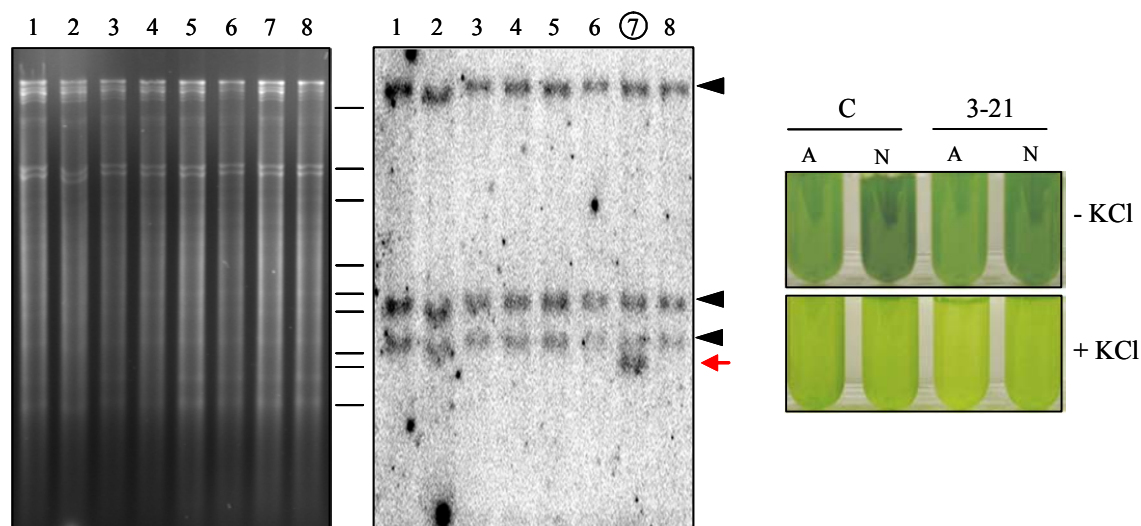


Figura 3.4.12: Caracterización de los posibles mutantes de sobreexpresión de la H^+ -PPasa de *C. reinhardtii* (2): análisis por Southern Blot y efecto del estrés salino. *Izquierda:* Preparaciones de aproximadamente 5 μ g de DNA total de los transformantes obtenidos con el plásmido pVPPse, se sometieron a digestión con *Pst*I y análisis por hibridación con una sonda radiactiva correspondiente a la ORF completa para el gen de la H^+ -PPasa. La posición de los patrones de peso molecular se indica con líneas: de arriba abajo, 21,3; 5,1; 3,5; 2; 1,6; 1,3; 0,9; 0,83 y 0,56 kb. En la calle 1 se muestra el resultado para células de la estirpe 704 de *C. reinhardtii* no transformadas como control. En el resto de las calles, selección de transformantes de sobreexpresión. En la calle 7 (marcada con un círculo), se muestra el transformante 3-21. Las bandas de hibridación comunes para el control y los transformantes se indican con flechas negras. La banda adicional encontrada en el mutante 3-21 se indica con una flecha roja. *Derecha:* Aspecto de los cultivos control (C) y del transformante 3-21 en ausencia o presencia de KCl 150 mM. Aunque el crecimiento de los cultivos control se iguala en presencia de la sal, el transformante 3-21 presenta un crecimiento mayor en presencia de nitrato

En vista de los resultados obtenidos, cultivos del transformante 3-21 se desarrollaron en medio líquido Sueoka hasta la mitad de la fase exponencial, punto en el cual se les añadió KCl desde una disolución concentrada hasta una concentración final de 150 mM o se suplementaron con un volumen de agua idéntico (cultivos control). Dado que los cultivos estaban sometidos a una baja agitación, por el hecho de que el mutante 704 usado en las transformaciones carece de pared celular, resultaba complicado mantener las células en suspensión y, por tanto, sometidas al efecto de la sal, por lo que el crecimiento de los cultivos pareció verse menos afectado que en el caso de la experiencia descrita en la Figura 3.4.4. Aún así, al cabo de, aproximadamente, 36 horas tras la adición del KCl, se pudo apreciar una cierta variación en el crecimiento de los cultivos del transformante 3-21 frente a los controles (Figura 3.4.12). En ausencia de la sal, tanto el control como el mutante 3-21 crecían un poco más rápido en medio con nitrato como fuente de nitrógeno. Sin embargo, en presencia de KCl, el crecimiento de los cultivos se veía afectado de tal modo que en los controles los crecimientos tanto con amonio como

con nitrato se igualaban, mientras que el transformante 3-21 el crecimiento parecía crecer algo más en presencia de nitrato que con amonio.

La caracterización de los posibles mutantes de antisentido presentó mayores complicaciones. En los cultivos desarrollados en placas de medio TAP con amonio o nitrato como fuente de nitrógeno, no se observaron diferencias de crecimiento que pudieran achacarse a la expresión del RNA antisentido, como también ocurrió en las placas de medio Sueoka con KCl o NaCl, dado que, como se ha expuesto anteriormente, no podía eliminarse la posibilidad de que las diferencias observadas no se debieran a variaciones en el número de células inicial en cada placa. Sin embargo, en el caso del transformante 1-17, que correspondía a la transformación con el plásmido pAsVPP2, el crecimiento en placas medio mineral con nitrato en presencia de 150 mM KCl parecía claramente menor que el encontrado en placas con amonio. Por todo ello, se seleccionó un número amplio de transformantes para comenzar este trabajo de caracterización, entre los que se encontraba el 1-17. Los análisis por Northern Blot presentaron problemas de degradación del RNA mensajero en la mayor parte de los casos, no sólo en los cultivos desarrollados en nitrato, que estarían expresando el RNA antisentido, sino también en los cultivos desarrollados en amonio. El transformante 1-17 fue incapaz de crecer en medio líquido Sueoka con nitrato como fuente de nitrógeno, ni siquiera en ausencia de sales añadidas (Figura 3.4.13).

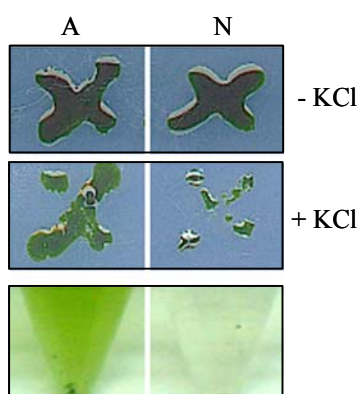


Figura 3.4.13: Aspecto de los cultivos de un posible mutante de antisentido de la H^+ -PPasa de *C. reinhardtii*. El posible mutante 1-17, que correspondía a células transformadas con el plásmido pAsVPP2, se creció tanto en medio líquido como en placas de medio Sueoka, con amonio (A) o nitrato (N) como fuente de nitrógeno. Arriba y en el centro, cultivos en placas suplementadas con una concentración 150 mM de KCl o en ausencia de esta sal, tras 10 días de crecimiento. En la parte inferior, se muestra el aspecto de los cultivos en medio líquido en ausencia de sales.

Todos los mutantes obtenidos durante este trabajo serán sometidos a una caracterización exhaustiva en el futuro.

3.4.3. Obtención de mutantes antisentido de las sPPasas cloroplástica y mitocondrial de *C. reinhardtii*: intentos de clonación de los fragmentos de DNA genómico que contienen los genes para dichas proteínas

Además de la obtención de mutantes de la H⁺-PPasa, se planteó la posibilidad de la obtención de mutantes de antisentido y sobreexpresión de las otras dos pirofosfatasas conocidas existentes en *C. reinhardtii*, las sPPasas del cloroplasto y la mitocondria, con el fin de analizar las interacciones entre las tres enzimas encargadas de la hidrólisis de PPi en este organismo. Para la obtención de las construcciones requeridas se siguieron estrategias en dos pasos análogas a las expuestas anteriormente. Los fragmentos de cDNA se obtuvieron mediante una reacción de PCR sobre los clones de ESTs obtenidos del Kazusa Research Institute e identificados por búsqueda con BLAST en la base de datos de ESTs de *Chlamydomonas* (números de acceso: sPPasa cloroplástica, AV397541; sPPasa mitocondrial, AV390440). En el caso de la sPPasa bacteriana, la clonación se llevó a cabo en un plásmido pGEM-T, pero esta estrategia no tuvo éxito en el caso de la sPPasa cloroplástica, por lo que el fragmento de cDNA se llevó a un plásmido pBS SK⁺ digerido con la enzima *EcoRV*, que genera extremos romos, y desfosforilado para mejorar la eficiencia de la ligación. Desde estos plásmidos, los fragmentos de cDNA se llevaron, posteriormente, tanto a pAD35, como a pNia2. En el caso de la sPPasa mitocondrial, se obtuvieron dos construcciones análogas a las que se describen para la H⁺-PPasa en las Figuras 3.4.7 y 3.4.8, con la excepción de que no se utilizó para ello el plásmido pNia, sino pNia2, idéntico al anterior pero que posee un sitio único de restricción *EcoRI* en el sitio de clonación múltiple. Para la sPPasa cloroplástica, se obtuvo una construcción en pNia2 de modo análogo a la anterior, y una construcción en el mismo plásmido con dos copias del cDNA, una de ellas en el mismo sentido que el promotor del gen *nial* y la otra en sentido opuesto. Este plásmido se consiguió mediante digestión de la construcción anterior en pNia2 con *HindIII* y *EcoRI* y ligación del fragmento de cDNA obtenido del pBS original con estas mismas enzimas. Cultivos de *C. reinhardtii* de la estirpe 704 se transformaron con estas construcciones y la caracterización de los mutantes obtenidos será el objetivo de otra Tesis Doctoral. Cabe destacar, sin embargo, que el mutante 5-3, correspondiente a la transformación de *C. reinhardtii* con el plásmido que contiene el cDNA de la sPPasa mitocondrial en el plásmido pNia2, crecía normalmente en placas de

medio TAP con nitrato hasta la fase estacionaria (5 días), tras lo cual las células morían, mientras que se mantenían vivas en presencia de amonio.

Para la confección de plásmidos para la sobreexpresión de los genes de las sPPasas era necesario clonar los fragmentos de DNA genómico correspondientes, lo que se intentó con una estrategia análoga, una vez más, a la empleada para la clonación del fragmento de DNA genómico para la H⁺-PPasa: dado que las reacciones de PCR con oligos específicos para los extremos de los genes correspondientes presentaban un elevado número de bandas artefactuales, los productos de dicha reacción se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membranas de nylon, que se hibridaron con una sonda de DNA marcada radiactivamente, correspondiente a la secuencia codificante completa para cada uno de los genes de las sPPasas (Figura 3.4.14). Una vez identificados los fragmentos de DNA genómico buscados, se intentó llevar a cabo la clonación de los mismos en el plásmido pGEM-T[®]. Sin embargo, sólo fue posible la clonación del fragmento de DNA genómico correspondiente a la sPPasa mitocondrial, por lo que las construcciones para la obtención de transformantes de *C. reinhardtii* que sobreexpresen estas dos sPPasas no pudo lograrse antes del fin de esta Tesis Doctoral.

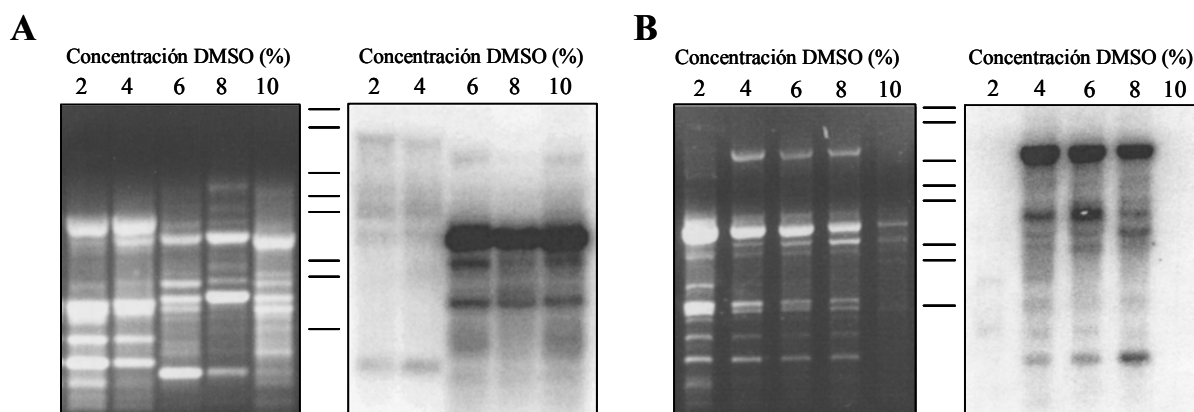


Figura 3.4.14: Identificación de los fragmentos de DNA genómico correspondientes a las sPPasas mitocondrial y cloroplástica de *C. reinhardtii*. Los productos de las reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos para cada una de las sPPasas y en presencia de concentraciones crecientes de DMSO, se sometieron a electroforesis y se transfirieron a filtros de membrana para su análisis por Southern Blot con sondas correspondientes a las ORFs completas de cada gen. Las posiciones de los patrones de peso molecular se indican mediante líneas: de arriba abajo, 5,1; 3,5; 2; 1,6; 1,3; 0,9; 0,83 y 0,56 kb. A) Resultados correspondientes a la sPPasa mitocondrial. La banda de aproximadamente 1,1 kb se clonó en un plásmido pGEM-T. B) Resultados correspondientes a la sPPasa cloroplástica. La banda de 2,2 kb intentó clonarse sin éxito en un plásmido de modo análogo a la banda anterior.

3.5. Obtención de anticuerpos policlonales contra la H⁺-PPasa

3.5.1. Expresión heteróloga y purificación de un polipéptido correspondiente al bucle hidrofílico de unión al PPI de la H⁺-PPasa dependiente de potasio de *Arabidopsis thaliana* (AVP1). Intento de obtención de un anticuerpo policlonal mono específico en conejo

Durante el transcurso de esta Tesis Doctoral, se planteó la obtención de un anticuerpo policlonal contra una H⁺-PPasa que permitiera llevar a cabo su identificación y cuantificación por métodos inmunocitoquímicos, especialmente en experimentos fisiológicos. Dado que la purificación de una proteína de membrana completa es un proceso complejo, se pensó inicialmente en la sobreexpresión en *E. coli* de un fragmento hidrofílico de la proteína que pudiera ser purificado con un alto rendimiento de manera relativamente simple. Distintas predicciones sobre la estructura terciaria de las H⁺-PPasas, que proponía la existencia de entre 14 y 16 segmentos transmembrana, habían sido publicadas hasta ese momento (Maeshima 2000, Nakanishi *et ál.* 2001). Asimismo, diversos estudios de inhibidores, comparación de secuencias y mutagénesis dirigida y al azar habían permitido identificar residuos implicados en la translocación de protones, la hidrólisis de PPI o el acoplamiento entre ambas actividades (revisado en Maeshima 2000). De este modo, se identificó entre los dominios de la proteína posiblemente involucrados en la hidrólisis de PPI, una región ácida localizada en el bucle hidrofílico *e* (localizado entre las regiones transmembrana 5 y 6) (Nakanishi *et ál.* 2001), que está considerado entre los más conservados entre las V-PPasas conocidas. Se diseñaron oligonucleótidos que amplificaron por PCR la secuencia de DNA que codifica para este bucle hidrofílico en la V-PPasa dependiente de K⁺ de la planta *Arabidopsis thaliana* y que poseían en sus extremos sitios de restricción artificiales *Bam*HI y *Pst*II, respectivamente. Este fragmento de 192 nt debía codificar para un pequeño polipéptido de aproximadamente 7 kDa. Tras amplificar el fragmento de cDNA correspondiente por PCR de alta fidelidad usando como molde el clon original obtenido del Doctor P.A. Rea de la Universidad de Pensylvania, EE.UU. (Sarafian *et ál.* 1992a), éste se clonó en el sentido adecuado en el plásmido pQE-9 (Qiagen), que posee un sitio de inicio de la traducción y una secuencia que codifica para un grupo de seis histidinas justo delante del sitio de clonación múltiple, flanqueado por sitios *Bam*HI y *Pst*II. De este modo, la inserción en fase de un fragmento de DNA en el

sitio *Bam*HI permite obtener una proteína con un grupo de seis histidinas en su extremo amino, y cuya expresión es inducible por Isopropil-tio- β -galactopiranosido (IPTG). La construcción obtenida, a la que se denominó pQEAVP, se introdujo en células de la estirpe XL1-Blue de *E. coli*. Dado que esta estirpe posee un fenotipo de superrepresión por *lac*I, fue necesario un tiempo largo en presencia de IPTG para observar la inducción de la síntesis del polipéptido. El protocolo final se describe en el apartado 2.1.3.2 de Materiales y Métodos. El tratamiento con IPTG produjo la inducción específica de un polipéptido en la fase soluble, pero cuya masa molecular aparente estaba en torno a 30 kDa, un valor muy distinto a los 7 kDa esperados. Sin embargo, se había demostrado anteriormente que la movilidad electroforética relativa de las proteínas puede disminuir al introducir en la secuencia un grupo de seis histidinas, siendo este efecto tanto mayor cuanto menor es el tamaño del polipéptido en cuestión (Xiong *et ál.* 2000; QIAexpress manual, Diagen). Teniendo en cuenta este hecho y dado que la inducción del polipéptido era muy clara, se decidió seguir adelante con la purificación mediante cromatografía en columnas “Hi-Trap Chelating” (Amersham-Pharmacia) de ion-quelante cargadas con Cu^{2+} . Cultivos de 50 ml se desarrollaron y trataron con IPTG como se indica en Materiales y Métodos. Los extractos celulares obtenidos se diluyeron hasta una concentración de proteína en torno a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se sometieron a cromatografía de afinidad por Cu^{2+} en columna. De esta forma, se obtuvo una fracción relativamente purificada del polipéptido, que se eluyó a una concentración de imidazol de 77 mM; sin embargo, un gran número de proteínas contaminantes también se eluyeron a esta baja concentración de imidazol, por lo que se decidió aislar el polipéptido de las fracciones eluidas de las columnas de ion-quelante mediante electroelución a partir de geles de poliacrilamida. Tras someter dichas fracciones a electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, éstos se tiñeron con azul de Coomassie (Figura 3.5.1) y la banda del polipéptido se cortó de los mismos con ayuda de una cuchilla. Para optimizar el procedimiento de electroelución, se aplicó a las bandas recortadas un campo eléctrico constante durante tiempos variables, tomando muestras que se corrían, una vez más, en geles de poliacrilamida de la misma concentración (Figura 3.5.1). La concentración de polipéptido electroeluido se estimó mediante absorbancia a 280 nm usando como referencia disoluciones de concentración conocida de lisozima, cuya masa molecular está en torno a 16 kDa. La preparación así obtenida se inyectó en un conejo con el fin de obtener un anticuerpo policlonal mediante

un protocolo de inmunización estándar. El anticuerpo obtenido reconoció en *E. coli* una proteína de un tamaño en torno a 30 kDa, mientras que no reconocía ninguna banda en membranas de levadura que expresaban distintas H^+ -PPasas tanto eucarióticas como procarióticas. Este resultado podría sugerir que el polipéptido correspondiente al putativo bucle hidrofílico de las H^+ -PPasas no tiene un carácter suficientemente antigénico para provocar una respuesta inmunológica en el conejo, apareciendo probablemente esta respuesta frente a una proteína de *E. coli* que habría co-purificado con nuestro polipéptido como contaminante minoritario y cuya antigenicidad sí habría sido significativa.

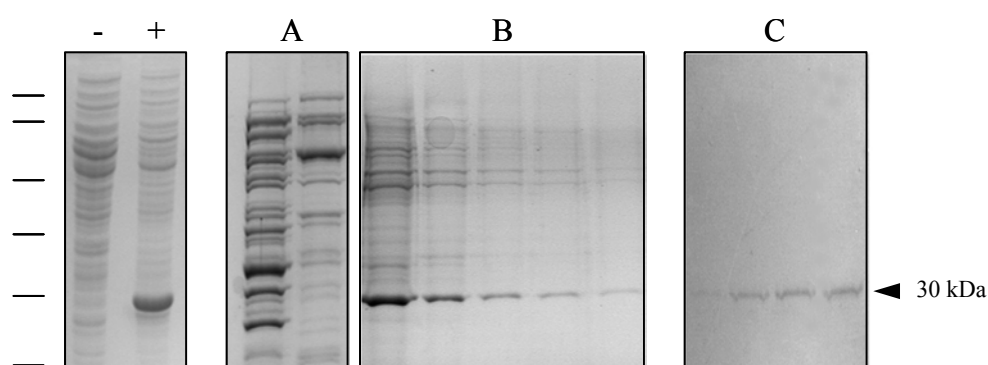


Figura 3.5.1: Purificación del polipéptido correspondiente al bucle hidrofílico *e* de unión a PPI de la H^+ -PPasa de *Arabidopsis thaliana* AVP1 mediante unión a columnas de ion-quelante cargadas con Cu^{2+} . Izquierda: extractos celulares de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pQEAVP, sin inducir (-) o inducidas con IPTG (+). A) Material no unido a la columna de ion-quelante durante la inyección de la muestra. B) Fracciones eluidas de la columna a una concentración de imidazol 77 mM. C) Las fracciones enriquecidas en el péptido deseado se sometían a electroforesis en gels de acrilamida, de los que se electroelúan posteriormente. En la Figura se muestran, de izquierda a derecha, los resultados de la electroelución durante 15 min, 30 min, 45 min y 1 h, respectivamente. La movilidad electroforética de los patrones de peso molecular se indica con líneas que corresponden, de arriba abajo, 98, 64, 50, 36, 30 y 16 kDa.

3.5.2. Expresión heteróloga y purificación de la H^+ -PPasa de *Thermotoga maritima* (TVP). Obtención de un anticuerpo policlonal mono específico en conejo

Tras el primer intento fallido de obtención de un anticuerpo, se pensó en la posibilidad de purificar una H^+ -PPasa completa. Durante el transcurso de esta Tesis Doctoral, nuestro grupo publicó la expresión heteróloga en levadura de la H^+ -PPasa de la bacteria hipertermofílica *Thermotoga maritima* (TVP); la caracterización bioquímica de esta proteína demostró que era la primera PPasa de membrana de origen procariótico estimulada por K^+ identificada hasta entonces (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001). En este

trabajo, se mostró que la proteína tiene una temperatura óptima en torno a 70°C, presenta resistencia a las proteasas de levadura y su termoestabilidad depende de la unión a cationes Mg^{2+} . Estas características convertían a esta proteína en una buena candidata para ser purificada por expresión heteróloga en *S. cerevisiae*, dado que su especial resistencia a distintos factores debería facilitar su separación de otras proteínas mesofílicas contaminantes. Por otro lado, los estudios filogenéticos de comparación de secuencias de aminoácidos mostraban que TVP aparecía consistentemente entre las H^+ -PPasas dependientes e independientes de potasio, de forma que, aunque parecía pertenecer a la primera de estas subfamilias, su secuencia no era excesivamente divergente de las segundas (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001). Por esta razón, cabría esperar que un anticuerpo policlonal contra TVP pudiera ser suficientemente versátil y reconociera a las H^+ -PPasas de ambos tipos.

Para la purificación de TVP se diseñó un oligonucleótido a partir del extremo 5' del gen que contenía además la secuencia codificante para un grupo de seis histidinas, con el fin de purificar TVP, una vez más, por unión a columnas de ion-quelante (Figura 3.5.2). Los fragmentos de PCR correspondientes a la ORF completa del gen *tpv*, obtenidos con el oligonucleótido anterior, se clonaron en el plásmido lanzadera pJR1, que posee el promotor de la galactoquinasa (*GAL1*) de *S. cerevisiae*, inducible por galactosa en ausencia de glucosa en el medio, y la casete *URA3* de este organismo (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001), dando el plásmido pHisTVP. Células de *S. cerevisiae* de la estirpe W303-1A, se transformaron con el plásmido pHisTVP seleccionándose los transformantes en placas de medio selectivo sin uracilo. La expresión de la proteína en los transformantes crecidos en galactosa se comprobó mediante electroforesis de las fracciones de membrana de las células cultivadas en glucosa y galactosa (Figura 3.5.2) y realizando medidas de actividad H^+ -PPasa a 70°C. Los valores de actividad encontrados en las membranas totales (en torno a $0,15 \mu\text{mol PPI}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) eran comparables a los encontrados para la proteína expresada heterológamente sin el grupo de seis histidinas (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001). Tras algunos experimentos preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio, el trabajo de purificación se llevó a cabo en el grupo del Profesor Michael Gjedde Palmgren de The Royal Veterinary and Agricultural University (KVL), en Copenhague, Dinamarca.

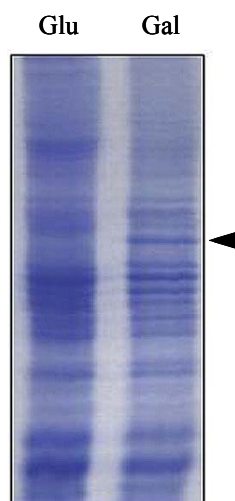


Figura 3.5.2: Expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* de la H⁺-PPasa de *Thermotoga maritima* fusionada a un grupo de seis histidinas en su extremo amino-terminal. El gen *tpv* se amplificó por PCR usando un oligonucleótido para el extremo 5' del mismo que contenía un grupo de seis histidinas y un sitio de restricción artificial *SalI*, para permitir su clonación en el plásmido pJR1. Las levaduras se cultivaron en medio con glucosa (Glu) hasta saturación y, a continuación, se inocularon en medio rico con galactosa (Gal), incubándose a 30°C durante 13 h, tras lo cual, se añadió un suplemento del 2% de galactosa y se incubó durante 4 h más. Las membranas totales se resuspendieron en un tampón adecuado y fracciones de 40 µg se sometieron a electroforesis desnaturizante y tinción con azul de Coomassie. Los patrones de peso molecular se indican con líneas: de arriba abajo, 119, 98, 57 y 38 kDa.

5'-TTTGTTCGACATGCATCATCATCATCATATGTATGTGGCTGCTCTTTTC-3'
 Sal I M H H H H H H M Y V A A L F

Para la purificación de la proteína se seleccionó al azar uno de los clones idénticos que expresaban TVP con el grupo de seis histidinas en su extremo amino-terminal. Las membranas obtenidas a partir de células inducidas en medio con galactosa (ver apartado 2.1.4.3) se sometieron a análisis por Western Blot con un anticuerpo comercial contra el grupo de histidinas (“Anti-pentaHis”, Qiagen), pero no pudo observarse ninguna banda correspondiente a la proteína deseada. Sin embargo, dado que dichas membranas presentaban actividad H⁺-PPasa dependiente de K⁺ a 70°C, lo que es una prueba concluyente de la expresión heteróloga de TVP, se pensó que el resultado negativo de la detección inmunológica podía deberse a varios factores, entre ellos, a la baja antigenicidad del grupo de seis histidinas, lo que hace que el anticuerpo comercial sólo contra este epítipo no sea demasiado eficiente. Por ello, se decidió, por una parte proseguir con la purificación y, por otra, introducir un epítipo RGS-H₆ en el extremo amino de la proteína, mucho más antigénico que el grupo de seis histidinas aisladas. La obtención de las nuevas construcciones se discute al final de este capítulo.

