



ESTUDIOS FUNCIONALES DE LAS PIROFOSFATASAS INORGÁNICAS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS

Trabajo presentado para optar al grado de

Doctor en Bioquímica por el Licenciado

Juan Manuel Madroñal de Sancha

Directores:

Aurelio Serrano Delgado

José Román Pérez Castiñeira

Investigador Científico del CSIC

Profesor Titular de la Universidad de
Sevilla

Tutor:

Jose María Romero Rodríguez

Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Sevilla

ÍNDICE GENERAL**1. INTRODUCCIÓN**

1.1 El fósforo como bioelemento	1
1.2 El pirofosfato inorgánico	2
1.2.1 <u>Generalidades</u>	2
1.2.2 <u>El pirofosfato como regulador</u>	3
1.2.3 <u>Contenido celular de pirofosfato</u>	5
1.2.4 <u>Producción de pirofosfato en el anabolismo celular</u>	6
1.2.5 <u>El pirofosfato en el compartimento nuclear</u>	8
1.3 Transporte núcleo-citoplasma	9
1.4 Enzimas que hidrolizan pirofosfato: pirofosfatasas inorgánicas	12
1.4.1 <u>Pirofosfatasas solubles</u>	13
1.4.1.1 Pirofosfatasas solubles Familia I	14
1.4.1.2 Pirofosfatasas solubles Familia II	15
1.4.2 <u>Pirofosfatasas de membrana translocadoras de iones</u>	18
1.4.2.1 Pirofosfatasas de membrana translocadoras de sodio	21
1.5 Pirofosfato en el organismo modelo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
1.6 Microalgas	24
1.6.1 <u>Cianobacterias</u>	25
1.6.1.1 Cianobacterias usadas en este estudio	26
1.6.1.2 Respuesta a estrés salino en Cianobacterias	27
1.6.2 <u>Microalgas eucarióticas</u>	28
1.6.2.1 Microalgas eucarióticas utilizadas en este trabajo	29
1.7 Objetivos de la Tesis Doctoral	36

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Organismos y condiciones de cultivo	39
2.1.1 <u><i>Escherichia coli</i></u>	39
2.1.1.1 Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas	39
2.1.1.2 Cultivo de <i>E. coli</i> en medio líquido	39
2.1.1.3 Cultivo de <i>E. coli</i> en medio sólido	39
2.1.2 <u><i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	40
2.1.2.1 Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas	40
2.1.2.2 Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medio líquido	40
2.1.2.3 Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido	41
2.1.2.4 Cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en medios especiales	41
2.1.3 <u>Cianobacterias</u>	42
2.1.3.1 Estirpes de Cianobacterias utilizadas	42
2.1.3.2 Cultivo de <i>Synechocystis</i> en medio líquido	42
2.1.3.3 Cultivo de <i>Synechocystis</i> en medio sólido	43
2.1.4 <u>Microalgas eucarióticas</u>	43
2.1.4.1 Estirpes de microalgas eucarióticas utilizadas	43
2.1.4.2 Cultivo de microalgas eucarióticas en medio líquido	44
2.1.4.3 Cultivo de microalgas eucarióticas en medio sólido	45
2.1.4.4 Condiciones especiales de cultivo	45
2.1.5 <u><i>Arabidopsis thaliana</i></u>	46
2.1.5.1 Cepas de <i>A. thaliana</i> utilizadas	46
2.1.5.2 Esterilización y germinación de semillas en placas de Petri	47
2.1.6 <u>Curvas de crecimiento de los cultivos</u>	48
2.2 Recogida de células	49
2.3 Preparación de extractos celulares	49
2.3.1 <u>Preparación de extractos celulares de <i>S. cerevisiae</i></u>	49
2.3.1.1 Obtención de fracciones solubles	49

2.3.1.2 Fraccionamiento subcelular: Obtención de fracciones citosólicas y nucleares	50
2.3.1.3 Preparación de preparaciones de membranas y extractos solubles	51
2.3.2 <u>Preparación de extractos celulares de microalgas eucarióticas</u>	52
2.3.3 <u>Preparación de extractos celulares de <i>Synechocystis</i></u>	52
2.3.3.1 Obtención de extractos crudos	52
2.3.3.2 Obtención de preparaciones de membranas	53
2.3.4 <u>Preparación de extractos celulares de <i>A. thaliana</i></u>	54
2.3.4.1 Preparación de preparaciones de membranas y extractos celulares	54
2.4 Determinaciones de las actividades enzimáticas	54
2.4