Como primer paso del aislamiento de TVP hubo que seleccionar un detergente para solubilizarla, paso obligado para la purificación de una proteína intrínseca de membrana. En nuestro caso, se probó inicialmente la solubilización de fracciones totales de membranas de levadura, obtenidas a partir de células transformadas con nuestros plásmidos y cultivadas en galactosa, con el detergente no iónico n-dodecil-β-D-glucopiranosido (dodecilmaltósido, DDM) en tres proporciones distintas proteína total:detergente, 1:1, 1:3 y 1:5, siendo las concentraciones finales de detergente en las muestras 0,15%, 0,45% y 0,75% (p/v), respectivamente. Todos los ensayos de

solubilización realizados se llevaron a cabo en un volumen final de 400 μl con 600 μg de proteína en total. Para ello, las muestras de membrana a solubilizar se diluyeron en tampón de dilución hasta un volumen final de 300 μl . Ya que la aplicación de disoluciones concentradas de detergente a las muestras a solubilizar puede provocar la inactivación de algunas proteínas (le Maire *et ál.* 2000), se preparaba una disolución 4x de DDM, de la cual se añadían 100 μl a cada una de las preparaciones de membrana anteriores. Tras cada ensayo de solubilización, las muestras se llevaron a una ultracentrífuga de aire Beckman modelo Airfuge en tubos de 500 μl de capacidad. Tras centrifugar 10 min a 25 psi, se tomaron los sobrenadantes y se ensayó en ellos la actividad PPasa a 70°C, según el protocolo habitual. En los primeros ensayos, las solubilizaciones se llevaron a cabo durante 30 min a temperatura ambiente y en las tres concentraciones de detergente indicadas anteriormente, encontrándose una proporción adecuada proteína:detergente de 1:1 (Figura 3.5.3.A). Además se observó que se producía una activación de la proteína durante el proceso de solubilización, dado que este proceso aumentaba el número de unidades de actividad PPasa total. Sin embargo, esta activación no era un fenómeno constante, ya que las muestras que habían sido conservadas a -80°C y descongeladas más de una vez para los experimentos de solubilización no la sufrían, como se observa en los datos de las figuras 3.5.5 y 3.5.8. La purificación de bombas de protones de organismos termofilicos expresadas heterológamente en levadura se había llevado a cabo anteriormente (Morsomme *et ál.* 2002), incluyéndose un paso de tratamiento a alta temperatura que aprovechaba la termoestabilidad de la proteína deseada para eliminar proteínas de la levadura no deseadas y sensibles al calor. Dado que TVP es resistente al calor hasta prácticamente 80°C, se decidió probar la solubilización en presencia del detergente a 75°C. Para este segundo proceso, tanto la muestra diluída como el detergente se pre-calentaban a 75°C durante 5 min antes de llevar a cabo el ensayo. Este tratamiento permitió una purificación de la proteína de casi 5 veces en un solo paso. En este caso, la concentración óptima de detergente resultó ser de 1:3 (0,45%), en contraste con la proporción 1:1 (0,15%) óptima para la solubilización a temperatura ambiente. Al igual que lo observado a temperatura ambiente, a 75°C también se produjo una activación de la proteína, recuperándose un número de unidades de actividad PPasa comparable en ambos casos. Los valores de actividad de estos ensayos preliminares se recogen en la figura 3.5.3.

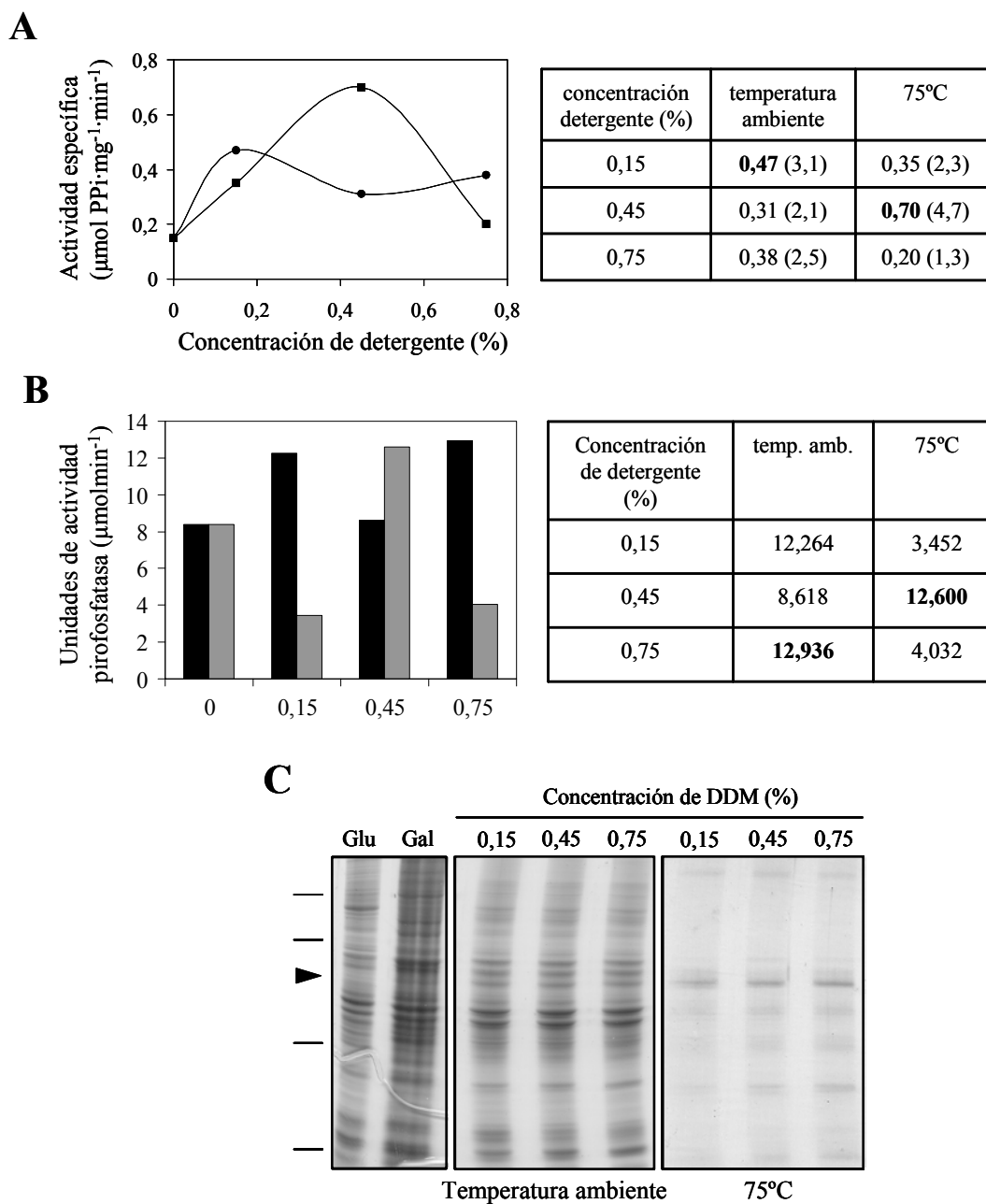


Figura 3.5.3: Solubilización de TVP a distintas temperaturas. Membranas totales de levadura, a razón de 600 µg de proteína total, se solubilizaron en presencia de distintas concentraciones de detergente DDM, a temperatura ambiente y a 75°C durante 30 min. A) Derecha: valores de actividad específica obtenidos para las muestras solubilizadas. El valor de actividad específica para las membranas sin solubilizar fue de 0,15 µmol PPI·mg⁻¹·min⁻¹. Entre paréntesis se indica el grado de purificación (número de veces). Izquierda: representación gráfica de dichos valores: ●, temperatura ambiente; ■, 75°C. B) Representación gráfica de la recuperación de actividad total PPasa debida a TVP en los procesos de solubilización a las dos temperaturas a partir de 1 l de cultivo de levadura. Negro: temperatura ambiente; gris: 75°C. La actividad total de las muestras sin solubilizar fue de 8,400 µmol PPI·min⁻¹. Los datos numéricos para las distintas solubilizaciones se recogen en la tabla de la derecha. En negrita se marcan los valores máximos de actividad obtenidos para cada temperatura. C) Electroforesis de proteínas para cada una de las fracciones anteriores: Glu, membranas totales de células crecidas en glucosa; Gal, células inducidas en galactosa. Las líneas indican las bandas correspondientes a los patrones de peso molecular: 119, 98, 57 y 38 kDa.

El proceso de solubilización a alta temperatura permitió una purificación de la proteína de casi 5 veces, mientras que la mayor purificación obtenida a temperatura ambiente estuvo en torno a 3 veces. Un proceso en dos pasos consistente en la solubilización de la proteína a temperatura ambiente y posterior calentamiento a 75°C durante 30 min no permitió mejorar el grado de purificación de la proteína, dado que las muestras parecían perder actividad en este caso, por lo que se optó por mantener el procedimiento en un solo paso de solubilización a alta temperatura.

El siguiente parámetro a optimizar fue el tiempo de solubilización. Para ello se prepararon las muestras de un modo análogo al descrito anteriormente y se incubaron en presencia del detergente durante tiempos variables, desde 15 hasta 45 minutos (Figura 3.5.4). Una vez más, las muestras se centrifugaron en una ultracentrífuga de aire y se midió la actividad PPasa en los sobrenadantes. Dado que la proporción óptima de detergente había variado al probar dos temperaturas distintas de trabajo, se decidió comprobar en experimentos sucesivos las tres concentraciones de detergente iniciales.

Los experimentos llevados a cabo en nuestro grupo con la proteína TVP expresada heterológamente en levadura (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001), habían demostrado que la termoestabilidad de la proteína es dependiente de su interacción con Mg^{2+} . De este modo, cuando la proteína se obtenía en presencia de EDTA, era necesaria la adición de Mg^{2+} (en concentraciones superiores a las de sustancia quelante), durante los calentamientos realizados para obtener las medidas de actividad PPasa, con el fin de evitar la inactivación de TVP. Por ello, el tampón de dilución en el que se resuspendían las membranas totales al ser aisladas contenía una proporción algo mayor de Mg^{2+} que de EDTA, siendo la concentración final del primero en los experimentos de solubilización de 1 mM. En nuestro siguiente experimento decidimos ensayar la solubilización de las membranas en presencia de concentraciones crecientes de Mg^{2+} y a las tres concentraciones de detergente habituales (Figura 3.5.5).

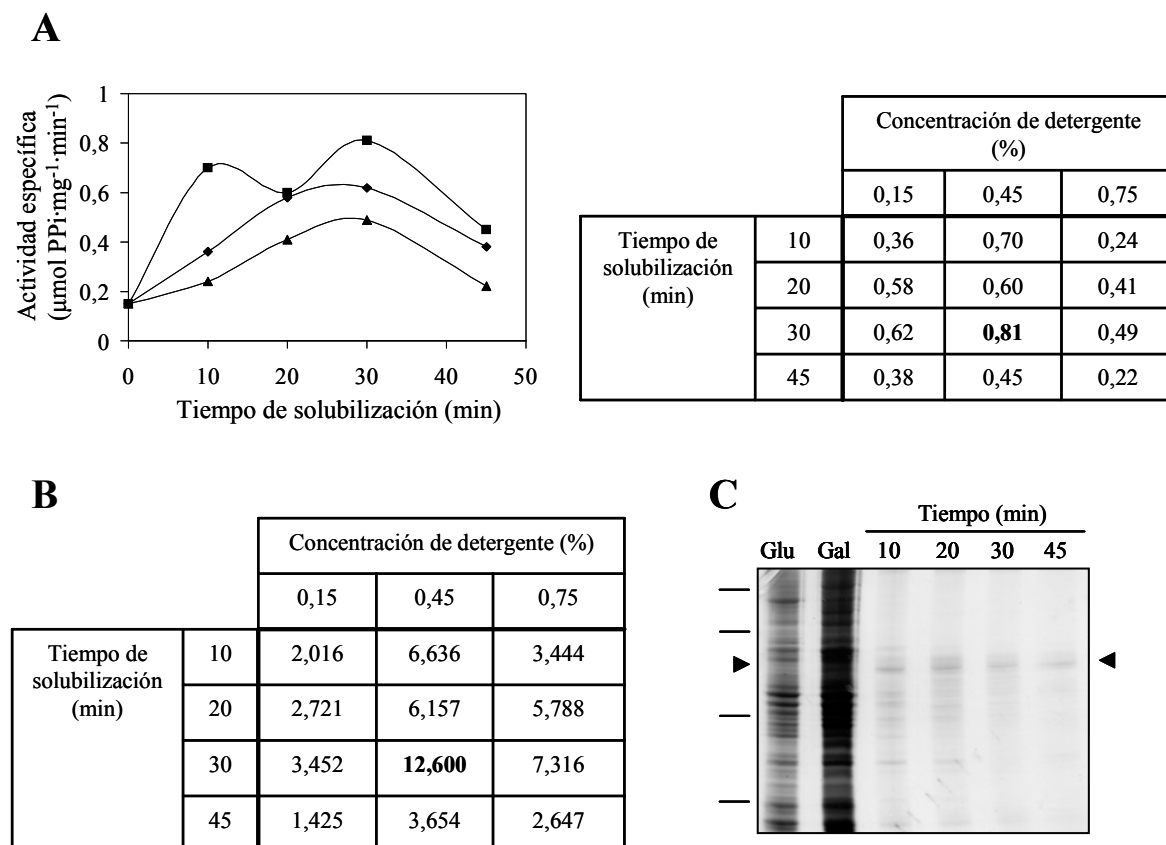


Figura 3.5.4: Solubilización de TVP a 75°C durante distintos periodos de tiempo. Muestras de 600 µg de proteína total se solubilizaron en distintas concentraciones de detergente durante tiempos variables. A) Derecha: valores de actividad específica obtenidos para las muestras solubilizadas. El valor de actividad específica para las membranas sin solubilizar fue de 0,15 µmol PPI·mg⁻¹·min⁻¹. Izquierda: representación gráfica de dichos valores: ♦, 0,15%; ■, 0,45%; ▲, 0,75%. B) Unidades de actividad PPasa recuperadas en cada caso a partir de 1 l de cultivo de levadura. La actividad total de las muestras sin solubilizar fue de 8,400 µmol PPI·min⁻¹. En negrita se marca el máximo valor obtenido. C) Resultado de la electroforesis desnaturante y tinción con azul de Coomassie de 50 µg de proteína de membranas totales y 5 µg de las fracciones solubilizadas a distintos tiempos. Las líneas indican la posición de las bandas de los patrones de peso molecular: 119, 98, 57 y 38 kDa.

Una vez más, la concentración óptima de detergente era del 0,45%, independiente de la concentración de Mg²⁺ en el medio. El aumento de la concentración de ion no produjo una mejora en el proceso de purificación dado que se solubilizaban un mayor número de proteínas contaminantes.

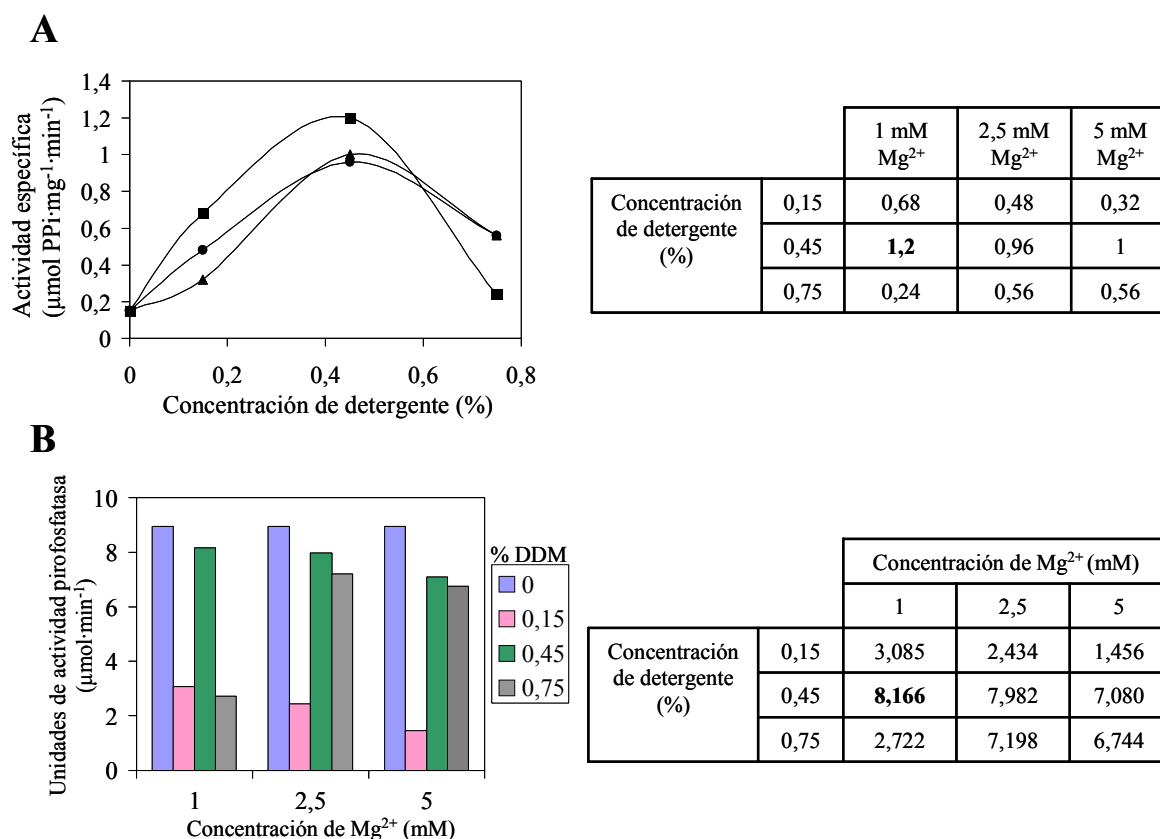


Figura 3.5.5: Solubilización de TVP en presencia de distintas concentraciones de Mg²⁺. Las membranas totales se solubilizaron en distintas concentraciones de detergente a 75°C durante 30 min y en presencia de concentraciones crecientes de MgCl₂. A) Derecha: valores de actividad específica. El resultado obtenido para las membranas totales sin solubilizar fue de 0,16 µmol PPI·mg⁻¹·min⁻¹. Izquierda: representación gráfica de dichos valores: ■, muestras solubilizadas en 1 mM Mg²⁺; ●, 2,5 mM Mg²⁺; ▲, 5 mM Mg²⁺. B) Actividad PPasa total recuperada durante la purificación a partir de 1 l de cultivo de levadura. El valor de esta actividad en las membranas totales fue de 8,960 µmol PPI·min⁻¹. En la tabla de la derecha se indican los valores obtenidos para las muestras solubilizadas en presencia de magnesio. En la leyenda se recoge la relación de colores con respecto a la concentración de detergente (% p/v) en la solubilización.

En los procesos de solubilización de algunas proteínas puede resultar favorable la presencia de los ligandos o cofactores de las mismas para su recuperación en forma activa (Bowie 2001). Por ello, se llevaron a cabo distintas pruebas para solubilizar TVP en presencia de sus tres ligandos principales, esto es, PPI, Mg²⁺ y K⁺, y distintas combinaciones de todos ellos (Figura 3.5.6).

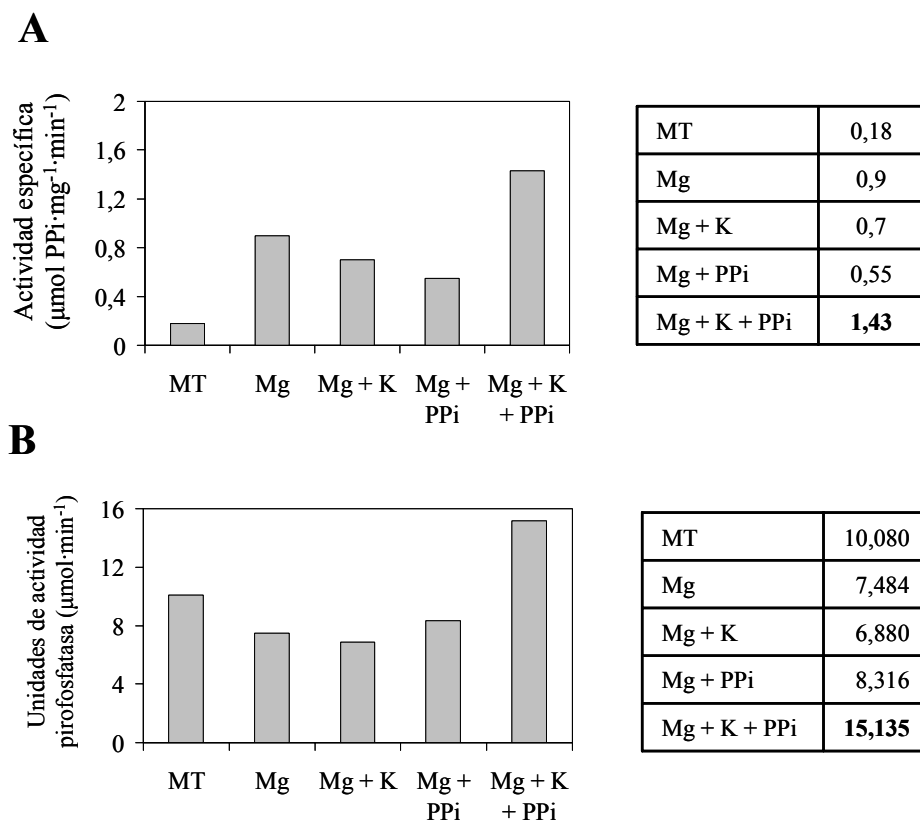


Figura 3.5.6: Solubilización de TVP en presencia de distintas combinaciones de ligandos. Las membranas totales (MT) se solubilizaron a 75°C con un 0,45% de detergente DDM durante 30 min, en presencia de: Mg, 1 mM MgCl₂; Mg+K, 1 mM MgCl₂ + 1 mM KCl; Mg+PPI, 1 mM MgCl₂ + 1 mM Na₂PPi; Mg+K+PPI, 1 mM MgCl₂ + 1 mM KCl + 1 mM Na₂PPi. A) Actividad específica de las muestras. Los valores numéricos se indican en la tabla. B) Derecha, valores de actividad total PPasa obtenidos a partir de 1 l de cultivo de levadura. Izquierda, representación comparativa de dichos valores. La línea discontinua separa las muestras sin solubilizar (MT) de las solubilizadas en presencia de distintas concentraciones de ligandos.

Se obtuvo como resultado que una mezcla 1 mM MgCl₂, 1 mM KCl y 1 mM PPI, permitía la solubilización en una forma más activa, aunque la variación en la cantidad de TVP o de proteínas contaminantes solubilizadas no parecía variar en gran medida, según se comprobó por tinción con azul de Coomassie de las fracciones solubilizadas sometidas a electroforesis (no mostrado). Es importante resaltar que, como se expuso anteriormente, la presencia de Mg²⁺ es necesaria para evitar la inactivación de la proteína durante los calentamientos y, por tanto, en todos los experimentos se mantuvo una concentración 1 mM de este ion. La presencia de la mezcla de ligandos anterior en el medio de solubilización permitió una purificación de la proteína de 8 veces.

Por otro lado, se decidió comprobar el efecto del lavado de las membranas que expresaban TVP con distintas sales en un paso previo a la solubilización (Figura 3.5.7).

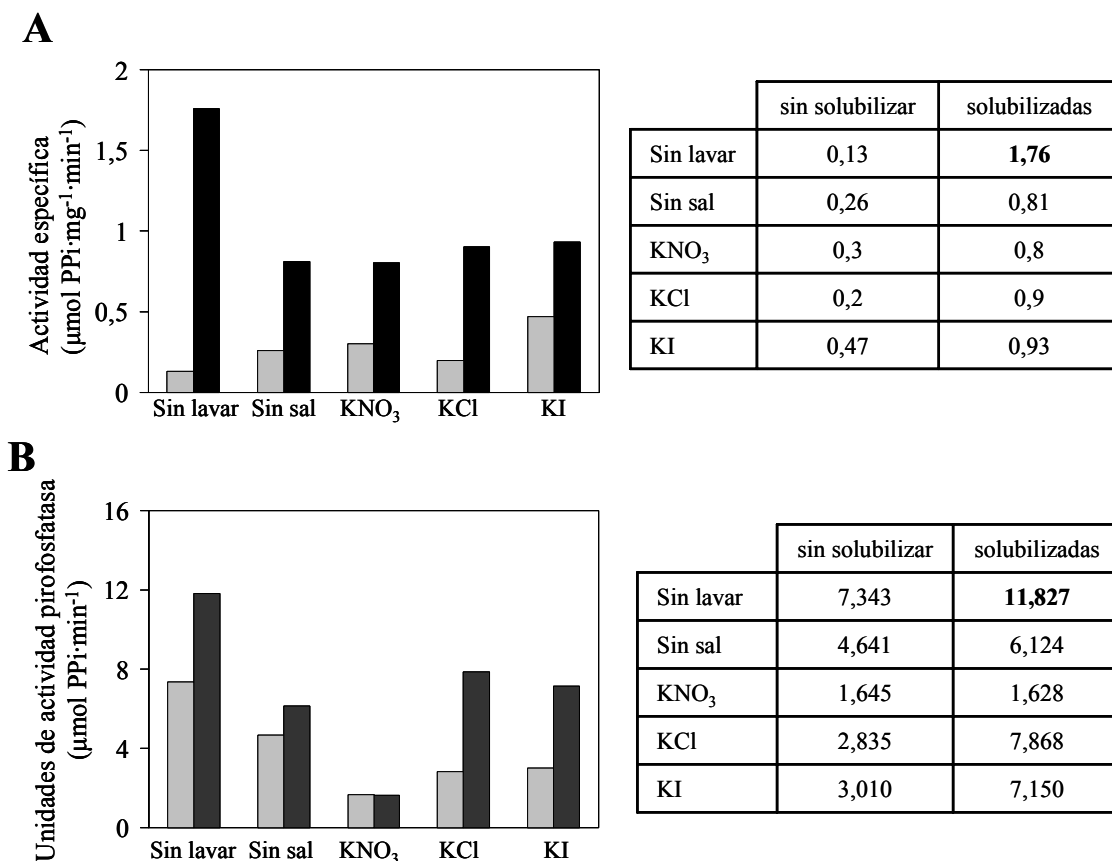


Figura 3.5.7: Efecto del lavado de las membranas totales sobre la solubilización de TVP. Tras el aislamiento de las membranas totales (sin lavar), éstas se lavaron con tampón GTED20 (sin sal) o el mismo tampón suplementado con una concentración 1,5 M de las sales indicadas. A) Representación gráfica de la actividad específica obtenida para las muestras antes y después de la solubilización. Los datos numéricos se indican en la tabla de la derecha. Columnas grises, actividades específicas en las membranas sin solubilizar; columnas negras, actividad específica de las membranas solubilizadas con un 0,45% de DDM a 75°C durante 30 min. B) Unidades de actividad PPasa total en las distintas muestras obtenidas a partir de 1 l de cultivo. Columnas rayadas y punteadas, igual que en el apartado A. La tabla de la derecha indica los valores obtenidos.

Los agentes caotrópicos varían la solubilidad de las moléculas en un medio acuoso debido a los procesos de hidratación, fundamentalmente, de los aniones que los forman. El efecto sobre las proteínas es específico de cada una de ellas y del anión en cuestión. Esto permite la solubilización en el medio acuoso de proteínas que se hayan asociadas en distintos grados a las membranas, mejorando el grado de purificación de las proteínas intrínsecas de membrana. En nuestro caso, como puede observarse en la Figura 3.5.7.B, estos procesos resultaron ser muy poco eficientes, dado que se producía la pérdida de bastante cantidad de material sin que ninguno de ellos mejorara el grado de purificación de la proteína una vez solubilizada.

El último intento de purificación adicional previo a la incubación de las muestras con la matriz de ion-quelante consistió en un gradiente de sacarosa en un solo paso,

utilizado con el fin de eliminar las membranas mitocondriales. Para ello, 2 ml de membranas totales (aproximadamente 30 mg de proteína total) resuspendidas en tampón de dilución, se diluían a la mitad con este mismo tampón y se colocaban sobre 5 ml de una disolución de sacarosa al 53%. A continuación, se llevaron a cabo ultracentrifugaciones de 6 ó 16 h y se recogieron las membranas de la parte superior del gradiente. Este proceso conseguía una purificación de la proteína de algo más de 2 veces previa a la solubilización (Figura 3.5.8) cuando las membranas se centrifugaban durante 16 horas. Cuando estas muestras se solubilizaban durante 1 h a 70°C en presencia de una concentración de detergente del 0,45%, se llegaba a conseguir una purificación de 10 veces. Sin embargo, el protocolo habitual de solubilización a 75°C durante 30 min resultó en una inactivación de la proteína, de modo que la actividad específica recuperada en estas condiciones era menor que la obtenida al solubilizar las membranas totales a esa temperatura. Si las membranas se centrifugaban durante sólo 6 horas, sin embargo, la solubilización era, una vez más, más eficiente a 75°C que a 70°C. Una vez más, al igual que en el caso de los lavados de las membranas con distintos agentes caotrópicos, se producían grandes pérdidas de material, por lo que se desecharon ambos procedimientos para el protocolo definitivo, que quedó establecido en un solo paso de solubilización a 75°C durante 30 min, a una concentración de DDM del 0,45% en un volumen final de 400 µl y con concentraciones en el medio 1 mM de MgCl₂, KCl y Na₂PPi.

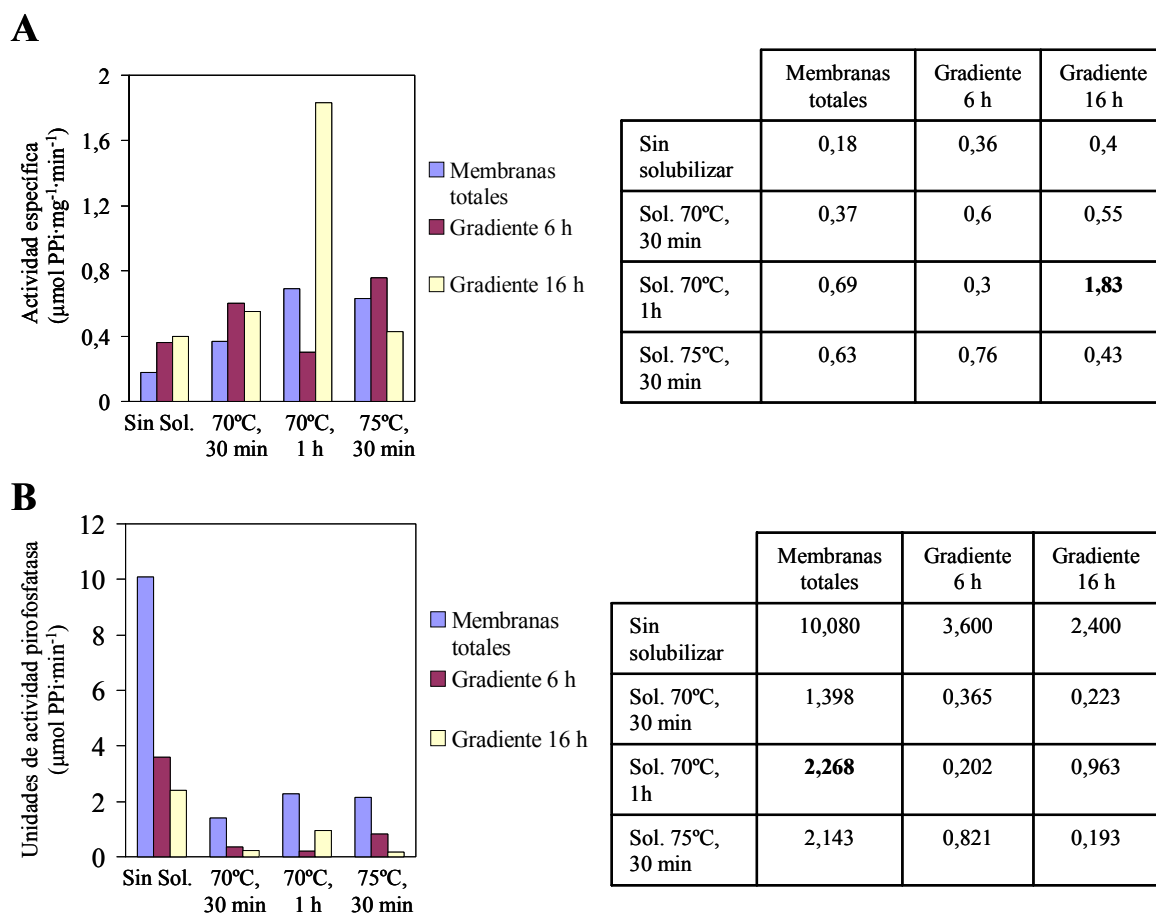


Figura 3.5.8: Enriquecimiento de membranas en TVP mediante gradientes de sacarosa en un paso y solubilización a distintas temperaturas y tiempos. Las membranas totales sin lavar se sometieron a ultracentrifugación (30000xg) durante 6 ó 16 h en un gradiente de sacarosa en un solo paso (53%) para eliminar las membranas mitocondriales. Las muestras recuperadas de la parte superior del gradiente se solubilizaron a 70°C durante 30 min ó 1 h, ó a 75°C durante 30 min. A) Actividad específica de las distintas muestras. Los valores obtenidos se muestran en la tabla. B) Unidades de actividad total PPasa en las muestras antes y después de la solubilización, a partir de 1 l de cultivo de levadura inicial.

Todas las experiencias llevadas a cabo hasta este punto se habían realizado en un tampón Tris-HCl a pH 7,5. Sin embargo, los transportadores de membrana suelen solubilizarse en forma activa con más facilidad a pH en torno a 6,5, por lo que se probó a utilizar en la solubilización un tampón MES a este pH. Además, este cambio de tampón era necesario para proceder a procesar las muestras mediante cromatografía en columnas de ion-quelante cargadas con Ni^{2+} , dado que el tampón Tris interfiere con la unión de las proteínas a la matriz en este tipo de cromatografía. El tampón usado era análogo al descrito como tampón de dilución con la única salvedad de la sustitución del tampón Tris por MES. Este proceso permitió obtener un grado de purificación para la proteína tras la solubilización habitual de 26 veces en un solo paso (Figura 3.5.9).

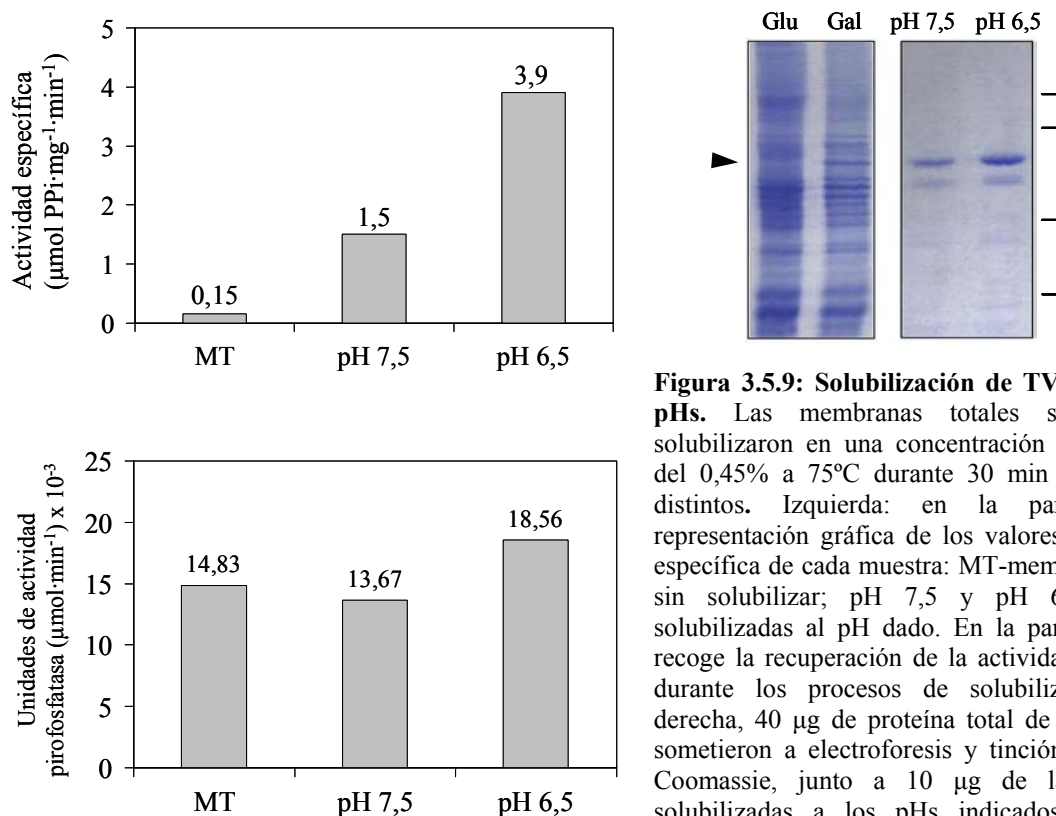


Figura 3.5.9: Solubilización de TVP a distintos pHs. Las membranas totales sin lavar se solubilizaron en una concentración de detergente del 0,45% a 75°C durante 30 min y a dos pHs distintos. Izquierda: en la parte superior, representación gráfica de los valores de actividad específica de cada muestra: MT-membranas totales sin solubilizar; pH 7,5 y pH 6,5, muestras solubilizadas al pH dado. En la parte inferior se recoge la recuperación de la actividad total PPasa durante los procesos de solubilización. A la derecha, 40 µg de proteína total de membrana se sometieron a electroforesis y tinción con azul de Coomassie, junto a 10 µg de las fracciones solubilizadas a los pHs indicados. Las líneas indican la posición de las bandas correspondientes a los patrones de peso molecular: 119, 98, 57 y 36 kDa.

Una vez conseguidas fracciones solubilizadas de TVP relativamente puras, y a pesar de que no había podido detectarse inmunológicamente la presencia del grupo de seis histidinas en el extremo amino terminal de la proteína, se decidió intentar un mayor grado de purificación por cromatografía de ion-quelante. En este caso, las muestras se incubaron con una matriz cargada con Ni²⁺, según se describe en el apartado 2.6.1.2 de Materiales y Métodos. Aunque la proteína que consiguió eluirse de la columna estaba altamente purificada, la mayor parte de la misma no se unía a la matriz, lo que parecía confirmar la ausencia del dominio de histidinas (Figura 3.5.10.A). La proteína se reconstituyó en presencia de asolecitina, demostrándose que las fracciones eluidas poseían una elevada actividad específica, lo que resultaba en una purificación total de 59 veces respecto a las membranas iniciales (Figura 3.5.10.B).

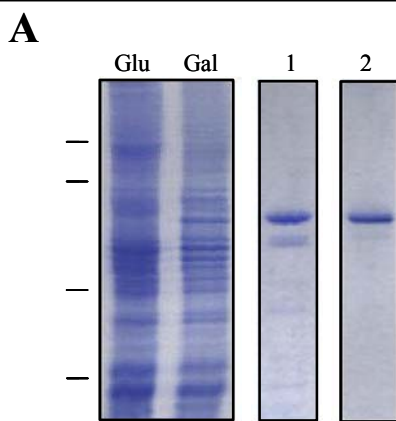


Figura 3.5.10: Purificación de la H⁺-PPasa de *Thermotoga maritima* en dos pasos. A) Electroforesis de proteínas de muestras tomadas a lo largo del proceso. A la izquierda, membranas totales de células cultivadas en glucosa (Glu) o inducidas en galactosa (Gal). 1) Primer paso: solubilización a 75°C durante 30 min en un 0,45% de DDM y a pH 6,5. 2) Segundo paso: cromatografía en columnas de ion-quelante cargadas con Ni²⁺. La cantidad de proteína cargada en el gel corresponde al 1/10 del eluato. B) Valores de actividad total y específica y grado de purificación de TVP durante el proceso en dos pasos. Los valores de actividad total se dan para 1 l de cultivo de levadura. La mayor parte de la proteína no se unió a las columnas de Ni²⁺, resultando en la pérdida de la mayor parte de la actividad total.

B

	Actividad específica ($\mu\text{mol PPI}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Grado de purificación	Unidades de actividad total ($\mu\text{mol PPI}\cdot\text{min}^{-1}$)
Membranas totales	0,15	--	14,830
Solubilización pH 6,5	3,9	26	18,560
Ni-NTA	8,9	59	0,061

A pesar de que esta proteína no podía aislarse usando columnas de ion-quelante, para la obtención de un anticuerpo policlonal en conejo, se decidió solubilizarla y someterla a electroforesis, para posteriormente cortar el fragmento del gel que contuviera TVP y extraer la proteína de la acrilamida mediante un procedimiento de "difusión pasiva" (apdo. 2.6.4). El anticuerpo así obtenido permitió detectar la H⁺-PPasa en fracciones de membrana de levaduras que expresaban distintas proteínas dependientes e independientes de K⁺ de plantas (*Arabidopsis thaliana*, AVP1 y AVP2) y protozoos parásitos (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*) (Pérez-Castiñeira *et ál.* sin publicar), si bien presentaba bastante hibridación inespecífica (Figura 3.5.11).

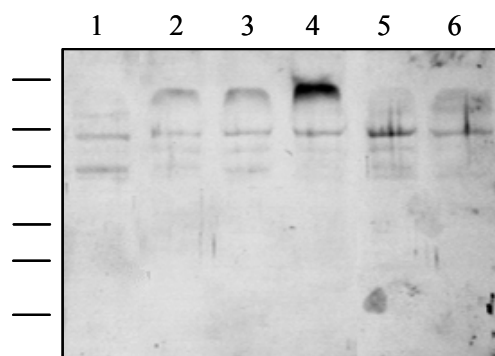


Figura 3.5.11: Análisis por Western Blot de la inmunodetección cruzada por el anticuerpo contra la H⁺-PPasa de *Thermotoga maritima* con distintas H⁺-PPasas dependientes e independientes de K⁺. Membranas de levaduras que expresaban heterológicamente H⁺-PPasas de distintos organismos (a razón de 100 μg de proteína por calle) se sometieron a análisis por Western Blot usando el anticuerpo obtenido contra TVP. De izquierda a derecha: 1, control negativo; 2 y 3, AVP1 (isoforma dependiente de K⁺ de *A. thaliana*); 4, *Toxoplasma gondii*; 5, *Trypanosoma cruzi*; 6, AVP2 (isoforma independiente de K⁺ de *A. thaliana*). La flecha indica la posición de la banda de inmunodetección correspondiente a las respectivas H⁺-PPasas. Las líneas indican las posiciones de los marcadores de peso molecular; de arriba a abajo, 98, 57, 48, 37, 30 y 20 kDa.

Con el fin de comprobar la posibilidad de eliminar, al menos en parte, la hibridación inespecífica presentada por el anticuerpo obtenido, una muestra de aproximadamente 8 ml de antisuero, extraída tras la segunda inmunización, se incubó con filtros de membrana que contenían, aproximadamente, 1 mg proteína total de membrana de levadura crecida en glucosa. La incubación se llevó a cabo 4°C durante 48 horas, tras lo cual, se limpió la membrana y volvió a repetirse la incubación durante 24 horas más. El análisis por Western Blot de muestras que contenían membranas totales de levadura que expresaban TVP con el antisuero original y el antisuero "purificado" (en dilución 1/2500), demostró que esta estrategia permite eliminar una buena parte de la hibridación inespecífica, si bien probablemente sean necesarias varias rondas más de incubación con proteína total de levadura para eliminar dicha hibridación completamente (Figura 3.5.12). Este procedimiento se usará también para "limpiar" el anticuerpo obtenido en el exanguinado final de la inmunización.

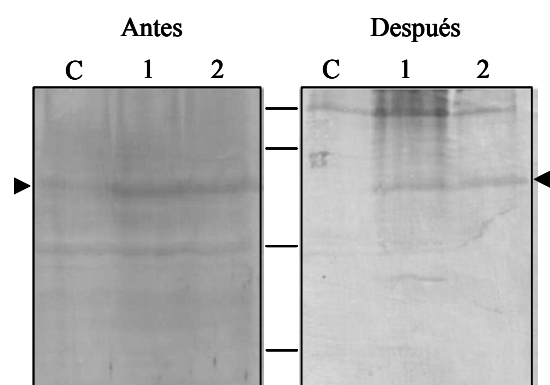


Figura 3.5.12: Eliminación parcial de la hibridación inespecífica del anticuerpo contra la H^+ -PPasa de *Thermotoga maritima*. El antisuero correspondiente a la segunda inmunización se incubó con filtros de membrana que contenían cerca de 1 mg de proteína total de levadura. En la Figura se muestra el análisis por Western Blot de fracciones de membrana de levaduras transformadas con un plásmido vacío (C) o con dos construcciones de DNA que contenían el gen para la H^+ -PPasa de *T. maritima* en el mismo plásmido (aprox. 100 μ g de proteína por calle), antes y después de la incubación. Los patrones de peso molecular se marcan con líneas. De arriba a abajo, 98, 57, 37 y 29 kDa

Como se ha expuesto al inicio de este apartado, el grupo de seis histidinas en el extremo amino terminal de la proteína TVP no había podido detectarse inmunológicamente, hecho que podía deberse a diversos factores: 1) a la baja antigenicidad del grupo de seis histidinas, que dificulta el reconocimiento por parte del anticuerpo comercial, por lo que se decidió, por una parte, seguir adelante con la purificación, como ya se ha expuesto, y, por otra, preparar nuevas construcciones que poseyeran un motivo RGS- H_6 en su extremo amino, dado que este epítipo es mucho más antigénico que el grupo aislado de seis histidinas (Figura 3.5.13, oligonucleótido 3); 2) a un procesamiento de la proteína en su extremo amino terminal, por lo que se intentó

conseguir construcciones que contuvieran el grupo de histidinas en el extremo carboxilo (Figura 3.5.13, oligonucleótido 2) ; 3) a un problema en el diseño del oligonucleótido usado para obtener la proteína de fusión, dado que éste contenía dos codones de inicio de la traducción, uno antes y otro justo después de la secuencia de seis histidinas, lo que podría dar lugar a la síntesis de dos proteínas distintas en el sistema heterólogo (Figura 3.5.13, oligonucleótido 1). Para solventar este posible problema, el nuevo oligonucleótido con el epítipo RGS-H₆ contendría sólo una secuencia ATG en su extremo 5' (Figura 3.5.13, oligonucleótido 3).

oligonucleótido 1

5'-TTTGTGACATGCATCATCATCATCATCATATGTATGTGGCTGCTCTTTTC-3'

Sal I M H H H H H H M Y V A A L F

oligonucleótido 2

5'-AAACACGTTTCACCTGTTCTGGAGGACACCATCACCATCACCATTGAACTAGTAAA-3'

K H V H L F G G H H H H H H * Spe I

oligonucleótido 3

5'-TTTGTGACATGCGAGGATCACATCATCATCATCATCATTATGTGGCTGCTCTTTTC-3'

Sal I M R G S H H H H H H Y V A A L F

Figura 3.5.13: Oligonucleótidos empleados en la obtención de las distintas versiones de la proteína TVP para su expresión heteróloga en levadura y purificación por unión a columnas cargadas con Ni²⁺. El primer oligonucleótido contenía un grupo de seis histidinas entre dos codones de inicio de la traducción. Las flechas indican las secuencias de los extremos amino terminales de cada una de las dos posibles proteínas sintetizadas en el sistema heterólogo. En todos los casos, el grupo de seis histidinas se indica mediante una caja y la secuencia de los sitios de restricción artificiales usados para la clonación se encuentran subrayadas. El oligonucleótido 2 se utilizó para introducir un grupo de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal de TVP. El motivo RGS introducido en el extremo 5' del oligonucleótido 3 para obtener un epítipo fácilmente detectable inmunológicamente en el extremo amino terminal de la proteína se señala dentro de un círculo.

Los oligonucleótidos diseñados se utilizaron como cebadores en reacciones de PCR de alta fidelidad con el clon de *typ* original (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001) como molde. Los fragmentos amplificados, se digirieron con los sitios de restricción incorporados en los extremos de los oligonucleótidos (*SalI* para el extremo 5' del gen y *SpeI* para el extremo 3') y se ligaron al plásmido pRS1024, al que se habían incorporado artificialmente dichos sitios de restricción en el sitio único de clonación *XhoI*. Este plásmido posee el promotor constitutivo del gen que codifica para la H⁺-ATPasa de la

membrana plasmática de levadura (*PMA1*) que, además, se regula positivamente por glucosa. Debido a problemas técnicos, la obtención de estas construcciones resultó una labor complicada y no pudieron obtenerse aquellas con el grupo de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal antes de la conclusión de esta Tesis Doctoral. La nueva construcción con la secuencia que codifica el epítipo RGS-H₆ en el extremo amino terminal de TVP, denominada pRGS-TVP, se llevó a levaduras de la estirpe W303-1A. Los transformantes se seleccionaron en placas de medio con galactosa y se cultivaron, posteriormente, hasta saturación en medio líquido con galactosa, desde donde se inocularon en medio rico con glucosa para activar la síntesis de la proteína recombinante. Fracciones de membranas totales sin lavar obtenidas de estos cultivos y que contenían 40 µg de proteína total, se sometieron a electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida, que se tiñeron con azul de Coomassie (Figura 3.5.14). La comparación de las muestras correspondientes a levaduras transformadas con el plásmido pRS1024 vacío y con pRGS-TVP, permitió observar la presencia de la proteína TVP en estas últimas. A continuación, fracciones de 100 µg de proteína se sometieron a análisis por Western Blot con un anticuerpo contra el epítipo RGS-H₆, por una parte, y con el anticuerpo policlonal obtenido contra la proteína TVP, como se ha expuesto anteriormente. Esto permitió detectar la presencia del grupo de seis histidinas en la proteína recombinante (Figura 3.5.14). Las medidas de actividad específica en estas muestras permitieron demostrar que la actividad de la proteína con el epítipo RGS-H₆, es similar a la de la proteína original (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001), en torno a 0,15-0,20 µmol PPI·mg⁻¹·min⁻¹. La proteína se solubilizó según el protocolo desarrollado durante este trabajo y se incubó a 4°C, una vez más, con la matriz cargada con iones níquel. Desafortunadamente, el resultado de esta hibridación volvió a ser negativo.

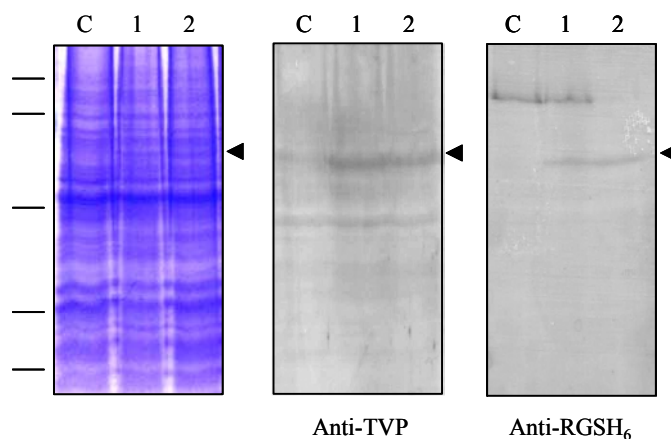


Figura 3.5.14: Expresión heteróloga de TVP fusionada a un motivo RGS-H₆ en su extremo amino terminal. Las levaduras se cultivaron en glucosa durante 16 h para la obtención de las membranas. C, levaduras transformadas con el plásmido pRS1024 vacío (control); 1 y 2, colonias de levadura independientes transformadas con pRGS-TVP. En la Figura se muestra la electroforesis de 40 µg de proteína total y su posterior tinción con azul de Coomassie, y los análisis por Western Blot de 100 µg de proteína con el anticuerpo contra TVP obtenido durante el desarrollo de esta Tesis y con un anticuerpo comercial contra el epítipo RGSH₆ introducido artificialmente en el extremo amino terminal de la proteína. La posición de las bandas de los patrones de peso molecular se indica con líneas: 119, 98, 57, 37 y 29 kDa. La posición de la banda correspondiente a la proteína TVP se indica con una flecha en cada caso.

Sin embargo, tras incubación e interacción con la muestra de proteína, la matriz adquiría un color blanquecino, indicativo de la pérdida de los iones Ni²⁺ durante el proceso. Este hecho podía ser debido a la presencia de una alta concentración de detergente o de agente quelante (PPi) en la muestra, por lo que ésta se diluyó 40 veces antes de incubar nuevamente a temperatura ambiente en las mismas condiciones usadas en experimentos anteriores. El análisis en geles de acrilamida al 10% de las distintas fracciones obtenidas a lo largo de este proceso de purificación permitió detectar la presencia de la proteína deseada en las muestras correspondientes a la hibridación, eluidas con imidazol (Figura 3.5.15).

Para comprobar la pureza de la proteína, se llevó a cabo una tinción con Imidazol-SDS-Zinc, descrita en el apartado 2.6.2.4 y que es más sensible que la tinción con colorante de Coomassie, no pudiendo observarse la presencia de ninguna banda contaminante en la muestra (Figura 3.5.15). Dado que la dilución de la muestra durante la unión a la matriz no sólo conllevaba una disminución en la concentración de PPi, sino también en la de detergente, se repitió la experiencia anterior con una dilución de la muestra análoga, pero en presencia de dos concentraciones distintas de detergente (0,15% y 0,45%). Tras someter a electroforesis las fracciones obtenidas en el proceso de purificación pudo comprobarse que, aunque en ambos casos la proteína se unía a la

matriz, el rendimiento del proceso era mayor a una baja concentración de detergente (no mostrado).

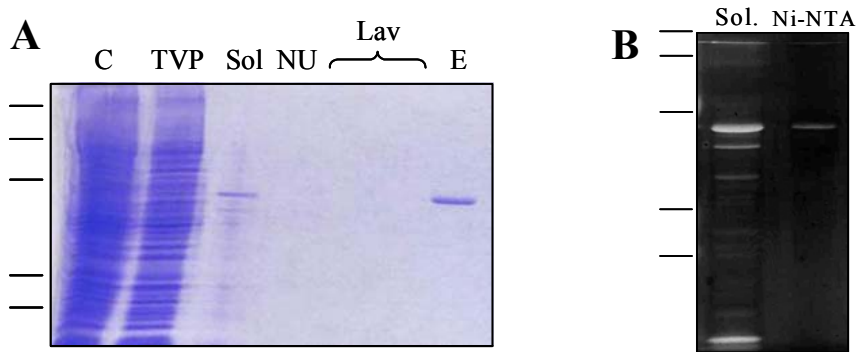


Figura 3.5.15: Purificación de TVP por su unión a una matriz de agarosa cargada con Ni^{2+} . Fracciones de 1 ml de muestra solubilizada se diluyeron 40 veces y se incubaron durante 16 horas con 0,5 ml de matriz cargada con níquel. A) C, membranas totales de levadura transformadas con un plásmido vacío como control; TVP, membranas totales de levadura transformadas con un plásmido que contenía la construcción para la expresión de la proteína TVP fusionada a un grupo RGS- H_6 en su extremo carboxilo-terminal; Sol, membranas solubilizadas; NU, material no unido a la matriz tras la incubación; Lav, fracciones resultantes de los lavados de la matriz; E, eluato que contiene la proteína TVP purificada. B) Tinción con Imidazol-SDS-Zinc de las fracciones de proteína solubilizada (Sol.) y purificada en columnas de ión-quelante con Ni^{2+} (Ni-NTA). La posición de las bandas de los patrones de peso molecular se indica con líneas: 119, 98, 57, 37 y 29 kDa.

4. DISCUSIÓN

4.1. Estudio sobre la distribución de las PPasas de membrana en microorganismos fotosintéticos y heterótrofos de distintos grupos taxonómicos

Durante este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda sistemática de H^+ -PPasas en microorganismos de muy distintos grupos taxonómicos. Los oligonucleótidos PP1 y PP2 utilizados han demostrado ser una herramienta muy útil, habiendo permitido la amplificación de fragmentos correspondientes a H^+ -PPasas, tanto dependientes como independientes de K^+ , en microorganismos de muy diversos orígenes, tanto fotosintéticos (clorofíceas, rodofíceas, dinofíceas, haptofíceas, prasinofíceas, euglenofíceas, bacilariofíceas (diatomeas), criptofíceas, heterocontofíceas) como no fotosintéticos (amebas, plasmodios, ciliados, heterocontes no fotosintéticos, tripanosomas y otros euglenozoos), incluido el coanoflagelado *M. brevicollis*, que se encuentra en la base de la línea evolutiva de los metazoos (Lang *et ál.* 2002, Stechmann y Cavalier-Smith 2002 y 2003), siendo ésta la primera vez que se demuestra la existencia de estas proteínas en un organismo ancestral de la línea evolutiva animal. La amplia variedad taxonómica de los organismos para los que se han obtenido resultados positivos pone de manifiesto la utilidad de estos oligonucleótidos en la identificación de nuevas H^+ -PPasas. Además, al pertenecer casi todas las H^+ -PPasas identificadas recientemente en proyectos genoma y bases de datos de ESTs de procariotas o plantas, la estrategia de PCR presentada en este trabajo ha contribuido en gran medida al conocimiento de la amplia distribución de las H^+ -PPasas entre los organismos eucarióticos unicelulares (o protistas).

La comprobación de la presencia de los genes de H^+ -PPasas identificados en los genomas de los organismos en cuestión no pudo completarse debido a la dificultad para conseguir digestiones totales de sus correspondientes DNAs (probablemente debido a contaminaciones de las preparaciones de DNA con elevadas cantidades de carbohidratos provenientes de la pared celular de las microalgas usadas) y también al hecho de que, en algunos casos, la hibridación de las sondas se produjo en la zona de DNA sin digerir, aún cuando la digestión de dicho DNA parecía completa (ver figuras 3.1.5 y 3.1.7). Este hecho podría deberse a la localización de estos genes en las proximidades de estructuras cromosómicas que presentan una especial resistencia a la digestión enzimática, por ejemplo regiones teloméricas o centroméricas (Suzuki *et ál.* 1994). A pesar de estas dificultades, se pudo demostrar inequívocamente la presencia en el genoma de los

distintos genes de H⁺-PPasas parálogos encontrados en la microalga cloroficea *N. maculata* y las criptoficeas *R. baltica* y *Cryptomonas* sp., así como de tres de los genes de la diatomea *P. tricornutum*. Además, se realizaron varios intentos para detectar la presencia de genes correspondientes a H⁺-PPasas en los genomas de la cloroficea halofílica *D. salina* y el euglenoide fotosintético *E. gracilis*, para las que se habían obtenido bandas de inmunodetección del tamaño esperado en los análisis por Western Blot, pero que no habían dado resultados claros y concluyentes en las reacciones de PCR con los oligonucleótidos PP1 y PP2. Una vez más, los problemas para la digestión del DNA dificultaron enormemente esta tarea; sin embargo, cabe destacar que pudieron observarse bandas de hibridación para ambos organismos cuando se utilizó una sonda heteróloga correspondiente a la H⁺-PPasa de *C. fusca*, aunque dichas bandas se situaron en la zona del DNA no digerido. Por el contrario, cuando la hibridación se llevó a cabo con una sonda para la isoforma independiente de K⁺ de *A. thaliana*, AVP2, sólo se observaron bandas de hibridación en el caso de *E. gracilis*, lo que podría sugerir la presencia de dos genes parálogos en este organismo en contraste con el posible único gen que existiría en el genoma de *D. salina*.

La secuencia de aminoácidos correspondiente al fragmento de DNA amplificado con los oligonucleótidos PP1 y PP2 presenta características que permiten distinguir entre sí a las H⁺-PPasas dependientes e independientes de K⁺. Por una parte, Belogurov y Lahti (2002) propusieron la existencia de un residuo de lisina en las proteínas independientes de K⁺, que es sustituido por una alanina en las dependientes de este ion. Mediante mutagénesis dirigida estos autores demostraron que la sustitución A/K en esta posición provoca la pérdida total del requerimiento de K⁺ para el desarrollo de la actividad máxima H⁺-PPasa. Este residuo se encuentra dentro del fragmento amplificado por los oligonucleótidos PP1 y PP2, unos 25-30 residuos del extremo 5' del mismo, lo que confirma la validez de este fragmento para la realización de estudios de filogenia molecular y la identificación funcional de nuevas H⁺-PPasas. Es importante señalar que el elevado número de fragmentos analizados en nuestro alineamiento ha permitido identificar H⁺-PPasas dependientes de K⁺ que presentan un residuo de serina o treonina, en vez de alanina, en esa posición, por lo que el residuo que determina la dependencia de potasio sería A, S ó T (en cualquier caso, residuos sin carga positiva) y se sustituiría por el aminoácido básico K en las H⁺-PPasas independientes de K⁺. Hay que destacar la

correlación total entre la presencia de esos residuos y el agrupamiento de las secuencias obtenidas en los dos grupos que definen a las dos grandes subfamilias de H⁺-PPasas (insensibles y dependientes de K⁺) en el árbol filogenético generado a partir de los datos obtenidos por nuestro grupo. Por otra parte, el hecho de que existan, en el fragmento amplificado por nuestros oligonucleótidos, residuos adicionales entre los distintos segmentos transmembranales en las H⁺-PPasas independientes de K⁺ permite distinguir la presencia de genes parálogos en algunos organismos mediante el análisis electroforético de los productos de PCR obtenidos, dado que las bandas de DNA amplificadas que pueden observarse en el caso de los fragmentos correspondientes a las H⁺-PPasas independientes de K⁺ tienen, en general y dada la ausencia de intrones en la mayoría de los protistas analizados, un tamaño molecular algo mayor que los correspondientes a proteínas cuya actividad es independiente de este catión. De este modo, se han encontrados varios productos de PCR de distintos tamaños para un elevado número de protistas, que codifican genes parálogos de H⁺-PPasas que podrían tener diferente dependencia de K⁺ (Figuras 3.1.3, 3.1.8 y 3.1.9). Hasta el momento, las dos únicas H⁺-PPasas parálogas caracterizadas bioquímicamente han sido dos de las tres isoformas existentes en la planta *A. thaliana*: AVP1 (dependiente de K⁺) y AVP2 (independiente de K⁺) [Kim *et ál.* 1994b, Drozdowicz *et ál.* 2000]. Ambas parecen estar expresadas con igual intensidad en hojas y raíces (Drozdowicz *et ál.* 2000), pero se diferencian en su localización subcelular, encontrándose AVP1 asociada a la vacuola (Britten *et ál.* 1992) y AVP2 al aparato de Golgi (Mitsuda *et ál.* 2001a). Aunque se ha encontrado una regulación específica para AVP1 en los granos de polen y se ha sugerido la implicación de esta isoforma en la maduración de los mismos (Mitsuda *et ál.* 2001b), no se han encontrado las razones fisiológicas que la determinan la existencia de varias isoformas de la H⁺-PPasa en la planta. Por otra parte, para el parásito apicomplejo *P. falciparum* (McIntosh *et ál.* 2001), la expresión de la isoforma PfVP2 independiente de K⁺ en las etapas asexuadas del ciclo de vida del parásito es prácticamente nula, mientras que la isoforma PfVP1 dependiente de K⁺ presenta altos niveles de transcrito y proteína, lo que sugiere una baja contribución de PfVP2 a la actividad total PPasa o la implicación de esta isoforma en otras etapas aún por determinar del ciclo de vida del parásito. La fusión de PfVP1 con una proteína fluorescente verde (GFP) permitió localizar esta H⁺-PPasa en la membrana plasmática, pero no pudo observarse fluorescencia para las fusiones de GFP

con PfVP2, por lo que no pudo determinarse la existencia o no de una localización subcelular distinta. Según se ha demostrado en esta Tesis Doctoral, la presencia de 2-4 genes de H⁺-PPasas es común en protistas fotosintéticos y no fotosintéticos (eustigmatofíceas, rodofíceas, criptofíceas, diatomeas, parásitos apicomplejos, ciliados) y plantas, y algo menor en procariotas (*A. tumefaciens*, *D. ethenogenes*), lo que plantea interrogantes acerca de la posible función fisiológica diferencial de estas proteínas. La amplia presencia en las microalgas marinas de H⁺-PPasas independientes de K⁺, posiblemente menos sensibles a inhibición por Na⁺, puede ser relevante a este respecto.

Los estudios de filogenia molecular llevados a cabo con las secuencias obtenidas por nuestro grupo han permitido demostrar que las H⁺-PPasas se encuentran en todos los grandes grupos filogenéticos de organismos eucarióticos, excepto en hongos y metazoos (ciliados, heterocontes, plasmodios, tripanosomas, rodofíceas, clorofíceas, diatomeas, criptofíceas, dinofíceas, haptofíceas y plantas). Sin embargo, esta distribución aunque amplia es esporádica, es decir, las H⁺-PPasas se encuentran sólo en algunos representantes de dichos grupos, excepto quizás en la línea evolutiva verde fotosintética (microalgas clorofíceas y plantas) en la que tienen una distribución general. Este hecho, junto a una distribución similar en bacterias fotosintéticas y quimiotróficas (con la importante excepción de las cianobacterias) y arqueas, sugiere un carácter ancestral para esta familia de bombas de iones, que se ha ido perdiendo a lo largo de la evolución, manteniéndose en aquellos organismos sometidos a situaciones crónicas de estrés (nutricional, biótico, etc.) que podrían llegar a afectar seriamente a la energética celular. Es importante destacar a este respecto que durante esta Tesis Doctoral se identificó por primera vez la presencia de una H⁺-PPasa en el coanoflagelado *Monosiga brevicollis*, que se encuentra en la base del linaje evolutivo animal (Lang *et ál.* 2002, Stechmann y Cavalier-Smith 2002 y 2003), lo que sugiere que al menos los ancestros de los actuales metazoos poseyeron en algún momento estas bombas de protones, aunque las perdieron muy pronto en su evolución. El único linaje evolutivo que ha llegado a una gran complejidad estructural y alcanzado gran éxito es el linaje fotosintético "verde", hecho que podría estar relacionado con las características fisiológicas particulares de estos organismos (en su mayoría sin movilidad, sometidos a situaciones casi crónicas de estrés nutricional y oxidativo, y a otras formas de estrés de tipo biótico y abiótico), bajo las cuales puede resultar una ventaja adaptativa importante la presencia de una proteína capaz

de reutilizar parte de la energía contenida en el enlace pirofosfato del PPi para la generación de gradientes de protones a través de distintas membranas celulares. Estos gradientes pueden ser utilizados posteriormente para el transporte de solutos o en la generación de ATP mediante una ATP-sintasa.

El árbol filogenético de distancias elaborado durante este trabajo (Figura 3.1.9) apoya la existencia de dos grandes subfamilias de H^+ -PPasas, caracterizadas por su distinta dependencia de K^+ para el desarrollo de la actividad máxima, y en general está de acuerdo con otros estudios filogenéticos sobre estas bombas de protones (Belogurov y Lahti 2002, Belogurov *et ál.* 2002). Enraizadas muy en la base de las ramas que definen las dos subfamilias mencionadas se encuentran H^+ -PPasas bacterianas que han sido caracterizadas bioquímicamente, lo que confirma, una vez más, la validez de las asignaciones realizadas a partir de las secuencias parciales de aminoácidos usadas en nuestros estudios filogenéticos en la predicción de la dependencia-independencia de K^+ de las distintas H^+ -PPasas. Además, dentro de las proteínas eucarióticas, tanto dependientes como independientes de K^+ , nuestros datos distinguen dos grandes grupos o líneas evolutivas: el primero incluye las H^+ -PPasas de plantas, algas clorofíceas, eustigmatofíceas, plasmodios, heterocontes, ciliados y tripanosomas, mientras que el segundo agrupa las H^+ -PPasas que presentan una mayor similitud con las proteínas procarióticas -rodofíceas, protistas fotosintéticos con plástidos complejos (criptofíceas, diatomeas, haptofíceas, etc.) y la de *M. brevicollis*. Una excepción a esta división se encuentra en el caso del gen II de la peculiar rodofícea termoacidófila *Cyanidium caldarium*, que se encuentra cercano a sus homólogos independientes de K^+ de plantas y eustigmatofíceas. Es importante destacar, sin embargo, como puede observarse en la figura 3.1.8, que en este caso la secuencia utilizada en el alineamiento corresponde a una parte de la empleada generalmente, por lo que es posible que este agrupamiento anómalo no corresponda a la situación real sino que sea un artefacto debido a la pérdida de parte de la información.

El hecho de que los linajes evolutivos fotosintético "verde" (clorofíceas) y fotosintético "rojo" (rodofíceas y algas con cloroplastos complejos derivados de ellas) se encuentren claramente separados en el árbol de distancias presentado (Figura 3.1.9), tanto para las H^+ -PPasas dependientes como para las independientes de K^+ , indicaría que ambos linajes se separaron pronto en su evolución, de acuerdo también con otros análisis

de filogenia molecular (Palmer 2000, Moreira *et ál.* 2000). Por otra parte, los plasmodios (protistas parásitos que presentan plástidos residuales apigmentados llamados apicoplastos) aparecen para ambas subfamilias muy relacionados con el linaje evolutivo verde, y distantes de las rodofíceas, lo que apuntaría hacia una clorofícea como origen evolutivo de estos plástidos residuales de parásitos. Aunque parece claro que estos plástidos son vestigios de la endosimbiosis secundaria de un eucariota fotosintético incorporado por un protozoo hospedador ancestral (Douglas 1998, Cavalier-Smith 2000, Wilson 2002), existe una gran controversia respecto a la naturaleza de dicho endosimbionte fotosintético, que diversos estudios filogenéticos señalan como un alga roja (Fast *et ál.* 2001, Walker *et ál.* 2003), otros como un alga verde (Köhler *et ál.* 1997, Funes *et ál.* 2003), e incluso algunos autores no descartan la posibilidad de que tenga un origen no fotosintético (Blanchard y Hicks 1999).

Además, las H^+ -PPasas dependientes de K^+ de otros protistas no fotosintéticos (parásitos y de vida libre), como los ciliados, tripanosomátidos y heterocontes, parecen también muy relacionados con sus homólogas del linaje evolutivo verde, lo que estaría de acuerdo con otros estudios de filogenia molecular que han llevado a proponer recientemente que estos protistas poseyeron en algún momento de su evolución un alga verde endosimbionte (Hannaert *et ál.* 2003). Según estos autores, un ancestro común de euglenoides y tripanosomátidos habría adquirido dicho protista fotosintético antes de la divergencia de ambos grupos. En la evolución posterior, los tripanosomátidos habrían sufrido la pérdida secundaria del endosimbionte y sus plástidos, no sin antes incorporar algunos de sus genes en el genoma nuclear (Hannaert *et ál.* 2003, Martin y Borst 2003); los euglenoides fotosintéticos, muy relacionados con los tripanosomátidos, serían una prueba remanente de este escenario evolutivo (Hannaert *et ál.* 2003). Nuestros resultados también indican que esta microalga endosimbiótica podría haber sido una clorofícea. Las H^+ -PPasas de ciliados, tripanosomátidos y heterocontes no fotosintéticos serían vestigios moleculares -mantenidos por las peculiares características fisiológicas de estos protistas- de dicha endosimbiosis críptica ancestral, que no dejó vestigios estructurales reconocibles en la actualidad, en una situación que llegó más allá que la encontrada para los apicoplastos de los parásitos apicomplejos.

En resumen, los oligonucleótidos PP1 y PP2 utilizados en este trabajo parecen realmente válidos como herramientas útiles en la detección y amplificación de fragmentos

de DNA correspondientes a genes de H⁺-PPasas de organismos muy diversos. Además, las secuencias de H⁺-PPasas obtenidas han sido de gran utilidad en estudios de filogenia molecular, obteniéndose resultados que confirman estudios recientes de este tipo y aportan nuevos datos e ideas sobre el origen evolutivo quimérico de los organismos eucarióticos.

4.2. Complementación funcional de la sPPasa citosólica de *Saccharomyces cerevisiae* por H⁺-PPasas de bacterias y plantas

Los intentos de interrumpir el gen que codifica la PPasa soluble citosólica de la levadura *S. cerevisiae* realizados por otros grupos antes de esta Tesis Doctoral no tuvieron éxito, lo que sugería que esta proteína podría tener un papel esencial en este organismo, al eliminar el PPi producido en las reacciones anabólicas en el citosol (Lundin *et ál.* 1991). Una forma de solventar este problema era mantener la sPPasa bajo el control de un promotor inducible, como el de la galactoquinasa de levadura (*GAL1*), que permite altos niveles de expresión en galactosa, mientras que la transcripción es virtualmente nula en glucosa (Schneider y Guarante 1991). Los intentos iniciales de obtener el mutante se llevaron a cabo mediante una estrategia de "interrupción/sustitución integrativa", como se había descrito previamente para el gen *PMA1* de levadura (Cid *et ál.* 1987), pero no se obtuvieron resultados positivos. La segunda estrategia consistió en la transformación de la estirpe haploide W303-1A con un plásmido multicopia que contenía el gen *IPP1* bajo el control de promotor *GAL1* y la posterior inserción de la casete *HIS3* (promotor + ORF + terminador) en el alelo cromosómico. Aunque esta aproximación no es muy eficiente, dado que la mayor parte de la recombinación homóloga se produce a nivel del plásmido al transformar con la copia interrumpida del gen, resultó, finalmente, positiva, obteniéndose un clon con el fenotipo esperado, esto es, con capacidad para crecer en galactosa, pero no en glucosa (Figura 3.2.2.A). La nueva estirpe, denominada YPC-1, se caracterizó a distintos niveles. Los análisis por Southern Blot y PCR llevados a cabo con el mutante y con controles apropiados mostraron la presencia de dos tipos de copia del gen *IPP1* en YPC-1: copias completas asociadas a plásmidos y la copia interrumpida del cromosoma (Figuras 3.2.2.B y C). Los análisis por Northern Blot demostraron que las copias

presentes en el plásmido bajo el control del promotor *GAL1* son los genes funcionales en los transformantes del mutante YPC-1. La actividad soluble PPasa también disminuyó en glucosa, pero más lentamente que el RNA mensajero, lo que sugiere que esta proteína podría tener una baja tasa de recambio en la levadura. El hecho de que, una vez eliminada toda la actividad soluble PPasa en las células, éstas fueran incapaces de continuar creciendo en glucosa (Figura 3.2.3.C), confirmó el papel esencial de la sPPasa citosólica en *S. cerevisiae*.

La transformación del mutante YPC-1 con plásmidos que contenían copias de distintas PPasas, tanto solubles como de membrana, bajo el control de un promotor constitutivo permitió la recuperación de la capacidad para crecer en glucosa (Figura 3.2.4). Esta complementación funcional era la esperada en el caso del gen IPP1, pero también se consiguió con los genes que codifican las sPPasas bacterianas de *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodopseudomonas palustris* y con las H⁺-PPasas de la planta *A. thaliana* (AVP1) y de la bacteria verde no sulfurosa *C. aurantiacus* (CVP), muy distintas estructuralmente de las proteínas solubles. Sin embargo, las células transformadas con pAVP1 y pCVP crecieron mucho más lentamente que las transformadas con las sPPasas, lo que está en concordancia con el hecho de que las primeras exhiben una actividad específica PPasa un orden de magnitud menor que las segundas. De acuerdo con esto, es importante destacar que las células de YPC-1 transformadas con el plásmido control pRS1024 poseen unos niveles de PPi intracelular más elevados que aquellas que contienen copias de H⁺-PPasas o sPPasas. Por otra parte, la complementación funcional del mutante por parte de pCVP o pAVP1 dependía en parte del pH externo, siendo este efecto mucho más acusado en el segundo caso, en que prácticamente no se observaba crecimiento alguno a pH 5. El análisis bioquímico demostró que las levaduras transformadas con pAVP1 y pCVP expresaban efectivamente las H⁺-PPasas de *A.thaliana* (AVP1) y de *C. aurantiacus* (CVP), respectivamente, ya que pudo medirse en estas células una actividad PPasa asociada a membrana e insensible a fluoruro, lo que eliminaba la posibilidad de una contaminación debida a sPPasas. Además, la actividad medida para AVP1 se estimulaba por K⁺, como ya se había descrito anteriormente para esta proteína (Kim *et ál.* 1994b, Drozdowicz *et ál.* 1999 y 2000), mientras que la de CVP era independiente de la presencia de K⁺ en el medio de reacción, en consonancia con diversos estudios filogenéticos llevados a cabo en nuestro laboratorio

(Pérez-Castiñeira *et ál.* 2002, Apdo. 3.1 en esta Tesis Doctoral). Las actividades de bombeo de protones dependiente de PPI correlacionaban bien con los valores de actividad PPasa en las muestras provenientes de las interfases 35/43,5 y 43,5/53,5 de los gradientes de densidad en sacarosa, al contrario de lo que sucedía para la interfase 27/35, lo que sugería que la composición de las membranas que se equilibran en este punto del gradiente era inadecuada para la formación de vesículas razonablemente bien cerradas, necesarias para el ensayo de bombeo de protones. Además, a pesar de que en ambos casos la cantidad de proteína detectada en el análisis por Western Blot para las distintas fracciones del gradiente permitió observar una mayor cantidad de proteína en la interfase 35/43,5, en el caso de AVP1, la actividad PPasa era análoga para estas muestras y las de la interfase 43,5/53,5, mientras que para CVP las actividades son comparables en todas las fracciones desde la interfase 27/35 hasta la 43,5/53,5. Este hecho podría deberse a una distinta interacción con las membranas de diferente composición lipídica que se equilibran en las distintas interfases del gradiente. El hecho de que AVP1 produzca una mayor caída de la fluorescencia de ACMA que CVP sugiere que esta última proteína podría estar comparativamente más desacoplada en las condiciones del ensayo, lo que podría ser debido a diferencias en las propiedades intrínsecas o en las conformaciones adquiridas dentro de la levadura por cada una de las proteínas. De este modo, la proteína bacteriana CVP podría no plegarse de forma óptima en este sistema heterólogo y/o sus interacciones con los lípidos de membrana de la levadura podrían ser peores que en el caso de su homólogo de plantas AVP1. Por otra parte, es importante destacar que *C. aurantiacus* es una bacteria termofílica y que la actividad específica máxima para CVP se obtuvo a 60°C. Por lo tanto, su acoplamiento óptimo entre bombeo de protones e hidrólisis de PPI podría producirse a esa temperatura. Desafortunadamente, por encima de 40°C, la alta conductividad pasiva de las membranas de levadura a los protones hace imposible llevar a cabo ensayos de fluorescencia (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001, Drozdowicz *et ál.* 1999).

Por lo que respecta a la localización subcelular, los experimentos de inmunolocalización llevados a cabo con las levaduras que expresaban AVP1 mostraron la acumulación de la proteína heteróloga fundamentalmente en estructuras membranosas que rodean el núcleo celular. Estas estructuras habían sido observadas anteriormente al expresar heterológamente en levadura otras proteínas integrales de membrana, como la

ATPasa de Ca^{2+} tipo P o las H^+ -ATPasas, y han sido denominadas cisternas perinucleares (Lenoir *et ál.* 2002), *karmellae* (Morsomme *et ál.* 1996), o membranas derivadas del retículo endoplasmático (Villalba *et ál.* 1992). Sin embargo, tanto la tinción inmunofluorescente como la distribución de la proteína en los gradientes de sacarosa permitieron observar que las H^+ -PPasas se podían localizar también en la membrana plasmática y pequeñas vesículas prevacuolares, lo que era consistente con datos previos obtenidos para la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico y AVP1 expresadas en levadura (Centeno *et ál.* 1994, Gaxiola *et ál.* 1999). Los experimentos de inmunolocalización no pudieron llevarse a cabo para CVP porque ninguno de los anticuerpos disponibles en nuestro laboratorio reconocía adecuadamente dicha proteína. Sin embargo, el hecho de que la distribución de CVP en los gradientes de sacarosa fuera análoga a la obtenida para AVP1 sugería una localización subcelular similar para ambas.

Aunque se ha demostrado que las H^+ -PPasas hidrolizan PPi *in vitro*, nuestros resultados aportan la primera evidencia de que estas proteínas llevan a cabo este proceso *in vivo*, permitiendo así el crecimiento de levaduras que poseen un nivel despreciable de su propia sPPasa citosólica. Esto supone reproducir en *S. cerevisiae* la situación existente en los tejidos fotosintéticos de plantas en lo que se refiere a la hidrólisis del PPi . En los tejidos fotosintéticos, debido a la ausencia de una sPPasa citosólica, la hidrólisis de PPi se atribuye fundamentalmente a las H^+ -PPasas (Drozdowicz *et ál.* 2000, Mitsuda *et ál.* 2001a). La ventaja de YPC-1 radica en que dicha reproducción se realiza en un organismo versátil y fácil de manipular como la levadura. También es importante destacar que la eliminación del PPi en las células de la estirpe YPC-1 se ha conseguido con dos tipos de H^+ -PPasas bioquímicamente distintos, a saber, una proteína independiente de K^+ de origen bacteriano y una proteína eucariótica estimulada por K^+ . El otro punto a considerar está relacionado con la otra actividad intrínsecamente relacionada con la hidrólisis del PPi que presentan las H^+ -PPasas, el bombeo de protones (Rea y Poole 1993, Kim *et ál.* 1994b). La sensibilidad al pH externo observada en los cultivos del mutante YPC-1 que expresan AVP1 y CVP desarrollados en glucosa podría deberse a diferencias en la localización subcelular de ambas proteínas, inducidas por la acidificación del medio de cultivo, tal como se ha sugerido para las H^+ -ATPasas de plantas expresadas en levadura (Morsomme *et ál.* 1996). En nuestro caso, no se observaron diferencias significativas entre los patrones de inmunofluorescencia o en la distribución de las H^+ -PPasas en los

gradientes de sacarosa realizados para células cultivadas a distintos pHs entre 5 y 7. De forma alternativa, la sensibilidad al pH podría explicarse asumiendo que la contribución de las proteínas localizadas en la membrana plasmática es crucial para el mantenimiento de los niveles de PPi citosólico en la levadura en torno a valores fisiológicamente sostenibles. La acidificación del medio externo podría dificultar el bombeo de protones hacia el exterior y, en consecuencia, la hidrólisis del PPi, especialmente en el caso de AVP1, que parece poseer un acoplamiento más fuerte entre ambas actividades que CVP en el sistema heterólogo. La limitada capacidad de AVP1 para bombear protones en contra de un pH ácido sería consistente con datos previos que sugieren que las H⁺-PPasas podrían estar funcionando cerca del estado estacionario *in vivo*, donde trabajan en paralelo con la H⁺-ATPasa del tonoplasto en tejidos fotosintéticos de plantas (Façaña y de Meis 1998). Si esta hipótesis fuera correcta, una H⁺-PPasa desacoplada intrínsecamente sería capaz de permitir el crecimiento de la estirpe YPC-1 de forma independiente del pH. Por lo tanto, este sistema de expresión heteróloga permitiría la búsqueda de mutaciones que afecten al mecanismo de acoplamiento en estas bombas de protones.

4.3. Regulación de la H⁺-PPasa de *Rhodospirillum rubrum* en condiciones de estrés

En esta parte del trabajo se llevaron a cabo experimentos encaminados a determinar si la sPPasa y la H⁺-PPasa, codificadas por genes de copia única en la bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodospirillum rubrum*, están regulados de forma distinta en respuestas a cambios en el estado metabólico de la célula. Dos proteínas distintas capaces de hidrolizar PPi han sido identificadas y caracterizadas en este procariota fotosintético: una sPPasa citosólica (subunidad ca. 25 kDa), con una K_m para MgPPi en torno a 20-30 micromolar (Klemme y Gest 1971a), y la H⁺-PPasa (subunidad ca. 60 kDa), una proteína integral de membrana cuya K_m para MgPPi está alrededor de 0,1-0,2 milimolar (Randahl 1979). El PPi generado por el anabolismo celular está, presumiblemente, accesible para ambas proteínas, por lo que se requeriría una regulación coordinada para mantener el nivel intracelular de este metabolito conveniente para la bacteria (0,5-1 mM) (Kukko-Kalse *et ál.* 1989) y un gradiente de protones adecuado a través de las membranas. Los resultados obtenidos demuestran que éste es el caso. En cultivos desarrollados en

condiciones anaeróbicas-fotosintéticas, ambas PPasas eran activas en todas las fases de crecimiento. Sin embargo, mientras que la sPPasa mostró claramente un máximo en la fase exponencial de crecimiento y una actividad específica comparativamente baja en la fase estacionaria, la proteína de membrana aumentó su actividad progresivamente con el tiempo, alcanzando un máximo al final del desarrollo del cultivo. Este aumento no se correlacionó bien con los patrones de variación del transcrito de *vpp* y su proteína, encontrados en los análisis por Northern y Western Blot, lo que sugiere una posible regulación al nivel post-traducciona. El ligero aumento en la actividad sPPasa detectado en la fase estacionaria tardía (80 h) se ha observado también en otros procariontas (Gómez-García *et ál.* 2003) y podría estar relacionado con un bajo número de recambio para la proteína de *R. rubrum*, dado que en este punto del desarrollo del cultivo pudo identificarse la sPPasa en los análisis por Western Blot pero el transcrito del gen *ppa* era prácticamente indetectable. Por otra parte, la H⁺-PPasa y su transcrito no pudieron detectarse en ningún momento en los cultivos aeróbicos-heterotróficos, que, consecuentemente, no presentaban ninguna actividad H⁺-PPasa. Estos resultados demostraban claramente la regulación diferencial la expresión del gen de la H⁺-PPasa respecto al de la sPPasa en estas condiciones de crecimiento, presentando ésta última proteína niveles altos de actividad.

La transferencia de los cultivos anaeróbicos-fotosintéticos a condiciones aeróbicas-heterotróficas no afectó significativamente a los niveles de transcrito *vpp* ni a la actividad específica de la H⁺-PPasa en un periodo de 8 h, lo que sugiere o bien una vida media larga para el transcrito y un bajo número de recambio para la proteína, o bien un establecimiento relativamente lento del efecto de represión transcripcional tras este cambio en las condiciones de crecimiento. Es importante destacar que mientras los cultivos anaeróbicos-fotosintéticos permanecían en fase exponencial tras 8 h, los cultivos aeróbicos se encontraban ya en fase estacionaria. En relación con estos resultados, se ha determinado que las células de *R. rubrum* cultivadas en condiciones fotosintéticas aumentan rápidamente su tasa de crecimiento cuando se transfieren a condiciones aeróbicas en oscuridad, sin que se produzca ningún periodo de latencia apreciable (Cohen-Bazire *et ál.* 1957, Newton 1960, Ormerod *et ál.* 1961). Por lo tanto, no puede descartarse que las diferencias observadas en los niveles de transcrito y actividad de los distintos cultivos reflejen simplemente distintas etapas de crecimiento.

Por el contrario, cuando se transferían cultivos aeróbicos en oscuridad a condiciones fototróficas (anaerobiosis, luz), se observó una clara inducción del transcrito de *vpp*. Además, esta transferencia inducía la síntesis de pigmentos fotosintéticos, mientras que la transferencia de los cultivos a aerobiosis-luz o anaerobiosis-oscuridad no causó ninguno de estos dos efectos, lo que sugiere una relación entre la síntesis de pigmentos, la formación de membranas intracelulares y la aparición de la H⁺-PPasa en *R. rubrum*. Esto es consistente con trabajos anteriores que demuestran que las células de *R. rubrum* inducen la formación de membrana intracitoplásmicas (que incluyen la maquinaria fotosintética) cuando se transfieren desde alta aireación a baja aireación en oscuridad o a anaerobiosis en presencia de luz (Oelze 1976). También se ha publicado que la síntesis de pigmentos se inhibe cuando las células cultivadas fotosintéticamente se transfieren a un ambiente aeróbico, siendo la tensión de oxígeno un factor de regulación (Cohen-Bazire *et ál.* 1957, Cohen-Bazire y Kunisawa 1963). Cabe destacar igualmente que en cultivos aeróbicos no sometidos a aireación intensa (agitación a menos de 250 rpm) o en que la relación volumen del matraz:volumen del cultivo era menor que la 10:1 típicamente usada en nuestros experimentos, pudimos detectar pequeñas cantidades tanto de transcrito de *vpp* como de H⁺-PPasa. En estas condiciones podían medirse asimismo pequeñas cantidades de bacterioclorofila (3-5 µg·ml⁻¹ respecto a los 22-25 µg·ml⁻¹ de los cultivos fotosintéticos). Estas observaciones podrían explicar por qué algunos autores han demostrado la existencia de H⁺-PPasa en células de *R. rubrum* cultivadas "aeróbicamente" (Romero *et ál.* 1991).

El hecho, por otra parte esperado, de que la cantidad de bacterioclorofila en los cultivos fotosintéticos fuese mayor que en los cultivos anaeróbicos en oscuridad (fermentación y respiración anaeróbica), mientras que la cantidad de proteína H⁺-PPasa era menor, apoyaba una vez más la idea de una posible relación entre la presencia de los centros de reacción fotosintéticos y la H⁺-PPasa, ambas proteínas integrales de membrana. Las diferencias observadas entre las cantidades de transcrito y proteína existentes en las tres condiciones de crecimiento anaeróbico podrían reflejar cambios en la eficiencia de la maquinaria de traducción y/o la estabilidad de la proteína. Por otra parte, trabajos anteriores habían demostrado que la actividad sPPasa de *R. rubrum* se inhibe *in vitro* por diferentes intermediarios relacionados con el metabolismo energético central, como la fructosa 1,6-bifosfato, 2-fosfoglicerato o NAD(P)H (Klemme y Gest

1971a y b), lo que sugiere que esta enzima podría estar regulada *in vivo* por cambios en los niveles de ciertos metabolitos en distintas condiciones de crecimiento. Esta regulación sería importante para evitar la competencia por el PPi de los dos tipos de PPasas cuando la célula estuviese en condiciones fisiológicas de "baja energía", como la fermentación o la respiración anaeróbica.

En plantas superiores, la V-PPasa, localizada en la membrana vacuolar, juega un papel fundamental en la homeostasis iónica y situaciones de estrés abiótico, como la salinidad, sequía, etc. (Gaxiola *et ál.* 2001). En el caso de *R. rubrum*, los resultados demuestran que la H⁺-PPasa podría estar implicada en la respuesta a sal de este procariota, sufriendo una dramática inducción en condiciones aeróbicas en presencia de NaCl. Por lo tanto, aunque la H⁺-PPasa de *R. rubrum* estaba presente en todas las condiciones anaeróbicas ensayadas, la ausencia de oxígeno no parece ser el único requerimiento para la transcripción del gen *vpp*. También es interesante el hecho de que los niveles de H⁺-PPasa en condiciones fotosintéticas parecen ser máximos y no observándose ninguna inducción adicional cuando otro tipo de estrés (por ejemplo, salino) se superpone a las condiciones anaeróbicas. En plantas, se ha sugerido una regulación transcripcional de la V-PPasa por frío o anoxia (Carystinos *et ál.* 1995), habiéndose observado un aumento en los niveles de proteína y en la actividad no sólo en condiciones de baja temperatura, sino también de deficiencia de nutrientes minerales o en presencia de NaCl (Colombo y Cerana 1993, Darley *et ál.* 1995, Kasai *et ál.* 1998). Sin embargo, no se ha descrito hasta este momento ningún caso de inducción transcripcional de la H⁺-PPasa por estrés en un organismo procariótico.

Los experimentos de extensión del cebador indican la existencia de dos promotores en tándem para el control de la expresión de *vpp* en condiciones anaeróbicas, con inicios de la transcripción en los nucleótidos -135 (tsp 1) y -296 (tsp 3) aguas arriba del codón de inicio de la traducción. Tentativamente, se ha identificado un posible sitio de unión del activador transcripcional FNR (5'-CTGATN₄TTCAT-3'), centrado 63 pares de bases aguas arriba de tsp 3, que es análogo en cierta extensión a la secuencia consenso propuesta para la unión de esta proteína (5'-TTGATN₄ATCAA-3'). La localización de este posible sitio de unión identificaría un promotor dependiente de FNR de Tipo I (Blake *et ál.* 2002). Sin embargo, bien este promotor u otro adyacente parecen estar activos para la transcripción en cultivos aeróbicos sometidos a estrés salino, ya que en este caso se ha

encontrado un TSP en posición -301 aguas arriba del codón de inicio de la traducción (tsp 3'). En el caso de tsp 1, que sólo es activo en condiciones fisiológicas que implican anaerobiosis (calles 1, 3 y 4 en la Figura 3.2.7.A), no se encontró ningún sitio de unión para FNR, pero pudo identificarse una secuencia análoga a la propuesta como consenso para el sitio de unión del regulador transcripcional RegA [5'-GCCGRCRXTATAAXGNCGC-3' (Y= pirimidina, R= purina, N= cualquier nucleótido y X= un número variable de bases), Laguri *et ál.* 2003]. RegA es una proteína reguladora que pertenece al sistema de respuesta redox de dos componentes RegA/RegB y se ha sugerido su función como un activador general de la transcripción de genes involucrados en muy distintas funciones metabólicas (fotosíntesis, fijación de carbono, utilización de hidrógeno, etc.), que se expresan en condiciones anaeróbicas en los procariontes fotosintéticos (Du *et ál.* 1998, Joshi y Tabita 1996, Qian y Tabita 1996). Dos regiones entre los nucleótidos -22 y -51 y entre -69 y -80 se han propuesto como las zonas de unión para esta proteína en el operón *puf* de *Rhodobacter capsulatus*, que codifica dos polipéptidos del complejo de captación de luz I (LHC I, Du *et ál.* 1998). El análisis de las secuencias promotoras del gen *vpp* permitió identificar dos regiones análogas en las posiciones -23 a -37 y -67 a -79 con respecto a tsp 1, lo que sugeriría que la transcripción a partir de este promotor podría ser activada por RegA, como parte de una respuesta general a la anaerobiosis. Búsquedas por comparación de secuencias de aminoácidos usando el algoritmo BLAST (Altschul *et ál.* 1997) revelaron la existencia de, al menos, dos genes que codifican proteínas reguladoras con dominios similares a los de RegA (gi|22967459|; gi|22967457|) en la base de datos del proyecto genoma de *R. rubrum*, aún sin terminar, y se ha propuesto la existencia de este tipo de sistema regulador de dos componentes en esta bacteria púrpura (Joshi y Tabita 1996). Todos estos datos apoyarían una inducción transcripcional conjunta de *vpp* y de los genes que codifican los pigmentos fotosintéticos en respuesta a las mismas condiciones ambientales.

También cabe destacar que, en contraste con tsp 3, para el cual se observó una zona en torno a la posición -10 similar a la caja TATA de *E. coli* no se pudo identificar ninguna secuencia de este tipo para tsp 1. De hecho, pudo encontrarse una región en las posiciones -13 y -24 respecto a tsp 1, que contenía el típico motivo TGGC-GC característico de los promotores dependientes de σ^{54} , que se encuentran frecuentemente en genes que se expresan en condiciones de estrés (Bauer *et ál.* 1988, Reitzer y Schneider

2001). Al igual que en el caso del promotor *puf* de *Rhodobacter capsulatus* (Bauer *et ál.* 1988), el posible sitio de unión -24 para el factor σ alternativo está solapado con la primera mitad de la secuencia de reconocimiento propuesta para RegA en el promotor *tsp* 1 de *vpp*.

En cultivos aeróbicos de *R. rubrum* sometidos a estrés salino, que carecían completamente de pigmentos, el promotor presumiblemente controlado por RegA no es activo y se usa un promotor distinto (*tsp* 2) para la transcripción del gen *vpp* en estas condiciones (calle 2 en la Figura 3.3.7.A). Este promotor presenta, al igual que *tsp* 3, una posible secuencia -10, pero no una caja -35 consenso identificable de *E. coli*. Sin embargo, sí pudieron identificarse regiones -35 alternativas, características de otros factores sigma distintos de σ^{70} , como σ^B o σ^S , normalmente involucrados en la transcripción de genes asociados a estrés (Akbar *et ál.* 1999, Hengge-Aronis 2002, Viollier *et ál.* 2003), tanto para *tsp* 2 como para *tsp* 3. Para éste último se propone también un posible sitio de unión de FNR, que controlaría la transcripción desde este promotor en condiciones anaeróbicas. En las condiciones de estrés salino probadas, se identificó un segundo TSP, *tsp*3', algunos nucleótidos aguas arriba de *tsp* 3, lo que sugiere que otro promotor independiente de FNR puede estar activo para la transcripción de *vpp* en aerobiosis bajo estrés salino. Aunque no se ha descrito hasta el momento ningún factor de transcripción bacteriano específico para la inducción de genes bajo estrés salino, se ha demostrado previamente la inducción de proteínas integrales de membrana durante este tipo de estrés para otra bacteria fotosintética, *Rhodobacter sphaeroides* (Xu *et ál.* 2001a y b).

Un análisis comparativo de secuencia reveló la existencia de posibles sitios de unión de FNR y RegA, así como motivos característicos de σ^{54} en la región adyacente aguas arriba del gen *vpp* de la α -proteobacteria fototrófica *Rhodospseudomonas palustris* (*Rps. palustris* JGI genome database, http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/rhopa/rhopa.home.html) (Figura 3.3.8), lo que sugiere que la compleja regulación debida a múltiples factores de la H^+ -PPasa puede ser un factor común en las proteobacterias. Las posiciones encontradas para los puntos de inicio de la transcripción de *vpp* y el posible lazo de terminación que se describen en este trabajo están esencialmente de acuerdo con el tamaño del transcrito (ca. 2,5 kb) encontrado en los análisis por Northern Blot, por lo que el gen *vpp* (secuencia codificante ca. 2,1 kb) se

transcribiría como un RNA mensajero monocistrónico. De hecho, los dos genes que codifican PPasas en *R. rubrum*, *vpp* y *ppa*, no están incluidos en operones, como sugieren sus RNAm y el tamaño de los correspondientes transcritos (Figura 3.3.7.C).

Por otra parte, los intentos de obtener un mutante "knock-out" por mutagénesis insercional de la H⁺-PPasa bacteriana resultaron infructuosos. La interrupción del gen *vpp* ha sido también abordada por otros grupos sin éxito (Schultz, Tesis Doctoral). Dado que este gen parece sufrir una inducción en condiciones de estrés de distintos tipos, no puede descartarse la posibilidad de que las dificultades para obtener el mutante deseado se deban a la necesidad de someter las células a estrés durante los procesos de transformación/conjugación (alta concentración de sales, choque térmico, estrés biótico); en estas condiciones, el gen *vpp* podría transcribirse activamente y la H⁺-PPasa ser esencial para la supervivencia de la bacteria.

Al contrario de lo que sucede en las plantas superiores, que carecen de sPPasa citosólica (Weiner *et ál.* 1987), el PPi que se genera en el citosol de *R. rubrum* podría ser hidrolizado, en principio, por dos PPasas distintas. Por lo tanto, es necesaria la regulación de las dos enzimas, para evitar una competencia por el sustrato. Los resultados presentados en este capítulo demuestran que éste es el caso: la sPPasa y la H⁺-PPasa de *R. rubrum* están reguladas de modo diferencial en las distintas condiciones de crecimiento investigadas. La regulación de la PPasa de membrana, tanto a nivel transcripcional como posiblemente de actividad, puede ser un elemento de respuesta general a distintas condiciones ambientales que afectan negativamente al estado energético celular. De este modo, la H⁺-PPasa no sería necesaria en condiciones en que la bacteria dispone de gran cantidad de nutrientes y posee un alto contenido energético, es decir, en presencia una fuente de carbono adecuada y alta aireación. Sin embargo, se induce rápidamente cuando las células se someten a situaciones de estrés inherentes a condiciones fisiológicas- fotosíntesis, respiración anaeróbica, fermentación, estrés osmótico- que producen distintos grados de restricción energética. En estos escenarios metabólicos, la utilización del PPi como fuente de energía "de bajo coste" para la bioenergética celular, proceso en el que la H⁺-PPasa juega un papel fundamental, parece ser una ventaja adaptativa importante.

4.4. Regulación transcripcional de la H⁺-PPasa en las microalgas eucarióticas *Chlorella fusca* y *Chlamydomonas reinhardtii*

Durante el transcurso de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo estudios encaminados a esclarecer algunos de los factores que regulan la actividad de la H⁺-PPasa en microalgas eucarióticas. Al inicio de este trabajo se realizaron diversos intentos encaminados a obtener una sonda de DNA para los análisis por Northern Blot correspondiente a la H⁺-PPasa de la microalga clorofícea *Chlamydomonas reinhardtii*, organismo fotosintético modelo para el estudio de procesos muy diversos, entre los que se encuentran la fotosíntesis, las respuestas inducidas por la luz, el transporte de nutrientes y el estrés metabólico (Harris 2001). Sin embargo, aunque pudo amplificarse un fragmento de cDNA correspondiente a dicha H⁺-PPasa (ver apartado 3.1), su clonación no fue posible y la amplificación a partir de DNA genómico resultó infructuosa. En cambio, sí fue posible la clonación del fragmento correspondiente de cDNA para otra microalga eucariótica clorofícea, *Chlorella fusca*. Por este motivo, los primeros experimentos fisiológicos se realizaron con cultivos de este organismo.

Trabajos anteriores llevados a cabo en plantas han analizado los efectos de distintos tipos de estrés (frío, anoxia, estrés salino) sobre la actividad y/o los niveles de transcrito o proteína para la V-PPasa. De todos ellos, los más extensamente estudiados, debido a su importancia agrícola han sido el estrés salino y el osmótico. En estos trabajos, se ha propuesto tanto un aumento de la actividad y/o la cantidad de transcrito para la V-PPasa (Colombo y Cerana 1993, Zingarelli *et ál.* 1994, Ballesteros *et ál.* 1996, Wang *et ál.* 2001, Parks *et ál.* 2002) como una disminución (Nakamura *et ál.* 1992, Matsumoto y Chung 1988, Wang *et ál.* 2000, Otoch *et ál.* 2001, Rockel *et ál.* 1994), e incluso la ausencia de ningún tipo de efecto por parte de estos tipos de estrés (Leach *et ál.* 1990, Reuveni *et ál.* 1990). Algunos autores han sugerido que las diferencias encontradas se han debido a las diferentes condiciones experimentales utilizadas (Colombo y Cerana 1993) o a la posibilidad de que las respuestas sean específicas para cada tipo de planta (Wang *et ál.* 2001). En cultivos celulares de plantas, en que la situación presentaría una mayor analogía con los cultivos de microalgas utilizados en este trabajo, se demostró que la actividad V-PPasa se duplicaba en presencia de NaCl, mientras que en presencia de sorbitol, dicha actividad presentó valores similares a los encontrados para el control, si

bien los experimentos no permiten concluir si dicho efecto se debe a un incremento de la actividad específica del enzima o a un aumento en la cantidad de transcrito (Colombo y Cerana 1993). Esta situación presenta analogías claras con los resultados obtenidos en el caso de *Chlamydomonas reinhardtii*. Para este organismo, se observó una clara inducción del transcrito del único gen de H⁺-PPasa en condiciones de estrés iónico (aproximadamente 3 veces con Na⁺), mientras que la presencia de sorbitol no parece producir ningún efecto a nivel transcripcional.

El efecto de las sales es más acusado en presencia de KCl, lo que podría indicar una adaptación específica de este organismo a lo largo de la evolución a entornos con exceso de Na⁺, pero no con exceso de K⁺, algo esperable ya que los primeros son mucho más frecuentes en los hábitats naturales. Presumiblemente, las células han desarrollado mecanismos específicos para contrarrestar la entrada de cantidades grandes de Na⁺ en el citosol o para facilitar la salida este ion, mientras que carecen de esos mecanismos en el caso del K⁺. Así, una misma concentración de los dos cationes en el exterior significaría una concentración más elevada de K⁺ en el citoplasma y, por tanto, la necesidad de una mayor respuesta a nivel del bombeo de protones en la vacuola, donde presumiblemente se localizaría la H⁺-PPasa (Robinson *et ál.* 1998). Los cambios en los equilibrios iónicos en el citoplasma, debido a la permeabilidad selectiva de la membrana para los distintos iones, se consideran un efecto general de la salinidad sobre los organismos (Kirst 1989). Los niveles de inducción de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* por los distintos iones (K⁺ > Na⁺ ≈ Li⁺) se correlacionan bien con los valores de permeabilidad selectiva de algunos canales de K⁺ en plantas, encargados de controlar la entrada de este ion en las células (Maathuis *et ál.* 1997, Meijer *et ál.* 2002). Para *C. reinhardtii* se ha propuesto que la despolarización de la membrana plasmática provocada por la presencia de concentraciones bajas (50 mM) de distintos iones en el medio externo, podría deberse a la distinta permeabilidad de estos canales iónicos (Meijer *et ál.* 2002). El aumento del gradiente de protones generado por la inducción de la H⁺-PPasa en presencia de las distintas concentraciones de cationes en el citoplasma se utilizaría entonces para el transporte de éstos hacia el interior vacuolar, retirándolos así de aquel compartimento celular.

En raíces de centeno, Kasai *et ál.* (1993a) estudiaron los efectos de los iones K⁺ y Cl⁻ sobre la actividad de la V-PPasa. La acumulación de K⁺ en el citoplasma produjo una

inhibición de la actividad V-PPasa, que se asoció con la alcalinización de este compartimento celular, mientras que el aumento de la actividad debida a los iones Cl^- se asoció a la disminución del pH citoplásmico. De este modo, al igual que se ha sugerido para la anoxia o el estrés por frío (Carystinos *et ál.* 1995), las variaciones en la actividad V-PPasa se deben a variaciones del pH. En el caso de *C. reinhardtii*, la diferente respuesta al nivel transcripcional en relación a cada una de las sales utilizadas implica que la inducción observada no se debe a una acidificación citoplásmica causada por la acumulación de Cl^- , sino que se debe a la acción de cada uno de los cationes.

En cuanto al efecto del sorbitol, la falta de respuesta por parte de la H^+ -PPasa implicaría la existencia de otros sistemas de defensa contra el estrés osmótico de naturaleza no-iónica, como la acumulación de solutos orgánicos de bajo peso molecular, que actuarían como osmolitos en el citoplasma, mecanismo ampliamente utilizado por distintas algas (tanto unicelulares como pluricelulares) para compensar la excesiva presión osmótica externa (Kirst 1989). Este hecho, apoyaría la hipótesis de que el efecto de la presencia de distintas sales en el medio sobre la H^+ -PPasa de *C. reinhardtii* es un efecto de los iones *per se* y no se debe al aumento de la presión osmótica que acompaña al incremento de la concentración de iones.

En el caso de *Chlorella fusca*, la respuesta al estrés salino no parece ser dependiente del tipo de ion, y el sorbitol produce un efecto análogo al de las sales. Este resultado sugeriría la existencia de un mecanismo de respuesta común en todos los casos, que implicaría el aumento del bombeo de protones a través del tonoplasto, con el fin de acelerar el transporte de la sustancia tóxica (catión u osmolito) hacia el interior de la vacuola. Sin embargo, no puede descartarse que el aumento en los niveles de transcrito se deba a dos sistemas de respuesta distintos con una misma consecuencia final, la inducción de la H^+ -PPasa. La existencia de mecanismos convergentes de respuesta a estrés se ha demostrado tanto en microalgas, como *C. reinhardtii*, como en plantas, en el caso de la inducción de la producción del mensajero secundario ácido fosfatídico, en respuesta al estrés hiperosmótico (Meijer *et ál.* 2002, Arisz *et ál.* 2003). En contraste con lo expuesto anteriormente para *C. reinhardtii*, las células de *C. fusca* sufrirían la activación transcripcional de la H^+ -PPasa en respuesta a la variación de la presión osmótica externa y no como una respuesta específica según la naturaleza del ion. El diferente comportamiento de las dos microalgas eucarióticas estudiadas en estos experimentos

podría estar asociado al hecho de que ambas presentan una morfología muy distinta. Así, mientras *C. reinhardtii* posee dos flagelos que permiten su desplazamiento y presenta vacuolas de pequeño tamaño, las células de *C. fusca* no poseen elementos motrices y la vacuola puede expandirse hasta ocupar la mayor parte del volumen celular. En este sentido, las células de *C. fusca* se parecerían más a las células de plantas superiores.

En este trabajo se han analizado también distintas condiciones nutricionales (fototrofia, mixotrofia y heterotrofia), que generarían distintos balances energéticos en las células. Los cambios en las concentraciones de ATP y ADP en cultivos de *C. reinhardtii* han sido analizados por Forti *et ál.* (2003), pero los valores obtenidos no son adecuados para el análisis de nuestros datos, debido a las diferencias en las condiciones experimentales. Estos autores desarrollaron los cultivos hasta la mitad de la fase exponencial en medio TAP, que contiene acetato como fuente de carbono, para después adaptar las células a las distintas condiciones metabólicas y medir las diferencias en las concentraciones de ATP y ADP. En nuestro caso, los cultivos se inocularon en condiciones autotróficas, mixotróficas o heterotróficas y se desarrollaron hasta la mitad de la fase exponencial en cada caso antes de proceder al aislamiento del RNA y el análisis por Northern Blot. Estos análisis permitieron demostrar que el nivel de transcrito para la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* en cultivos respiratorios es escasamente un 10% del nivel detectado en condiciones fotosintéticas y mixotróficas.

Para los cultivos de *C. fusca*, de modo análogo, se produce una disminución en los niveles de transcrito (aproximadamente un 55%) para la H⁺-PPasa en condiciones heterotróficas, en este caso, en presencia de glucosa como fuente de carbono reducido, sin que existan grandes variaciones en la cantidad de transcrito para ninguna de las dos microalgas entre los cultivos fototróficos y mixotróficos. Yang *et ál.* (2000) demostraron que la cantidad de ATP existente en las células en los cultivos heterotróficos de *Chlorella pyrenoidosa* es mucho más elevada que la existente en condiciones de mixotrofia o autotrofia, siendo en el último caso donde la producción de este metabolito es más reducida (hasta un 16% del total en condiciones heterotróficas). Nuestros resultados sugerirían que la H⁺-PPasa sería mucho más abundante en condiciones autotróficas, que implicarían un estrés nutricional y/o fotooxidativo, mientras que su presencia no sería tan necesaria en cultivos respiratorios, en que el contenido energético celular sería elevado.

En otras situaciones de estrés estudiadas en plantas, tales como choque térmico por frío, anoxia o deficiencia de nutrientes minerales en el medio, también se han observado incrementos en la actividad y/o en el nivel de transcrito para la V-PPasa (Kasai *et ál.* 1998, Colombo y Cerana 1993, Carystinos *et ál.* 1995). La inducción de esta proteína serviría para reemplazar a la V-H⁺-ATPasa en condiciones de estrés energético en la acidificación vacuolar (Carystinos *et ál.* 1995, Darley *et ál.* 1995), lo que permitiría el transporte de solutos al interior de la vacuola a expensas del PPi liberado en las reacciones metabólicas, reduciendo así el gasto de ATP. Otra posibilidad podría ser que en el tonoplasto se pudiera utilizar el PPi para generar un gradiente transmembranal (positivo en el interior de la vacuola) - situación de alta energía muy versátil para la célula - que pudiese utilizarse incluso para generar ATP mediante la acción de la V-H⁺-ATPasa funcionando como una ATP-sintasa (Schmidt y Briskin 1993b). Por otro lado, no puede descartarse la posibilidad de que la adaptación a los distintos tipos de estrés pudiera implicar una activación de rutas anabólicas, incrementándose así la producción de PPi en el citoplasma. Como en los organismos fotosintéticos la retirada de este metabolito se realiza en gran medida por acción de la H⁺-PPasa, puede ser esencial aumentar los niveles de actividad PPasa asociada a esta proteína para evitar el bloqueo de la biosíntesis de muchas biomoléculas. Un aumento indeseado en la acidificación vacuolar en este último caso podría solucionarse modulando el acoplamiento entre la actividad de bombeo y la hidrólisis de PPi *in vivo*.

La parte final de este trabajo se dedicó a la obtención de mutantes de *C. reinhardtii* que sobreexpresaran o presentaran niveles reducidos de la H⁺-PPasa, con el fin de analizar el comportamiento de los mismos en las distintas condiciones nutricionales y de estrés estudiadas. La obtención de las construcciones de DNA resultó una tarea complicada, siendo necesario el cultivo a 30°C de las células de *E. coli* transformadas con los distintos plásmidos e incluso el diseño de varias estrategias distintas de clonación. Durante la confección de estas construcciones se identificaron los fragmentos de DNA genómico que corresponden a los genes que codifican las tres PPasas de *C. reinhardtii*, las sPPasas mitocondrial y cloroplástica, y la H⁺-PPasa, aunque, como se ha mencionado, la clonación no fue posible en el caso del fragmento para la sPPasa cloroplástica. Asimismo, se identificaron clones de ESTs que contenían cDNAs con las secuencias codificantes completas de los tres genes de PPasas, los cuales se clonaron en plásmidos

para la posterior obtención de las construcciones adecuadas para la transformación de células de *C. reinhardtii*. Otra complicación a tener en cuenta fue la dificultad para observar un fenotipo en los cultivos en placa que permitiera seleccionar entre los transformantes aquellos para los que la inserción del DNA deseado fuera más probable, lo que reduciría el número de colonias a chequear. Los resultados preliminares de las caracterizaciones permitieron demostrar la existencia de, al menos, un transformante de sobreexpresión, que presentaba la inserción de la construcción de DNA adecuada, un mayor nivel de transcrito para la H⁺-PPasa en presencia de nitrato, y mostraba un mayor crecimiento en medio mineral con nitrato como fuente de nitrógeno suplementado con KCl, frente al correspondiente medio con amonio. Además, entre los transformantes con las construcciones para la disminución del contenido en H⁺-PPasa, se encontró uno incapaz de crecer en presencia de nitrato en medio líquido, ni siquiera en ausencia de sales. Sin embargo, la dificultad para la realización de los análisis por Northern Blot de estos transformantes, debido a la inestabilidad de los RNAs, no permitió determinar si estas diferencias de crecimiento se debían a la expresión del DNA foráneo o a la interrupción de un gen esencial para el crecimiento en el lugar de la inserción del DNA. La caracterización exhaustiva de este mutante y de otros que presenten fenotipos de crecimiento menos acusados permitirán confirmar la implicación de la H⁺-PPasa en la respuesta a distintos tipos de estrés en las microalgas eucarióticas.

Los estudios fisiológicos acerca de la H⁺-PPasa en las microalgas eucarióticas han permitido demostrar que esta proteína se encuentra regulada por el estrés iónico; sin embargo, mientras que en el caso de *C. fusca* la inducción transcripcional observada parece deberse a la presión osmótica, en el de *C. reinhardtii* la respuesta es específica de cada tipo de ion y no se observó ningún efecto de la presencia de osmolitos sobre la H⁺-PPasa. Estas diferencias se han asociado a las diferencias fisiológicas y estructurales entre ambas microalgas. Asimismo se ha demostrado que los niveles de transcrito para esta proteína son mayores en aquellas situaciones metabólicas que implican un bajo contenido energético celular, siendo este efecto independiente de la microalga estudiada. Durante este trabajo también se han obtenido posibles mutantes que sobreexpresan o presentan niveles reducidos de la H⁺-PPasa, si bien es necesaria una caracterización más exhaustiva de los mismos para determinar la implicación de esta proteína en las diferencias de crecimiento observadas en los experimentos fisiológicos realizados.

4.5. Obtención de anticuerpos policlonales monoespecíficos contra la PPasa de membrana y purificación de una H⁺-PPasa termofílica bacteriana

La obtención de un anticuerpo policlonal capaz de reconocer un amplio rango de H⁺-PPasas distintas, tanto bacterianas como eucarióticas, se ha abordado mediante dos estrategias distintas. La primera de ellas consistió en la sobreexpresión en *E. coli* de un polipéptido correspondiente al bucle hidrofílico de la proteína donde se localiza el posible sitio de unión de PPi, que había sido definido mediante modelización de la estructura secundaria de diversas V-PPasas de plantas, en comparación con los datos obtenidos de experimentos de mutagénesis dirigida y de inhibición con distintos agentes químicos (Maeshima 2000, Nakanishi *et ál.* 2001, Drozdowicz y Rea 2001). A este polipéptido se le había incorporado artificialmente un grupo de seis histidinas, que debería permitir su unión a columnas de ion-quelante. Durante la expresión heteróloga, se pudo observar la inducción de la síntesis de una proteína de pequeño tamaño en presencia de IPTG. Este polipéptido, sin embargo, presentaba una movilidad electroforética en geles de poliacrilamida en torno a 30 kDa, muy distinta de la que le correspondería según su tamaño esperado (aproximadamente 7 kDa). El aumento de la movilidad electroforética de las proteínas al fusionarles un grupo de seis histidinas en el extremo amino terminal es un fenómeno descrito en algún caso en la literatura. Este efecto parecía ser tanto mayor cuanto menor era el tamaño del polipéptido (QIAexpress manual, Diagen). Ante la imposibilidad de comprobar la existencia de una actividad que permitiera definir la identidad del polipéptido recombinante deseado y teniendo en cuenta la clara inducción en presencia de IPTG (Figura 3.5.1), se decidió continuar adelante con la purificación del mismo. Los extractos celulares se sometieron a cromatografía en columnas cargadas con Cu²⁺ y el polipéptido correspondiente se eluyó a una concentración de imidazol 77 mM. Al ser la concentración de eluyente competitivo relativamente baja, el polipéptido no pudo separarse de un número bastante elevado de proteínas contaminantes. Por ello, dado que la única finalidad del polipéptido era su uso para la obtención de un anticuerpo, se decidió someter las fracciones eluidas a electroforesis desnaturalizante y electroeluir las posteriormente de los geles de poliacrilamida. Este proceso resultó ser muy eficiente, permitiendo obtener aproximadamente 1 mg de proteína a partir de 100 mililitros de cultivo bacteriano. La inmunización de un conejo con este polipéptido electroeluido no

dio, sin embargo, resultados positivos. El anticuerpo no reconoció ninguna de las H⁺-PPasas expresadas heterológamente en levadura, aunque sí reconoció una banda de aproximadamente 30 kDa en extractos de *E. coli*. De ello podría deducirse que, o bien el polipéptido usado para la inmunización no correspondía en realidad al bucle hidrofílico de AVP1, sino a alguna proteína contaminante proveniente de la propia bacteria usada como sistema de expresión heteróloga, o bien que en el proceso de purificación se arrastraba una proteína contaminante con mayor antigenicidad que el polipéptido deseado.

Ante la necesidad de obtener el anticuerpo contra la H⁺-PPasa, y debido a las dificultades que había presentado nuestra primera estrategia, se planificó la purificación de una H⁺-PPasa completa, de modo que la inducción y la purificación de la misma pudiera seguirse mediante medidas de actividad de hidrólisis de PPI. Sólo unas pocas H⁺-PPasas se han purificado hasta el momento, a saber, las de *Rhodospirillum rubrum* (Nyrén *et ál.* 1984), *Vigna radiata* (Britten *et ál.* 1989 y 1992, Maeshima y Yoshida 1989), remolacha (Sarafian y Poole 1989), pera (Suzuki *et ál.* 1999), calabaza (Sato *et ál.* 1994) y tres plantas CAM (Becker *et ál.* 1995). Todas ellas se purificaron a partir de las membranas nativas y de tejidos jóvenes y en desarrollo, materiales en los que esta proteína parece encontrarse en mayor abundancia (Maeshima 2000). El problema de la baja expresión de las H⁺-PPasas en membranas nativas se ha abordado mediante la expresión heteróloga de estas proteínas tanto en *E. coli* (Belogurov *et ál.* 2002) como en levadura (Kim *et ál.* 1994b, Pérez-Castiñeira *et ál.* 1999, Drozdowicz *et ál.* 2000). Sin embargo, todavía no se ha publicado la purificación de una PPasa de membrana en un sistema heterólogo. La labilidad de estas proteínas parece ser el mayor obstáculo a la hora de su purificación. Por este motivo se eligió para esta parte del trabajo la H⁺-PPasa de la bacteria hipertermofílica *Thermotoga maritima*, cuya expresión heteróloga en levadura había sido ya conseguida por nuestro grupo (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001). Esta proteína presentaba una temperatura óptima de 70°C, su actividad se estimulaba por la presencia de K⁺ en el medio de reacción, y parecía resistente a las proteasas de levadura, lo que había permitido el aislamiento de membranas que presentaban actividad H⁺-PPasa en ausencia de inhibidores y EDTA. Debido a esta especial resistencia a distintos factores, se pensó que la purificación sería más simple que para cualquier H⁺-PPasa normofílica, algunas de las cuales se degradan con mucha facilidad durante el aislamiento de las membranas si no se mantienen en presencia de inhibidores de proteasas (Pérez-Castiñeira

et ál. 2001). Para facilitar su aislamiento se intentó incorporar artificialmente mediante PCR en el extremo 5' del gen la secuencia codificante de un grupo de seis histidinas en el extremo amino terminal. Los clones obtenidos bajo el control de un promotor de galactosa, se sobreexpresaron en *S. cerevisiae* y se llevó a cabo la purificación de la proteína TVP.

Durante el proceso de purificación se llevaron a cabo distintas pruebas, encaminadas a conseguir una muestra lo suficientemente libre de proteínas contaminantes como para poder obtener una proteína totalmente pura mediante su unión a columnas de ion-quelante cargadas con Ni^{2+} , evitándose así la posibilidad de su coelución junto con otras proteínas no deseadas como había ocurrido en el caso del polipéptido de AVP1 expresado en *E. coli*. El primer paso a optimizar en cualquier purificación de una proteína de membrana habría sido el detergente a utilizar. Sin embargo, el primer detergente probado, DDM, permitió una eficiente solubilización de TVP. De hecho, la solubilización con este detergente produjo una activación de la proteína, recuperándose un mayor número de unidades de actividad PPasa que las existentes en las membranas. A este respecto es relevante mencionar dos estudios recientes sobre solubilización y cristalización de proteínas de membrana. Pebay-Peyroula y Rosenbusch (2001) han llevado a cabo un estudio comparativo de las estructuras de distintas proteínas de membrana que han podido ser cristalizadas en presencia de lípidos de distinta composición y han demostrado que la naturaleza de los lípidos y el número de moléculas de esta naturaleza retenidas en el proceso de cristalización afectan al estado oligomérico y a la estructura cristalina de las proteínas y, por tanto, a su actividad catalítica. Por su parte, Schuck *et ál.* (2003) han estudiado la capacidad de distintos detergentes suaves para solubilizar selectivamente varias proteínas de membrana y para enriquecer las fracciones solubilizadas en un tipo determinado de lípidos. Las membranas celulares presentan dominios resistentes a la solubilización (DRMs por Detergent Resistant Membranes), cuya composición tanto cualitativa como cuantitativa, varía según la naturaleza del detergente usado. La solubilización de las proteínas contenidas en esos dominios dependería de una baja afinidad de la proteína por los lípidos que la rodean frente a las moléculas del detergente o de las características específicas de la interfase lípido-proteína. La activación de la proteína TVP durante su solubilización con DDM podría deberse, por

tanto, a la sustitución de los lípidos de las membranas de levadura por moléculas del detergente, generando un ambiente hidrofóbico más adecuado para la actividad catalítica.

Por otra parte, la activación observada durante la solubilización variaba durante el almacenamiento a -80°C o los ciclos de congelación-descongelación a que las muestras se sometían para realizar las distintas experiencias. Durante el proceso de solubilización, muchas proteínas de membranas sufren inactivaciones (Bowie 2001, Rosenbursch 2001). Dentro de la bicapa lipídica en las que se encuentran, estas proteínas no pueden adoptar cualquier conformación libremente, sino que se ven limitadas por las interacciones con los lípidos y con otras proteínas de la membrana. Cuando la estructura de la bicapa se destruye mediante la acción de un detergente, las proteínas embebidas en ella se ven liberadas de muchas de las restricciones a las que se ven sometidas dentro de la misma, lo que les permita adoptar conformaciones estables pero no nativas. Una segunda posibilidad es que la liberación de la membrana exponga al medio acuoso residuos que antes se encontraban protegidos, lo que resultaría en una modificación de las interacciones establecidas por dichos residuos, causando la inactivación o la disociación del estado de agregación activo de la proteína. La pérdida de la capacidad de activación de la proteína durante el proceso de solubilización cuando las muestras se sometían a procesos de congelación a -80°C y posterior descongelación podría deberse a la modificación de residuos involucrados en la interacción de la proteína con las moléculas del detergente o con otras proteínas, dado que las muestras de membranas totales sin solubilizar parecen conservar su actividad o incluso aumentarlas en estos procesos, como puede observarse en la preparación de membranas utilizadas en los experimentos de las figuras 3.5.3-3.5.5 ó 3.5.6 y 3.5.8.

Según los razonamientos anteriores, una de las formas más útiles de estabilizar una proteína de membrana durante su solubilización es la adición de ligandos que interaccionen con la misma en su conformación nativa y mantengan su estado de agregación o su plegamiento y protejan residuos importantes del medio acuoso (Bowie 2001). En el caso de TVP, nuestro grupo ya había demostrado que la proteína se une fuertemente a iones Mg^{2+} para adquirir la conformación adecuada y puede aislarse en una forma activa que contiene estos iones en su estructura, salvo que éstos se eliminen mediante un tratamiento drástico como el uso del agente quelante EDTA (Pérez-Castiñeira *et ál.* 2001). De esta forma, los tampones usados en la purificación, que

contenían siempre una concentración de EDTA 1 mM, se suplementaban con la misma concentración de Mg^{2+} . Además, los experimentos realizados permitieron observar una estabilización de la proteína TVP durante la solubilización cuando los tampones se suplementaban con concentraciones de K^+ 1 mM y de PPI 1 mM, los otros dos ligandos conocidos de la misma que estabilizarían la estructura nativa al separarse la proteína de la bicapa lipídica. Las variaciones entre las concentraciones óptimas de detergente para la solubilización a temperatura ambiente y a 75°C podría deberse a cambios en la Concentración Micelar Crítica (CMC) y otras propiedades intrínsecas del detergente (le Maire *et ál.* 2000), o a la solubilización efectiva de distintos tipos de lípidos a ambas temperaturas. Diversos autores han utilizado un paso de calentamiento para optimizar la purificación de una proteína termofílica a partir del organismo original (Andronopoulou y Vorgias 2003) o expresada en un sistema heterólogo (Tsujiimoto *et ál.* 2003, Morsomme *et ál.* 2002). Este tratamiento se ha aplicado también a transportadores de protones de organismos termofílicos, como la P-ATPasa de protones de *Methanococcus jannaschii* (Morsomme *et ál.* 2002). Dado que la temperatura óptima de trabajo de esta bomba de protones estaba en torno a 95°C, las muestras se calentaban tras la solubilización a 95°C durante 5 min, lo que al eliminarse un 80% de las proteínas contaminantes permitía una purificación de 5 veces, sin que se produjera una pérdida significativa de la actividad total P-ATPasa. La combinación de un primer paso de solubilización a temperatura ambiente y de un posterior tratamiento a alta temperatura permitió a los autores obtener una purificación total de la P-ATPasa termofílica de 10 veces. Para la purificación de la H^+ -PPasa de *T. maritima* se decidió combinar ambas etapas en una sola. Tras optimizar las condiciones de presencia de ligandos, proporción de detergente y tiempo de solubilización, esta estrategia permite una purificación de la proteína de 26 veces en un solo paso (Figura 3.5.9).

Además de los ensayos de solubilización en distintas condiciones, también se llevaron a cabo distintos intentos para mejorar la purificación, eliminando gran parte de las proteínas contaminantes de forma previa a dicha solubilización, mediante el lavado de las membranas con distintos agentes caotrópicos o mediante un gradiente en un paso que permitiera la separación de las membranas mitocondriales. Estos procedimientos, sin embargo, provocaban la pérdida de gran cantidad de material durante las manipulaciones y no mejoraron la eficiencia del proceso global, por lo que no se consideraron en el

protocolo final. Cabe destacar que la separación de las membranas mitocondriales permitió solubilizar la proteína en una forma activa por tratamiento a 70°C durante 1 h, mientras que cuando la solubilización se llevaba a cabo a 75°C durante 30 min, se producía una pérdida de actividad (Figura 3.5.8). Por el contrario, la actividad recuperada en la solubilización a partir de las membranas totales por ambos tratamientos fue comparable. Este efecto podría deberse a la existencia de interacciones entre TVP y alguna proteína o tipo de lípidos que sedimentaran con las membranas mitocondriales y que podrían afectar a la estabilidad de la proteína durante el tratamiento con el detergente.

El último paso de la purificación de TVP debía consistir en una cromatografía de afinidad de ion-quelante con una matriz cargada con Ni^{2+} , razón por la cual, la proteína se había fusionado a un grupo de seis histidinas en su extremo amino terminal. Sin embargo, las fracciones solubilizadas de la proteína no se unieron a la matriz, lo que podría tener varias explicaciones. Por una parte, cabe la posibilidad de que el grupo de seis histidinas estuviera de algún modo embebido en la conformación adoptada por la proteína en presencia del detergente y no se encontrara accesible para la unión con los cationes Ni^{2+} . Los factores que generan la especial estabilidad de las proteínas termofílicas a altas temperaturas respecto a sus homólogos normofílicos se ha convertido en un tema de interés en los últimos años, debido a su utilidad en ingeniería de proteínas, con el fin de estabilizar aquellas que sean especialmente inestables y difíciles de caracterizar estructuralmente en su estado natural (Rosenbusch 2001). Algunos autores han sugerido que esta especial estabilidad no se debe a residuos concretos, sino a una distinta distribución de los residuos cargados en la superficie de las proteínas (DeDecker *et ál.* 1996, Fukuchi y Nishinawa 2001) y a la existencia de mayor número de interacciones electrostáticas (pares iónicos y puentes de hidrógeno) entre las cadenas laterales (Vogt *et ál.* 1997). De este modo, las proteínas termofílicas presentarían una estructura más rígida a temperatura ambiente, lo que explicaría por qué muchas de ellas son totalmente inactivas a esta temperatura. Algunos autores (DeDecker *et ál.* 1996, Eilers *et ál.* 2000, Popot y Engelman 2000) han sugerido que la termoestabilidad de las proteínas y el mayor número de interacciones encontradas están relacionados con el grado de empaquetamiento, de tal modo que la proteína sólo presenta actividad cuando el aumento de temperatura permite un relajamiento del empaquetamiento que genere la flexibilidad suficiente en la estructura para que ésta pueda ejercer su función catalítica, si bien, en

algún caso, la comparación de ciertas proteínas termofílicas con sus homólogos mesofílicos no permitió observar estas diferencias de empaquetamiento (Karshikoff y Ladenstein 1998). Este mayor grado de empaquetamiento podría también afectar a la unión de la proteína a la matriz cargada con níquel, evitando que la estructura pueda relajarse en parte y permitir la interacción del grupo de seis histidinas con la matriz, por lo que se consideró que un aumento de la temperatura a la que se lleva a cabo este proceso podría ser beneficioso. Sin embargo, experimentos preliminares a distintas temperaturas no permitieron mejorar la unión de la proteína a la matriz, lo que descartó esta posibilidad.

La segunda posibilidad era que la proteína sintetizada en la levadura no poseyera las seis histidinas, lo cual, dado que dicho grupo no había sido detectado por Western Blot, se consideró como la opción más probable. El oligonucleótido utilizado para obtener la proteína recombinante se había diseñado de tal modo que poseía dos metioninas, una justo antes y otra justo después del grupo de seis histidinas (Figura 3.5.11). De este modo, se pensó que era probable que la levadura estuviese sintetizando preferentemente la proteína con la secuencia de aminoácidos más corta. Este problema se afrontó mediante el diseño de nuevos oligonucleótidos que contuvieran bien el grupo de seis histidinas en el extremo carboxilo, con lo que se eliminarían los posibles problemas de procesamiento de la proteína en su extremo amino terminal, o bien que contuvieran el grupo en el extremo amino terminal, pero que poseyeran un único codón de inicio para metionina. Debido a problemas técnicos, las construcciones con el grupo de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal no pudieron obtenerse antes de la finalización de esta Tesis Doctoral. Las nuevas construcciones con dicho grupo en el extremo amino-terminal, una vez introducidas en la levadura, permitieron expresar una proteína heteróloga que se sintetizaba con el grupo de seis histidinas según se dedujo del análisis por Western Blot con un anticuerpo contra dicha secuencia de histidinas. Sin embargo, una vez más, los intentos de unir la proteína a la matriz cargada con níquel no dieron resultados positivos.

Distintas experiencias llevadas a cabo hacia el final de este trabajo demostraron, sin embargo, que el problema de la unión de la proteína a la matriz se encontraba en los aditivos utilizados para la solubilización de la misma, principalmente el PPI. La estructura de esta molécula, con dos grupos fosfato unidos entre sí por un puente de oxígeno, la convierten en un agente quelante de cationes divalentes (Docampo y Moreno 2001, Ruiz

et ál. 2001). De este modo, la incubación con muestras de proteína diluidas a la mitad (concentración de PPI en torno a 500 μM), no permitía la purificación de TVP debido a la separación de los iones Ni^{2+} de la matriz de agarosa a la que se encuentran unidos. Una dilución de 40 veces, con una concentración de PPI 25 μM , no parecía afectar a la matriz y pudo obtenerse una fracción de la proteína altamente purificada.

Durante el desarrollo de este trabajo se obtuvo un anticuerpo policlonal contra la proteína TVP purificada a partir de geles de poliacrilamida que, si bien presentaba en Western Blot hibridación inespecífica de fondo, era capaz de reconocer distintas H^+ -PPasas tanto dependientes como independientes de K^+ de distintos organismos de diferentes grupos taxonómicos (protozoos parásitos, plantas y bacterias). Se ha demostrado además que la hibridación inespecífica puede eliminarse en su mayor parte mediante la incubación previa del anticuerpo con membranas de nitrocelulosa que contengan proteínas de membranas naturales de levadura de la estirpe silvestre.

Con este trabajo se han dado los primeros pasos de un proyecto más ambicioso que pretende conseguir información estructural acerca de las H^+ -PPasas, tomando como modelo la proteína de *Thermotoga maritima*. Como ya se ha mencionado al comienzo de esta discusión, hasta el momento no se ha publicado la purificación de ninguna proteína de este tipo a partir de un sistema heterólogo debido a la labilidad de estas proteínas de membrana, y la purificación a partir de tejidos nativos es un trabajo costoso y poco productivo a la hora de obtener las grandes cantidades necesarias para la cristalización de las mismas. La sobreexpresión de TVP y su aislamiento eran, en principio, objetivos alcanzables, debido a la estabilidad de esta proteína y su resistencia a las proteasas de la levadura. La posibilidad de solubilizar esta proteína y eliminar gran cantidad de proteínas contaminantes en un solo paso de purificación puede permitir en un futuro la purificación a homogeneidad de la proteína en dos pasos, usando una etapa final de cromatografía, bien en columnas de ion-quelante, o bien de otro tipo. Dado que no existe ningún dato estructural acerca de las H^+ -PPasas e incluso existe una amplia controversia acerca de su estado oligomérico (Chanson y Pilet 1989, Sato *et ál.* 1991, Maeshima 1990a, Sarafian *et ál.* 1992b, Tzeng *et ál.* 1996), el aislamiento de una forma rápida y sencilla de cantidades de proteína altamente estable podría permitir la obtención de cristales bi- y tridimensionales, cuyo análisis pueda aportar información estructural útil para esclarecer el mecanismo de acción de estas bombas de protones. Con este fin, fracciones de proteína

solubilizada se someterán en un futuro próximo a análisis de partícula simple y espectrometría de fuerza atómica para determinar diversos parámetros estructurales (estado oligomérico, etc.). Para el desarrollo de este proyecto, que se realizará en su mayor parte en el laboratorio del Profesor Michael Palmgren en Dinamarca, con el que se ha establecido una colaboración, se han iniciado contactos con los grupos de los Doctores Jean-Louis Rigaud en Francia y Werner Kühlbrandt en Alemania.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha realizado una búsqueda sistemática de nuevos genes que codifican H⁺-PPasas. Se ha identificado un elevado número de genes que codifican posibles H⁺-PPasas en microorganismos fotosintéticos y heterotróficos de distintos grupos taxonómicos, lo que ha permitido demostrar la amplia distribución de estas proteínas en los protistas (eucariotas unicelulares). Estas bombas de iones aparecen en todos los grupos de organismos fotosintéticos analizados, tanto procariotas como eucariotas, con la notable excepción de las cianobacterias. Además se ha demostrado por primera vez la existencia de un gen de H⁺-PPasa en un protista miembro del linaje evolutivo animal, el coanoflagelado *Monosiga brevicollis*. Este hallazgo sugiere que ancestros de los metazoos actuales pudieron poseer H⁺-PPasas aunque las perdieran pronto durante su evolución.

2. Se han analizado las relaciones filogenéticas moleculares existentes entre las H⁺-PPasas identificadas. De este modo, se ha demostrado la amplia distribución de miembros de las dos grandes subfamilias en las que bioquímicamente se dividen estas proteínas, caracterizadas por el requerimiento o independencia de K⁺ para el desarrollo de su actividad máxima. Este análisis también ha permitido distinguir en los organismos eucarióticos la existencia de dos linajes evolutivos diferentes para cada una de las dos subfamilias de H⁺-PPasas.

3. Tanto los estudios de filogenia molecular como, especialmente, los experimentos fisiológicos llevados a cabo con la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* y con dos microalgas clorofíceas fisiológica y morfológicamente muy distintas, *Chlorella fusca* y *Chlamydomonas reinhardtii*, han permitido demostrar que las H⁺-PPasas se asocian estrechamente con diversas situaciones de estrés que implican un bajo nivel energético celular.

4. Se han clonado los fragmentos de DNA que codifican las secuencias promotoras del gen *vpp*, que codifica la H⁺-PPasa de *R. rubrum*, y se han identificado los puntos de inicio de la transcripción bajo distintas condiciones nutricionales y de estrés salino. Los resultados obtenidos han demostrado la existencia de dos promotores en tándem que son activos en condiciones anaeróbicas, así como de otros dos promotores distintos, también

en tándem, que manifiestan su actividad en condiciones aeróbicas bajo estrés salino agudo.

5. Se han clonado las secuencias que corresponden a los fragmentos de DNA genómico y cDNA que incluyen el único gen de H⁺-PPasa de *Chlamydomonas reinhardtii*. Se han obtenido clones de esta microalga que podrían presentar niveles muy altos (sobreexpresión del gen) o reducidos (inhibición del transcrito por RNA antisentido) de esta proteína. Además, se han clonado los fragmentos de DNA genómico y cDNA que codifican la sPPasa mitocondrial, así como el fragmento de cDNA correspondiente a la sPPasa cloroplástica de este organismo.

6. Se ha obtenido un mutante de *Saccharomyces cerevisiae* que carece de actividad sPPasa cuando se cultiva en presencia de glucosa y se ha logrado su complementación funcional con genes de H⁺-PPasas, tanto solubles como de membrana, localizados en plásmidos bajo el control de un promotor constitutivo. Se ha demostrado de este modo por primera vez la capacidad de las H⁺-PPasas para hidrolizar PPi *in vivo*.

7. Se ha purificado la H⁺-PPasa de la bacteria hipertermofílica *Thermotoga maritima* mediante expresión heteróloga en membranas de levadura y se ha obtenido un anticuerpo policlonal contra dicha proteína que presenta reacción cruzada con un amplio número de H⁺-PPasas, tanto dependientes como independientes de K⁺, de microorganismos procarióticos y eucarióticos. La H⁺-PPasa termofílica bacteriana es un candidato apropiado para llevar a cabo estudios de relación estructura-función y de mecanismos de reacción no realizados hasta la fecha con ningún miembro de esta clase de bombas de iones.

6. BIBLIOGRAFÍA

Akbar S, Lee SY, Boylan SA y Price CW. 1999. Two genes form *Bacillus subtilis* under the sole control of the general stress transcription factor σ^B . *Microbiology* 145, 1069-1078.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Miller W y Lipman J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST, a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25, 3389-3402.

Ames BN. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods Enzymol* 8, 115-118.

Ames GF, Mimura CS y Shyamala V. 1990. Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases. *FEMS Microbiol Rev* 6, 429-446.

Andronopoulou E and Vorgias CE. 2003. Purification and characterization of a new hyperthermostable, allosamidin-insensitive and denaturation-resistant chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Extremophiles* 7, 43-53.

Arisz SA, Valianpour F, van Gennip AH y Munnik T. 2003. Substrate preference of stress-activated phospholipase D in *Chlamydomonas reinhardtii* and its contribution to PA formation. *Plant J* 34, 595-604.

Arnon DI. 1977. Photosynthesis 1950-75: changing concepts and perspectives. En A Trebst and M Avron (Eds), *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer-Verlag, Berlin.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM y Varki A. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.

Baginsky ES, Foa PP y Zak B. 1967. Determination of phosphate; Study of labile inorganic phosphate interference. *Clin Chim Acta* 15, 155-158.

Ballesteros E, Donaire JP y Belver A. 1996. Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Physiol Plant* 97, 259-268.

Baltscheffsky H, von Stedingk LV, Heldt HW y Klingenberg M. 1966. Inorganic pyrophosphate: formation in bacterial photophosphorylation. *Science* 153, 1120-1122.

Baltscheffsky H. 1993. Major “anastrophes” in the origin and early evolution of biological energy conversion. *J Theor Biol* 187, 495-501.

Baltscheffsky M. 1967. Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature* 216, 241-243.

Baltscheffsky M y Nyrén P. 1984. The synthesis and utilization of inorganic pyrophosphate. En L Ernster (Ed), *Bioenergetics*, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp 187-206.

Baltscheffsky M and Baltscheffsky H. 1992. Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatases. En L Ernster (Ed), *Molecular Mechanisms in Bioenergetics*, Elsevier Science Publishers BV, pp 331-348.

Baltscheffsky M, Nadanaciva S y Schultz A. 1998. A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 1364, 301-306.

Baltscheffsky M, Schultz A y Baltscheffsky H. 1999. H⁺-PPases: a tightly membrane-bound family. *FEBS Lett* 457, 527-533.

Bauer CE, Young DA y Marrs BL. 1988. Analysis of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon: location of the oxygen-regulated promoter region and the identification of an additional *puf*-encoded gene. *J Biol Chem* 263, 4820-4827.

- Bauer CE, Elsen S y Bird T.** 1999. Mechanisms for redox control of gene expression. *Annu Rev Microbiol* 53, 495-523.
- Bäumer S, Lentjes S, Gottschalk G y Deppenmeier U.** 2002. Identification and analysis of proton-translocating pyrophosphatases in the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei*. *Archaea* 1, 1-7.
- Baykov AA, Bakuleva NP y Rea PA.** 1993a. Steady-state kinetics of substrate hydrolysis by vacuolar H⁺-pyrophosphatase. A simple three-state model. *Eur J Biochem* 217, 755-762.
- Baykov AA, Dubnova EB, Bakuleva NP, Evtushenko OA, Zhen RG y Rea PA.** 1993b. Differential sensitivity of membrane-associated pyrophosphatases to inhibition by diphosphonates and fluoride delineates two classes of enzyme. *FEBS Lett* 327, 199-202.
- Baykov AA, Kasho VN, Bakuleva NP y Rea PA.** 1994. Oxygen exchange reactions catalyzed by vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. Evidence for reversible formation of enzyme-bound pyrophosphate. *FEBS Lett* 350, 323-327.
- Becker A, Canut H, Lüttge U, Maeshima M, Marigo R y Ratajczak J.** 1995. Purification and immunological comparison of the tonoplast H⁺-pyrophosphatase from cells of *Catharanthus roseus* and leaves from *Mesembryanthemum crystallinum* performing C3-photosynthesis and the obligate CAM-plant *Kalanchoë daigremontiana*. *J Plant Physiol* 146, 88-94.
- Bell AW, Buckel SD, Groarke JM, Hope JN, Kingsley DH y Hermodson MA.** 1986. The nucleotide sequences of the *rbsD*, *rbsA* and *rbsC* genes of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* 261, 7652-7658.
- Belogurov GA y Lahti R.** 2002. A lysine substitute for K⁺. A460K mutation eliminates K⁺ dependence in H⁺-pyrophosphatase of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *J Biol Chem* 277, 49651-49654.

Belogurov GA, Turkina MV, Penttinen A, Huopalahti S, Baykov AA y Lahti R. 2002. H⁺-pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. High yield expression in *Escherichia coli* and identification of the Cys residues responsible for inactivation by mersalil. *J Biol Chem* 277, 22209-22214.

Bille J, Weiser T y Bentrup FW. 1992. The lysolipid sphingosine modulates pyrophosphatase activity in tonoplast vesicles and isolated vacuoles from a heterotrophic cell suspension culture of *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plant* 84, 250-254.

Blake T, Barnard A, Busby SJW y Green J. 2002. Transcription activation by FNR: Evidence for a functional Activating Region 2. *J Bacteriol* 184, 5855-5861.

Blanchard JL y Hicks JS. 1999. The non-photosynthetic plastid in malaria parasites and other apicomplexans is derived from outside the green plastid lineage. *J Eukaryot Microbiol* 46, 367-375.

Blum JJ. 1989. Changes in orthophosphate, pyrophosphate and long-chain polyphosphate levels in *Leishmania major* promastigotes incubated with and without glucose. *J Protozool* 36, 254-257.

Bose SK, Gest H y Ormerod JG. 1961. Light-activated hydrogenase activity in a photosynthetic bacterium: a permeability phenomenon. *J Biol Chem* 236, PC13-PC14.

Bowie JU. 2001. Stabilizing membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 11, 397-402.

Boyer PD. 1988. Bioenergetic coupling to protonmotive force: should we be considering hydronium ion coordination and not group protonation? *Trends Biochem Sci* 13, 5-7.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Bremberger C y Lüttge U. 1992. Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of Crassulacean Acid Metabolism. *Planta* 188, 575-580.

Britten CJ, Turner JC y Rea PA. 1989. Identification and purification of substrate-binding subunit of higher plant proton-translocating inorganic pyrophosphatase. *FEBS Lett* 256, 200-206.

Britten CJ, Zhen RG, Kim EJ y Rea PA. 1992. Reconstitution of transport function of vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase. *J Biol Chem* 267, 21850-21855.

Cai YP and Wolk CP. 1990. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J Bacteriol* 172, 3138-3145.

Capieaux E, Vignais M-L, Sentenac A y Goffeau A. 1989. The yeast H⁺-ATPase gene is controlled by the promoter binding factor TUF. *J Biol Chem* 264, 7437-7446.

Carafoli E y Scarpa A (Eds). 1982. Transport ATPases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 402, 1-604.

Carlson M y Botstein D. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28, 145-54.

Carystinos GD, MacDonald HR, Monroy AF, Dhindsa RS y Poole RJ. 1995. Vacuolar H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. *Plant Physiol* 108, 641-649.

Cavalier-Smith T. 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci Perspectives* 5, 174-182.

Centeno F, Deschamps S, Lompré A-M, Anger M, Moutin M-J, Dupont Y, Palmgren MG, Villalba JM, Moller JV, Falson P y le Maire M. 1994. Expression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in yeast. *FEBS Lett.* 354, 117-22. Corrección en: 1995. *FEBS Lett* 358, 104.

Chanson A, Fichmann J, Spear D y Taiz L. 1985. Pyrophosphate-driven proton transport by microsomal membranes of corn coleoptiles. *Plant Physiol* 79, 159-164.

Chanson A y Pilet PE. 1987. Localization in sucrose gradients of the pyrophosphate-dependent proton transport of maize root membranes. *Plant Physiol* 84, 1431-1436.

Chanson A y Pilet PE. 1989. Target molecular size and Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis analysis of the ATP- and Pyrophosphate-dependent proton pumps from maize root tonoplast. *Plant Physiol* 90, 934-938.

Chen J, Brevet A, Fromant M, Lévêque F, Schmiter JM, Blanquet S y Plateau P. 1990. Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172, 5686-5689.

Church GM y Gilbert W. 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1991-1995.

Cid A, Perona R y Serrano R. 1987. Replacement of the promoter of the yeast plasma membrane ATPase gene by a galactose-dependent promoter and its physiological consequences. *Curr Genet* 12, 105-110.

Clayton RK. 1963. Bacteriochlorophyll measurements. En H Gest, A San Pietro y LP Vernon (Eds), *Bacterial Photosynthesis*, Antioch Press, Yellow Springs, Ohio, pp 495-500.

Cohen-Bazire G, Sistrom WR y Stanier RY. 1957. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Comp Physiol* 49, 25-68.

- Cohen-Bazire G y Kunisawa R.** 1963. The fine structure of *Rhodospirillum rubrum* cell. *J Cell Biol* 16, 401-419.
- Colombo R y Cerana R.** 1993. Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatases in NaCl-grown cells of *Daucus carota*. *J Plant Physiol* 142, 226-229.
- Cooperman BS, Baykov AA y Lahti R.** 1992. Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Biochem Sci* 17, 262-266.
- Costa dos Santos A, Seixas da Silva W, de Meis L y Galina A.** 2003. Proton transport in maize tonoplast supported by fructose-1,6-biphosphate cleavage. Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase as a pyrophosphate regenerating system. *Plant Physiol* 133, 885-892.
- Cowart RE, Swope S, Loh TT, Chasteen ND y Bates GW.** 1986. The exchange of Fe^{3+} between pyrophosphate and transferrin. Probing the nature of an intermediate complex with stopped flow kinetics, rapid multimixing, and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 261, 4607-4614.
- Dancer JE y ap Rees T.** 1989. Effects of 2,4-dinitrophenol and anoxia on the inorganic pyrophosphate content of the spadix of *Arum maculatum* and the root apices of *Pisum sativum*. *Planta* 178, 421-424.
- Davies JM, Poole RJ, Rea PA y Sanders D.** 1992. Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11701-11705.
- Darley CP, Davies JM y Sanders D.** 1995. Chill-induced changes in the activity and abundance of the vacuolar proton-pumping pyrophosphatase from Mung bean hypocotyls. *Plant Physiol* 109, 659-665.

Darley CP, Skiera LA, Northrop FD, Sanders D y Davies JM. 1998. Tonoplast inorganic pyrophosphatase in *Vicia faba* guard cells. *Planta* 206, 272-277.

DeDecker BS, O'Brien R, Fleming PJ, Geiger JH, Jackson SP y Sigler PB. 1996. The crystal structure of a hyperthermophilic archaeal TATA-box binding protein. *J Mol Biol* 264, 1072-1084.

De la Rosa MA, Hervás M, Serrano A y Losada M. 1990. *Fotobioquímica*. Editorial Síntesis, Madrid.

De Meis L. 1894. Pyrophosphate of high and low energy. *J Biol Chem* 259, 6090-6097.

Docampo R y Moreno SNJ. 2001. The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* 114, 151-159.

Douglas SE. 1998. Plastid evolution: origin, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* 8, 655-661.

Doyle JJ y Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *FOCUS* 12, 13-15.

Drozdowicz Y, Lu Y-P, Patel V, Fitz-Gibbon S, Miller JH y Rea PA. 1999. A thermostable vacuolar type membrane pyrophosphatase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate- energized pumps. *FEBS Lett* 460, 505-512.

Drozdowicz Y, Kissinger JC y Rea PA. 2000. AVP2, a sequence-divergent, K⁺-insensitive H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from Arabidopsis. *Plant Physiol* 123, 353-362.

Drozdowicz YM y Rea PA. 2001. Vacuolar H⁺-pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends Plant Sci* 6, 206-211.

- Du S, Bird TH y Bauer CE.** 1998. DNA binding characteristics of RegA: a constitutively active anaerobic activator of photosynthetic gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J Biol Chem* 273, 18509-18513.
- Dunn T, Gable K y Beeler T.** 1994. Regulation of cellular Ca^{2+} by yeast vacuoles. *J Biol Chem* 269, 6290-6295.
- Durnford DG, Deane JA, Tan S, McFadden GI, Gantt E y Green BR.** 1999. A phylogenetic assesment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins with implications for plastid evolutions. *J Mol Evol* 48, 59-68.
- Edwards J, ap Rees T, Wilson PM y Morell S.** 1984. Measurement of the inorganic pyrophosphate content in tissues of *Pisum sativum* L. *Planta* 162, 188-191.
- Eilers M, Shekar SC, Shieh T, Smith SO y Fleming PJ.** 2000. Internal packing of helical membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5796-5801.
- Ernster L** (Ed). 1984. *Bioenergetics*. En A Neuberger y LLM van Deenen (Eds), *New comprehensive biochemistry*, Elsevier Science Pulishers B V, Amsterdam, vol 9.
- Façanha AR y de Meis L.** 1998. Reversibility of H^+ -ATPase and H^+ -pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol* 116, 1487-1495.
- Farrell Jr. RE.** 1993. *RNA Methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization*. Academic Press Inc, San Diego.
- Fast NM, Kissinger JC, Roos DS y Keeling PJ.** 2001. Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol Biol Evol* 18, 418-426.

Fernández-Patrón C, Calero M, Rodríguez Collazo P, García JR, Madrazo J, Musacchio A, Soriano F, Estrada R, Frank R, Castellanos-Serra LR y Méndez E. 1995. Protein Reverse Staining: High-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. *Anal Biochem* 224, 203-211.

Fischer-Schliebs E, Mariaux J-B y Lüttge U. 1997. Stimulation of H⁺-transport activity of vacuolar H⁺-ATPase by activation of H⁺-PPase of *Kalanchoë blossfeldiana*. *Biol Plant* 39, 169-177.

Fitzmaurice WP, Saari LL, Lowery RG, Ludden PW y Roberts GP. 1989. Genes coding for the reversible ADP-ribosylation system of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Mol Gen Genet* 218, 340-347.

Fitzmaurice WP y Roberts GP. 1991. Artificial DNA-mediated genetic transformation of the photosynthetic nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Microbiol* 156, 142-144.

Forgac M. 1998. Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPases. *FEBS Lett* 440, 258-263.

Forti G, Furia A, Bombelli P y Finazzi G. 2003. *In vivo* changes of the oxidation-reduction state of NADP and of the ATP/ADP cellular ratio linked to the photosynthetic activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 132, 1464-1474.

Fraichard A, Trossat C, Magnin T y Pugin A. 1994. Influence of ATPase activity on PPi dependent H⁺-transport in tonoplast vesicles of *Acer pseudoplatanus*. *Plant Sci* 100, 129-138.

Fukuchi S y Nishikawa K. 2001. Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. *J Mol Biol* 309, 835-843.

Funes S, Davidson E, Reyes-Prieto A, Magallón S, Herion P, King MP y González-Halphen D. 2002. A green algal apicoplast ancestor. *Science* 298, 2155.

García-Donas I, Pérez-Castiñeira JR, Rea PA, Drozdowicz Y, Baltscheffsky M, Losada, M y Serrano A. 1998. Evidence for the widespread distribution of membrane-bound inorganic pyrophosphatases among photosynthetic prokaryotes. En G Garab (Ed), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, vol V, pp 3679-3682.

Gaxiola RA, Rao R, Sherman A, Grisafi P, Alper SL y Fink GR. 1999. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and AVP1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1480-1485.

Gaxiola RA, Li J, Undurraga S, Dang LM, Allen GJ, Alper SL y Fink GR. 2001. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11444-11449.

Gillham NW, Boynton JE y Burkholder B. 1970. Mutations altering chloroplast ribosome phenotype in *Chlamydomonas*, I. Non-Mendelian mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 67, 1026-1033.

Gillies RJ, Ugurbil K, den Hollander JA y Shulman RG. 1981. ³¹P NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78, 2125-2129.

Gómez-García MR, Losada M y Serrano A. 2001. On the chimeric nature of the soluble pyrophosphatases set from photosynthetic eukaryotes. En A Serrano (Ed), *New Trends in Inorganic Pyrophosphatases Research. Proceedings of the Second International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases*, pp 63-66, Universidad de Sevilla-CSIC, ISBN 84-699-4960-8.

Gómez-García MR. 2002. Tesis Doctoral: *Caracterización molecular de la pirofosfatasa inorgánica soluble de microorganismos fotosintéticos y plástidos*. Universidad de Sevilla.

Gómez-García MR y Serrano A. 2002. Expression studies of two paralogous *ppa* genes encoding distinct Family I pyrophosphatases in marine unicellular cyanobacteria reveal inactivation of the typical cyanobacterial gene. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 284-292.

Gómez-García MR, Losada M y Serrano A. 2003. Concurrent transcriptional activation of *ppa* and *ppx* genes by phosphate deprivation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 284-292.

Gómez-García MR, Ruiz-Pérez LM, González-Pacanowska D y Serrano A. 2004. A novel calcium-dependent soluble inorganic pyrophosphatase from the trypanosomatid *Leishmania major*. *FEBS Lett* 560, 158-166.

González-Reyes JA, Hidalgo A, Caler JA, Palos R y Navas P. 1994. Nutrient uptake changes in ascorbate free radical-stimulated onion roots. *Plant Physiol* 104, 271-276.

Gordon-Weeks R, Steele SH y Leigh RA. 1996. The role of Magnesium, Pyrophosphate, and their complexes as substrates and activators of the vacuolar H⁺-pumping inorganic pyrophosphatase (Studies using ligand protection from covalent inhibitors). *Plant Physiol* 111, 195-202.

Gordon-Weeks R, Koren'kov VD, Steele SH y Leigh RA. 1997. Tris is a competitive inhibitor of K⁺ activation of the vacuolar H⁺-pumping pyrophosphatase. *Plant Physiol* 114, 901-905.

Grüber G. 2003. Introduction: A close look at the vacuolar ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 35, 277-280.

Hakki S y Sitaramayya A. 1990. Guanylate cyclase from bovine rod outer segments: solubilization, partial purification and regulation by inorganic pyrophosphate. *Biochemistry* 29, 1088-1094.

Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora J-P, Rigden DJ, Michels PAM y Opperdoes FR. 2003. Plant-like traits associated with the metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1067-1071.

Harold FM. 1967. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism and function. *Bacteriol Rev* 30, 772-794.

Harris EH. 1988. *The Chlamydomonas Source Book: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*, Academic Press, San Diego, pp 25-31.

Harris EH. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 363-406.

Hassenfratz MT, Tsou CL y Wilkins TA. 1995. Expression of two related vacuolar H⁺-ATPase 16-kilodalton proteolipid genes is differentially regulated in a tissue-specific manner. *Plant Physiol* 108, 1395-1404.

Hengge-Aronis R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 373-395.

Higgins CF, Hyde SC, Mimmack MM, Gileadi U, Gill DR y Gallagher MP. 1990. Binding protein-dependent transport systems. *J Bioenerg Biomembr* 22, 571-592.

Hogg RW, Voelker C y Carlowitz I. 1991. Nucleotide sequence and analysis of the *mgl* operon of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 229, 453-459.

Hutner SH, Zahalsky AC, Aaronson S y Smillie RM. 1967. En TW Goodwin (Ed), *Biochemistry of Chloroplast*, Academic Press, New York, vol 2, pp 703-705.

Ikeda M, Satoh S, Maeshima M, Mukohata Y y Moritani C. 1999. A vacuolar ATPase and pyrophosphatase in *Acetabularia acetabulum*. *J Exp Bot* 50, 139-140.

Jault J-M, Paik SR, Grodsky NB y Allison WS. 1994. Lowered temperature or binding of pyrophosphate to sites for noncatalytic nucleotides modulates the ATPase activity of beef heart mitochondrial F₁-ATPase by decreasing the affinity of a catalytic site for inhibitory MgADP. *Biochemistry* 33, 14979-14985.

Jones OT y Saunders VA. 1972. Energy-linked electron-transfer reactions in *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochim Biophys Acta* 275, 427-436.

Joshi HM y Tabita FR. 1996. A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation and nitrogen fixation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 14515-14520.

Kalashnikova TY, Milgrom YM y Murataliev MB. 1988. The effect of inorganic pyrophosphate on the activity and Pi-binding properties of mitochondrial F₁-ATPase. *Eur J Biochem* 177, 213-218.

Karlsson J. 1975. Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta Vulgaris* L.). *Biochim Biophys Acta* 399, 356-363.

Karshikoff A y Ladenstein R. 1998. Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. *Protein Engng* 11, 867-872.

Kasai M, Sasaki M, Yamamoto Y y Matsumoto H. 1992. Aluminum stress increases K⁺ efflux and activities of ATP- and PPI-dependent H⁺ pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. *Plant Cell Physiol* 33, 1035-1039.

Kasai M, Sasaki M, Yamamoto Y y Matsumoto H. 1993a. In vivo treatments that modulate PPI-dependent H⁺ transport activity of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. *Plant Cell Physiol* 34, 549-555.

Kasai M, Yamamoto Y, Maeshima M y Matsumoto H. 1993b. Effects of in vivo treatment with abscisic acid and/or cytokinin on activities of vacuolar H⁺ pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles prepared from barley roots. *Plant Cell Physiol* 34, 1107-1115.

Kasai M, Nakamura T, Kudo N, Sato H, Maeshima M y Sawada S. 1998. The activity of the root vacuolar H⁺-pyrophosphatase in Rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. *Plant Cell Physiol* 39, 890-894.

Keasling JD y Hupf GA. 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62, 743-746.

Kempton B, Lupp P y Neumeier D. 1991. A short procedure for Southern blotting on neutral and anionic membranes. *Trends Genet* 7, 109-110.

Kim Y, Kim EJ y Rea PA. 1994a. Isolation and characterization of cDNAs encoding the vacuolar H⁺-pyrophosphatase of *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* 106, 375-382.

Kim EJ, Zhen R-G y Rea PA. 1994b. Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding unit for proton transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6128-6132.

Kim EJ, Zhen R-G y Rea PA. 1995. Site-directed mutagenesis of vacuolar H⁺-phosphatase. Necessity of Cys634 for inhibition by maleimides but not for catalysis. *J Biol Chem* 270, 2630-2635.

Kindle K. 1990. High efficiency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1228-1232.

Kirst GO. 1989. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40, 21-53.

Klemme JH y Gest H. 1971a. Regulatory properties of an inorganic pyrophosphatase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 68, 721-725.

Klemme JH y Gest H. 1971b. Regulation of the cytoplasmic inorganic pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Eur J Biochem* 22, 529-537.

Knaff DB, Whetstone R y Carr JW. 1979. The energy-linked carotenoid band-shift in *Chromatium vinosum*. *Arch Biochem Biophys* 193, 379-384.

Kolakowski LF Jr, Schloesser M y Cooperman BS. 1988. Cloning, molecular characterization and chromosome localization of the inorganic pyrophosphatase (PPA) gene from *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 16, 10441-10452.

Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJM, Palmer JD y Roos DS. 1997. A plastid of probable green algal origin in apicomplexan parasites. *Science* 275, 1485-1489.

Kornberg A. 1994. Inorganic polyphosphate: a molecular fossil come to life. En A Torriani-Gorini, S Silver y E Yagil (Eds), *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 204-208.

Kornberg SR. 1957. Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 26, 294-300.

Kukko-Kalske E y Heinonen J. 1985. Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatase in *Escherichia coli*. *Int J Biochem* 17, 575-580.

Kukko-Kalske E, Lintunen M, Inen MK Lahti R y Heinonen J. 1989. Intracellular PPi concentration is not directly dependent on amount of inorganic pyrophosphate in *Escherichia coli* K12 cells. *J Bacteriol* 171, 4498-4500.

Kulaev IS y Skryabin KG. 1974. Reactions of nonenzymic transphosphorilation performed by high-polymeric polyphosphates and their role in abiogenesis. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 10, 533.

Kulaev IS. 1979. *The biochemistry of inorganic polyphosphates*. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Kulaev IS y Vagabov VM. 1983. Polyphosphate metabolism in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* 24, 83-171.

Kulaev IS, Vagabov VM y Shabalin YA. 1987. New data on biosynthesis of polyphosphates in yeast. En A Torriani-Gorini, FG Rothman, S Silver *et ál.* (Eds), *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 233-238.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 367, 387-389.

Laguri C, Phillips-Jones MK y Williamson MP. 2003. Solution structure and DNA binding of the effector domain from the global regulator PrrA (Reg A) from *Rhodobacter sphaeroides*: insights into DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* 31, 6778-6787.

Lahti R, Pitkäranta T, Valve E, Ilta I, Kukko-kalske E y Heinonen J. 1988. Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 170, 5901-5907.

Lang BF, O'Kelly C, Nerad T, Gray MW y Burger G. 2002. The closest unicellular relatives to animals. *Curr Biol* 12, 1773-1778.

Langhans M, Ratajczak R, Lützelshwab M, Michalke W, Wächter R, Fischer-Schliebs E y Ullrich CI. 2001. Immunolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase and tonoplast-type pyrophosphatase in the plasma membrane of the sieve element-companion cell complex in the stem of *Ricinus communis* L. *Planta* 213, 11-19.

Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth Enzymol* 3, 447-454.

Leach RP, Rogers WJ, Wheeler KP, Flowers TJ y Yeo AR. 1990. Molecular markers for ion compartmentation in cells of higher plants. *J Exp Bot* 41, 1079-1087.

Lehman LJ y Roberts GP. 1991. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* 173, 5705-5711.

Leigh RA, Pope AJ, Jennings IR y Sanders D. 1992. Kinetics of vacuolar H⁺-pyrophosphatase. The roles of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates, activators and inhibitors. *Plant Physiol* 100, 1698-1705.

Le Maire M, Champeil P y Møller JV. 2000. Interaction of membrane proteins and lipid with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* 1508, 86-111.

Lenoir G, Menguy T, Corre F, Montigny C, Pedersen PA, Thynés D, le Maire M y Falson P. 2002. Overproduction in yeast and rapid and efficient purification of the rabbit SERCA1a Ca²⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1560, 67-83.

Lerchl J, König S, Zrenner R y Sonnewald U. 1995. Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplast-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco. *Plant Mol Biol* 29, 833-840.

Liang I, Nielsen GM, Lies DP, Burriss RH, Roberts GP y Ludden PW. 1991. Mutations in the *draT* and *draG* genes of *Rhodospirillum rubrum* result in loss of regulation of nitrogenase by reversible ADP-ribosylation. *J Bacteriol* 173, 6903-6909.

Lipmann F. 1965. Projecting backward from the present stage of evolution of biosynthesis. En SW Fox (Ed), *The origins of prebiological systems and their molecular matrices*, Academic Press, New York, pp 212-226.

Long AR, Williams LE, Nelson SJ y Hall JL. 1995. Localization of membrane pyrophosphatase activity in *Ricinus communis* seedlings. *J Plant Physiol* 146, 629-638.

Losada M, Vargas MA, de la Rosa MA y Florencio FJ. 1999. *Los Elementos y Moléculas de la vida*. Vols I y II, Editorial Rueda, Madrid.

Lundin M, Baltscheffsky H y Ronne H. 1991. Yeast *PPA2* gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *J Biol Chem* 266, 12168-12172.

Lundin M, Deopujari SW, Lichko L, da Silva LP y Baltscheffsky H. 1992. Characterization of a mitochondrial inorganic pyrophosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1098, 217-223.

Luo S, Marchesini N, Moreno SNJ y Docampo R. 1999. A plant-like vacuolar H⁺-pyrophosphatase in *Plasmodium falciparum*. *FEBS Lett* 460, 217-220.

Lüttge U, Pfeifer T, Fischer-Schliebs E y Ratajczak R. 2000. The role of vacuolar malate-transport capacity in crassulacean acid metabolism and nitrate nutrition. Higher malate-transport capacity in ice plant after crassulacean acid metabolism-induction and in tobacco under nitrate nutrition. *Plant Physiol* 124, 1335-1348.

Maathuis FJM, Ichida AM, Sanders D y Schroeder JI. 1997. Roles of higher plant K⁺ channels. *Plant Physiol* 114, 1141-1149.

Mackinney G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* 140, 315-322.

Maeshima M y Yoshida S. 1989. Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from Mung bean. *J Biol Chem* 264, 20068-20073.

Maeshima M. 1990a. Oligomeric structure of H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 1157-1162.

Maeshima M. 1990b. Development of vacuolar membranes during elongation of cells in Mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol* 31, 311-317.

Maeshima M. 1991. H⁺ translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Inhibition by Ca²⁺, stabilization by Mg²⁺ and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases. *Eur J Biochem* 196, 11-17.

Maeshima M, Hara-Nishimura Y, Takeuchi Y, Nishimura M. 1994a. Accumulation of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and H⁺-ATPase during reformation of the central vacuole in germinating pumpkin seeds. *Plant Physiol* 106, 61-69.

Maeshima M, Mimura T y Sato T. 1994b. Distribution of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and a membrane integral protein of a variety of green plants. *Plant Cell Physiol* 35, 323-328.

Maeshima M, Nakanishi Y, Matsuura-Endo C y Tanaka Y. 1996. Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. *J Plant Res* 109, 119-125.

Maeshima M. 2000. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim Biophys Acta* 1465, 37-51.

Malacinski GM y Konetzka WA. 1967. Orthophosphite-nicotinamide adenine dinucleotide oxidoreductase from *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 93, 1906-1910.

Malmberg R, Messing J y Sussex I. 1985. *Molecular Biology of plants. A laboratory course manual*, Cold Spring Harbor, New York.

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL y Tolbert NE. 1987. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 180, 152-157.

Marsh K, González P y Echeverría E. 2000. PPi formation by reversal of the tonoplast-bound H⁺-pyrophosphatase from 'Valencia' orange juice cells. *J Amer Soc Hort Sci* 125, 420-424.

Marsh K, González P y Echeverría E. 2001. Partial characterization of H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from 3 citrus varieties differing in vacuolar pH. *Physiol Plant* 111, 519-526.

Martin W y Borst P. 2003. Secondary loss of chloroplasts in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 765-767.

Maruyama C, Tanaka Y, Takeyasu K, Yoshida M y Sata MH. 1998. Structural studies of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase: sequence analysis and identification of the residues modified by fluorescent cyclohexylcarbodiimide and maleimide. *Plant Cell Physiol* 39, 1045-1053.

Matsumoto H y Chung GC. 1988. Increase in proton-transport activity of tonoplast vesicles as an adaptative response of barley roots to NaCl stress. *Plant Cell Physiol* 29, 1133-1140.

McIntosh MT, Drozdowicz YM, Laroia K, Rea PA y Vaidya AB. 2001. Two classes of plant-like vacuolar-type H⁺-pyrophosphatases in malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol* 114, 183-195.

McIntosh MT y Vaidya AB. 2002. Vacuolar type H⁺ pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa. *Int J Parasitol* 31, 1343-1353.

Meijer HJG, Ter Riet B, Van Himbergen JAJ, Musgrave A y Munnik T. 2002. KCl activates phospholipase D at two different concentration ranges: distinguishing between hyperosmotic stress and membrane depolarization. *Plant J* 31, 51-59.

Metcalf W y Wolfe R. 1998. Molecular genetic analysis of phosphite and hypophosphite oxidation by *Pseudomonas stutzeri* WM88. *J Bacteriol* 180, 5547-5558.

Millner ID y Hall JL. 1995. Properties of proton and sugar transport at the tonoplast of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *Physiol Plant* 94, 399-410.

Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Naturwissenschaften* 191, 144-148.

Mitsuda N, Enami K, Nakata M, Takeyasu K y Sato MH. 2001a. Novel type of *Arabidopsis thaliana* H⁺-PPase is localized to the Golgi apparatus. *FEBS Lett* 488, 29-33.

Mitsuda N, Takeyasu K y Sato MH. 2001b. Pollen-specific regulation of vacuolar H⁺-PPase expression by multiple cis-acting elements. *Plant Mol Biol* 46, 185-192.

Moreira D, Le Guyader H y Philippe H. 2000. The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* 405, 69-72.

Morsomme P, de Kerchove d'Exarde A, de Meester S, Thinés D, Goffeau A y Boutry M. 1996. Single point mutations in various domains of a plant plasma membrane H⁺-ATPase expressed in *Saccharomyces cerevisiae* increase H⁺-pumping and permit yeast growth at low pH. *EMBO J* 15, 5513-5526.

Morsomme P, Chami M, Marco S, Nader J, Ketchum KA, Goffeau A y Rigaud JL. 2002. Characterization of a hyperthermophilic P-type ATPase from *Methanococcus jannaschii* expressed in yeast. *J Biol Chem* 277, 29608-29616.

Müller M, Irkens-Kiesecker U, Rubinstein B and Taiz L. 1996. On the mechanism of hyperacidification in lemon. Comparison of the vacuolar H⁺-ATPase activities of fruits and epicotyls. *J Biol Chem* 271, 1916-1924.

Nakamura Y, Kasamo K, Shimosato N, Sakata M y Ohta E. 1992. Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact Mung bean roots under high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions. *Plant Cell Physiol* 33, 139-149.

Nakanishi Y y Maeshima M. 1998. Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of *Mung bean*. *Plant Physiol* 116, 589-597.

Nakanishi Y, Matsuda N, Aizawa K, Kashiya T, Yamamoto K, Mimura T, Ikeda M y Maeshima M. 1999. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for vacuolar H⁺-pyrophosphatase from *Chara corallina*. *Biochim Biophys Acta* 1418, 245-250.

Nakanishi Y, Saijo T, Wada Y y Maeshima M. 2001. Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *J Biol Chem* 276, 7654-7660.

Newton JW. 1960. Macromolecular variation in the chromatophores of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 42: 34-43.

Nishikawa K, Hosoi K, Suzuki J, Yoshimura S y Horio T. 1973. Formation and decomposition of pyrophosphate related to bacterial photophosphorylation. *J Biochem* 73, 537-553.

Nore BF, Nyrén P, Salih GF y Strid Å. 1990. Photosynthetic formation of inorganic pyrophosphate in phototrophic bacteria. *Photosynth Res* 24, 75-80.

Nyrén P, Hajnal K y Baltscheffsky M. 1984. Purification of the membrane-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 766, 630-635.

Nyrén P, Nore BF y Baltscheffsky M. 1986a. Inorganic pyrophosphate synthesis after a short light flash in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Photobiochem Photobiophys* 11, 189-196.

Nyrén P, Nore BF y Baltscheffsky M. 1986b. Studies on photosynthetic inorganic pyrophosphate formation in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *Biochim Biophys Acta* 851, 276-282.

Nyrén P, Nore BF y Strid Å. 1991. Proton-pumping N,N'-didicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, characterization, and reconstitution. *Biochemistry* 30, 2883-2887.

Nyrén P y Strid Å. 1991. Hypothesis: the physiological role of the membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase in some phototrophic bacteria. *FEBS Lett* 77, 265-270.

Obermeyer G, Sommer A y Bentrup FW. 1996. Potassium and voltage dependence of the inorganic pyrophosphatase of intact vacuoles from *Chenopodium rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 1284, 203-212.

O'Brien W. 1976. A continuous spectrophotometric assay for arginosuccinate synthase based on pyrophosphate formation. *Anal Biochem* 76, 423.

Oelze J. 1976. Early formation of intracytoplasmic membranes in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim Biophys Acta* 436, 95-100.

Offenbacher S y Kline ES. 1984. Evidence for polyphosphate in phosphorylated nonhistone nuclear proteins. *Arch Biochem Biophys* 231, 114-123.

Ohresser M, Matagne RF y Loppes R. 1997. Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the *nit1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet* 31, 264-271.

Ormerod, JG, Ormerod KS y Gest H. 1961. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism. *Arch Biochem* 94, 449-463.

Otoch MLO, Sobreira ACM, de Aragao MEF, Orellano EG, Lima MGS y de Melo DF. 2001. Salt modulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol* 158, 545-551.

Palma DA, Blumwald E y Plaxton WC. 2000. Upregulation of vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase by phosphate starvation of *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures. *FEBS Lett* 486, 155-158.

Palmer JD. 2000. A single birth of all plastids? *Nature* 405, 32-33.

Parks GE, Dietrich MA y Schumaker KS. 2002. Increased vacuolar Na⁺/H⁺ exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. *J Exp Bot* 53, 1055-1065.

Pebay-Peyroula E y Rosenbusch JP. 2001. High-resolution structures and dynamics of membrane protein-lipid complexes: a critique. *Curr Opin Struct Biol* 11, 427-432.

Perera IY, Li X y Sze H. 1995. Several distinct genes encode nearly identical to 16 kDa proteolipids of the vacuolar H⁺-ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 29, 227-244.

Pérez-Castiñeira JR y Apps DK. 1990. Vacuolar H⁺-ATPase of adrenal secretory granules. *Biochem J* 271, 127-131.

Pérez-Castiñeira JR, López-Marqués RL Losada M y Serrano A. 2001. A thermostable K⁺-stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett* 496, 6-11.

Pérez-Castiñeira JR, Alvar J, Ruiz-Pérez LM y Serrano A. 2002. Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 567-573.

Perotte-Piquemal M, Danchin A y Biville F. 1999. Pyrophosphate increases the efficiency of enterobactin-dependent iron uptake in *Escherichia coli*. *Biochimie* 81, 245-253.

Petel G y Gendraud M. 1989. Localization in sucrose gradients of pyrophosphatase activities in the microsomal fraction of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *J Plant Physiol* 134, 466-470.

Popot JL y Engelman DM. 2000. Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Annu Rev Biochem* 69, 881-922.

Preiss J y Greenberger E. 1983. Pyrophosphate may be involved in regulation of bacterial glycogen synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 115, 820-826.

Prieto R, Dubus A, Galván A y Fernández E. 1996. Isolation and characterization of two new negative regulatory mutants for nitrate assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* obtained by insertional mutagenesis. *Mol Gen Genet* 251, 461-471.

Pringle JR, Adams AEM, Drubin DG y Haarer BK. 1991. Immunofluorescent methods in yeast. *Methods Enzymol* 194, 565-602.

Qian Y y Tabita FR. 1996. A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 178, 12-18.

- Randahl H.** 1979. Characterization of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase in *Rhodospirillum rubrum*. *Eur J Biochem* 102, 251-256.
- Rao NN, Roberts MF y Torriani A.** 1985. Amount and chain length of polyphosphates in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions. *J Bacteriol* 162, 242-247.
- Ratajczak R, Hinz G y Robinson DG.** 1999. Localization of pyrophosphatase in membranes of cauliflower inflorescence cells. *Planta* 208, 205-211.
- Rea PA y Poole RJ.** 1985. Proton-translocating inorganic pyrophosphatase in red beet (*Beta vulgaris* L.) tonoplast vesicles. *Plant Physiol* 77, 46-52.
- Rea PA, Britten CJ, Jennings IR, Calvert CM, Skiera LA, Legh RA y Sanders D.** 1992. Regulation of vacuolar H⁺-pyrophosphatase by free calcium. *Plant Physiol* 100, 1706-1715.
- Rea PA, Kim Y, Sarafian V, Poole RJ, Davies JM and Sanders D.** 1992b. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. *Trends Biochem Sci* 17, 348-353.
- Rea PA y Poole RJ.** 1993. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44, 157-180.
- Reeves RE y Guthrie JD.** 1975. Acetate kinase (pyrophosphate), a four pyrophosphate-dependent kinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem Biophys Res Commun* 66, 1389-1395.
- Reeves RE.** 1976. How useful is the energy in inorganic pyrophosphate? *Trends Biochem Sci* 1, 53-55.
- Reitzer L y Schneider BL.** 2001. Metabolic context and possible physiological themes of σ^{54} -dependent genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 422-444.

Reuveni M, Bennet AB, Bressan RA y Hasegawa PM. 1990. Enhanced H⁺-transport capacity and ATP-hydrolysis activity of the tonoplast H⁺-ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiol* 94, 524-530.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M y Stanier RY. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111, 1-61.

Robinson DG, Haschke HP, Hinz G, Hoh B, Maeshima M y Marty F. 1996. Immunological detection of tonoplast polypeptides in the plasma membrane of pea cotyledons. *Planta* 198, 95-103.

Robinson DG, Hoppenrath M, Oberbeck K, Luykx P y Ratajczak R. 1998. Localization of pyrophosphatase and V-ATPase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bot Acta* 111, 108-122.

Rockel B, Ratajczak R, Becker A y Lüttge U. 1994. Changed densities and diameters of intra-membrane tonoplast particules of *Mesembryanthemum crystallinum* in correlation with NaCl-induced CAM. *J Plant Physiol* 143, 318-324.

Rodrigues CO, Scott DA y Docampo R. 1999a. Presence of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in promastigotes of *Leishmania donovani* and its localization to a different compartment from the vacuolar H⁺-ATPase. *Biochem J* 340, 759-766.

Rodrigues CO, Scott DA y Docampo R. 1999b. Presence of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. *Mol Cell Biol* 19, 7712-7723.

Rodrigues CO, Scott DA, Bailey BN, De Souza W, Benchimol M, Moreno B, Urbina JA, Oldfield E, Moreno SN. 2000. Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PPi) in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic targets. *Biochem J* 349, 737-745.

Romero I, Gómez-Priego A y Celis H. 1991. A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*. *J Gen Microbiol* 137, 2611-2616.

Ros R, Romieu C, Gibrat R y Grignon C. 1995. The plant inorganic pyrophosphatase does not transport K^+ in vacuole membrane vesicles multilabeled with fluorescent probes for H^+ , K^+ , and membrane potential. *J Biol Chem* 270, 4368-4374.

Rosenbusch JP. 2001. Stability of membrane proteins: relevance for the selection of appropriate methods for high-resolution structure determinations. *J Struct Biol* 136, 144-157.

Rosing J, Kayalar C y Boyer PD. 1977. Evidence for energy-dependent change in phosphate binding for mitochondrial oxidative phosphorylation based on measurements of medium and intermediate phosphate-water exchanges. *J Biol Chem* 252, 2478-2485.

Ruiz FA, Marchesini N, Seufferheld M, Govindjee y Docampo R. 2001. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *J Biol Chem* 276, 46196-46203.

Sakakibara Y, Kobayashi H y Kasamo K. 1996. Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H^+ -pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 31, 1029-1038.

Salih GF y Nyren P. 1990. Determination of the intracellular concentration of inorganic pyrophosphate in *Rhodospirillum rubrum*. *Curr Res Photosynth* 3, 209-212.

Salminen T, Kapyla J, Heikinheimo P, Kankare J, Goldman A, Heinonen J, Baykov AA, Cooperman BS y Lahti R. 1995. Structure and function analysis of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase: is a hydroxide ion the key to catalysis? *Biochemistry* 34, 782-791.

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger F, Nicklen S y Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

Sarafian V y Poole RJ. 1989. Purification of an H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of red beet. *Plant Physiol* 91, 34-38.

Sarafian V, Kim Y, Poole RJ y Rea PA. 1992a. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 1775-1779.

Sarafian V, Potier M y Poole RJ. 1992b. Radiation-inactivation analysis of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase from *Beta vulgaris* L. Functional sizes for substrate hydrolysis and for H⁺-transport. *Biochem J* 283, 493-497.

Sasaki T, Kurano N y Miyachi S. 1998. Cloning and characterization of high-CO₂-specific cDNAs from a marine algae, *Chlorococcum littorale*, and effect of CO₂ concentration and iron deficiency on the gene expression. *Plant Cell Physiol* 39, 131-138.

Sasaki T, Pronina NA, Maeshima M, Iwasaki I, Kurano N y Miyachi S. 1999. Development of vacuoles and vacuolar H⁺-ATPase activity under extremely high CO₂ conditions in *Chlorococcum littorale* cells. *Plant Biol* 1, 68-75.

Sato MH, Maeshima M, Ohsumi Y y Yoshida M. 1991. Dimeric structure of H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from pumpkin vacuolar membranes. *FEBS Lett* 290, 177-180.

Sato MH, Kasahara M, Ishii N, Homareda H, Matsui H y Yoshida M. 1994. Purified vacuolar inorganic pyrophosphatase consisting of a 75-kDa polypeptide can pump H⁺ into reconstituted proteoliposomes. *J Biol Chem* 269, 6725-6728.

Scarborough GA. 1985. Binding energy, conformational change, and the mechanism of transmembrane solute movements. *Microbiol Rev* 49, 214-231.

Schägger H y von Jagow G. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-379.

Schiestl RH y Gietz RD. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16, 339-346.

Schmidt AL y Briskin DP. 1993a. Energy transduction on tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue: H⁺/substrate stoichiometries for the H⁺-ATPase and H⁺-PPase. *Arch Biochem Biophys* 301, 165-173.

Schmidt AL y Briskin DP. 1993b. Reversal of the red beet tonoplast H⁺-ATPase by a pyrophosphate-generated proton electrochemical gradient. *Arch Biochem Biophys* 306, 407-414.

Schneider JC y Guarente A. 1991. Vectors for expression of cloned genes in yeast: regulation, overproduction, and underproduction. *Methods Enzymol* 194, 373-388.

Schocke L y Schink B. 1998. Membrane-bound proton-translocating pyrophosphatase of *Syntrophus gentianae*, a syntrophically benzoate-degrading fermenting bacterium. *Eur J Biochem* 256, 589-594.

Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A y Simons K. 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5795-5800.

Schultz A. 2003. Tesis Doctoral: *Cloning, expression and mutagenesis of the gene encoding the proton-pumpng inorganic pyrophosphatase from Rhodospirillum rubrum. Studies on pyrophosphate hydrolysis and electrogenic proton-translocation*, Department of Biochemistry and Biophysics, Universidad de Estocolmo, Estocolmo, Suecia.

Schultz JE y Weaver PF. 1982. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol* 149, 181-190.

Schwarm HM, Vigneschow H y Knobloch K. 1986. Kinetic characterization and partial purification of the membrane-bound inorganic pyrophosphatase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 367, 127-133

Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu H-G, Moreno SNJ y Docampo R. 1998. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 273, 22151-22158.

Scripture JB, Voelker C, Miller S, O'Donnell RT, Polgar L, Rade J, Horazdovsky BF y Hogg RW. 1987. High-affinity L-arabinose transport operon. Nucleotide sequence and analysis of gene products. *J Mol Biol* 197, 37-46.

Serrano A (Ed). 2001. *Trends in Inorganic Pyrophosphatases Research. Proceedings of the Second International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases*, Universidad de Sevilla-CSIC, ISBN 84-699-4960-8.

Serrano R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr Top Cell Regul* 23, 87-126.

Serrano R y Villalba J-M. 1995. Expression and localization of Plant Membrane Proteins in *Saccharomyces*. *Methods Cell Biol* 50, 481-496.

Shakov YA, Nyrén P y Baltscheffsky M. 1982. Reconstitution of highly purified proton-translocating pyrophosphatase from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett* 146, 177-180.

Sherman F, Fink GR y Hicks JB. 1985. *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor, New York, pp 90-93.

Sherman LA y Clayton RK. 1972. The lack of carotenoid band shifts in a non-photosynthetic reaction centerless mutant of *Rhodospseudomonas spheroides*. *FEBS Lett* 22, 127-132.

Shintani T, Uchiumi T, Yonezawa T, Salminen A, Baykov A, Lahti R y Hachimori A. 1998. Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence of a new family of enzymes. *FEBS Lett* 439, 263-266.

Shirakate K, Kanayama Y, Maeshima M y Yamaki S. 1997. Changes in H⁺-pumps and tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant Cell Physiol* 38, 1039-1045.

Simon R, Prierer U y Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Biotechnology* 1, 784-791.

Sizova I, Fuhrmann M y Hegemann P. 2001. A *Streptomyces rimosus aphVIII* gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 277, 221-229.

Slayman CL. 1987. The plasma membrane ATPase of *Neurospora*: a proton-pumping electroenzyme. *J Bioenerg Biomembr* 19, 1-20.

Smart LB, Vojdani F, Maeshima M y Wilkins TA. 1998. Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol* 116, 1539-1549.

Smith AC, Uribe EG, Ball E, Heuer S y Lüttge U. 1984. Characterization of the vacuolar ATPase activity of the crassulacean-acid-metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana* receptor modulating. *Eur J Biochem* 141, 415-420.

Smyth DA y Black Jr. CC. 1984. Measurements of the pyrophosphate content of plant tissues. *Plant Physiol* 75, 862-864.

Sosa A y Celis H. 1995. H⁺/PPi stoichiometry of membrane-bound pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Biochem Biophys* 316, 421-427.

Stechmann A y Cavalier-Smith T. 2002. Rooting the eukaryotic tree by using a derived gene fusion. *Science* 297, 89-91.

Stechmann A y Cavalier-Smith T. 2003. Phylogenetic analysis of eukaryotes using heat-shock protein Hsp90. *J Mol Evol* 57, 408-419.

Stevens TH y Forgac M. 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 779-808.

Stitt M. 1998. Polyphosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Bot Acta* 111, 167-175.

Strid Å, Karlsson I-M, Baltscheffsky M. 1987. Demonstration of Δ pH- and $\Delta\psi$ -induced synthesis of inorganic pyrophosphatase in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *FEBS Lett* 224, 348-352.

Sueoka N, Chiang KS y Kates JR. 1967. Desoxiribonucleic acid and replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *J Mol Biol* 25, 47-66.

Suzuki K, Yamagiwa Y, Matsui T, Yoshida K. 1994. Restriction enzyme-resistant high molecular weight telomeric DNA fragments in tobacco. *DNA Res* 1, 129-38.

Suzuki Y, Kanayama Y, Shiratake K y Yamaki S. 1999. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase purified from pear fruit. *Phytochemistry* 50, 535-539.

Swanson SJ y Jones RL. 1996. Gibberelic acid induces vacuolar acidification in barley aleurone. *Plant Cell* 8, 2211-2221.

Takeshige K y Tazawa M. 1989. Determination of the inorganic pyrophosphate level and its subcellular localization in *Chara corallina*. *J Biol Chem* 264, 3262-3266.

Tanaka Y, Chiba K, Maeda M y Maeshima M. 1993. Molecular cloning of cDNA for vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase in *Hordeum vulgare*. *Biochem Biophys Res Commun* 190, 1110-1114.

Terkeltaub RA. 2001. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1-C11.

Terrier N, Deguilloux C, Sauvage F-X, Martinoia E y Romieu C. 1998. Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. *Plant Physiol Biochem* 36, 367-377.

Terrier N, Sauvage F-X, Ageorges A y Romieu C. 2001. Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta* 213, 20-28.

Towner P. Purification of DNA. En TA Brown (Ed), *Essential Molecular Biology, a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, vol 1, pp 47-68.

Tsujimoto Y, Watanabe A, Nakano K, Watanabe K, Matsui H, Tsuji K Tsukihara T y Suzuki Y. Gene cloning, expression and crystallization of a thermostable exo-insulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289. *Appl Microbiol Biotechnol* 62, 180-185.

Tzeng CM, Yang CY, Yang SJ, Jiang SS, Kuo SY, Hung SH, Ma JT y Pan RL. 1996. Subunit structure of vacuolar proton-pyrophosphatase as determined by radiation inactivation. *Biochem J* 316, 143-147.

Ullrich CI y Novacky AJ. 1990. Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$ and NO_3^- uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnobium stoloniferum*. *Plant Physiol* 94, 1561-1567.

Van der Hoek C, Mann DG y Jahns HM. 1995. *Algae: an introduction to phicology*, Cambridge University Press, Cambridge.

Villalba JM, Palmgren MG, Berberian GE, Ferguson C y Serrano R. 1992. Functional expression of plant plasma membrane H^+ -ATPase in yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 267, 12341-12349.

Viollier PH, Kelemen GH, Dale GE, Nguyen KT, Buttner MJ and Thompson CJ. 2003. Specialized osmotic stress response systems involve multiple SigB-like sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* 47, 699-714.

Vogt G, Woell S y Argos P. 1997. Protein thermal stability, hydrogen bonds and ion pairs. *J Mol Biol* 269, 631-643.

Waehneltd TV y Fox S. 1967. Phosphorilation of nucleosides with polyphosphoric acid. *Biochim Biophys Acta* 134, 9-16.

Wagner GJ and Mullready P. 1983. Characterization of nucleotide-specific Mg^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -pyrophosphatase of tonoplast. *Biochim Biophys Acta* 728: 267-280.

Walker RR y Leigh RA. 1981. Mg^{2+} -dependent cation-stimulated inorganic pyrophosphatase associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Planta* 153, 150-155.

Walker RF, Keeling PJ, van Dooren GG y McFadden GI. 2003. Comment on "A green algal apicoplast ancestor". *Science* 301, 49a.

- Wang BS, Rataiczak R y Zhang JH.** 2000. Activity, amount and subunit composition of vacuolar-type H⁺-ATPase and H⁺-PPase in wheat roots under severe NaCl stress. *J Plant Physiol* 157, 109-116.
- Wang B, Lüttge U y Rataiczak R.** 2001. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J Exp Bot* 52, 2355-2365.
- Wanner BL y Chang B-D.** 1987. The *phoBR* Operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 169, 5569-5574.
- Wanner BL.** 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 51, 47-54.
- Wanner BL.** 1996. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. En FC Neidhardt, JL Ingraham, KB Low, B Magasanik, M Schaechter y HE Umbarger (Eds), *Escherichia coli and Salmonella tryphimurium, cellular and molecular biology* (2^a Ed), American Society for Microbiology, Washington DC.
- Weiner H, Stitt M y Heldt HW.** 1987. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim Biophys Acta* 893, 13-21.
- Williams LE, Nelson SJ y Hall JL.** 1990. Characterization of solute transport in plasma membrane vesicles isolated from cotyledons of *Ricinus communis* L. *Planta* 182, 532-539.
- Wilson RJM.** 2002. Progress with parasite plastids. *J Mol Biol* 319, 257-274.
- Winston F, Chumley F y Fink GR.** 1983. Eviction and transplacement of mutant genes in yeast. En: *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, vol 101, pp 211-227.

Wood HG y Clark JE. 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu Rev Biochem* 57, 235-260.

Xiong A, Singh VK, Cabrera G y Jayaswal RK. 2000. Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 146, 659-68.

Xu X, Abo M, Okubo A y Yamakazi S. 2001a. Salt-stress responsive membrane proteins in *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* IL106. *J Biosci Bioeng* 91, 228-230.

Xu XY, Kadokura H, Okubo A, Kitamoto K y Jamakazi S. 2001b. Cloning and sequencing of a gene encoding a novel salt stress-induced membrane protein from *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56, 442-447.

Yamagata Y, Watanabe H, Saitoh M y Namba T. 1991. Volcanic production of polyphosphates and its relevance in prebiotic evolution. *Nature* 352, 516-519.

Yang SJ, Jiang SS, Kuo SY, Hung SH, Tam MF y Pan RL. 1999. Localization of a carboxylic residue possibly involved in the inhibition of vacuolar H⁺-pyrophosphatase by N, N'-dicyclohexylcarbodi-imide. *Biochem J* 342, 641-646.

Yang C, Hua Q y Shimizu K. 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochem Eng J* 6, 87-102.

Yazaki Y, Asukagawa N, Ishikawa E, Ohta E y Sakata M. 1988. Estimation of cytoplasmic free Mg²⁺ levels and phosphorylation potentials in Mung bean root tips by in vivo ³¹P NMR spectroscopy. *Plant Cell Physiol* 29, 919-924.

Zhen RG, Kim EJ y Rea PA. 1997. Acidic residues necessary for pyrophosphate-energized pumping and inhibition of the vacuolar H⁺-pyrophosphatase by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J Biol Chem* 272, 22340-22348.

Zingarelli L, Anzani P y Lado P. 1994. Enhanced K^+ -stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cells of *Acer pseudoplatanus*. *Physiol Plant* 91, 510-516.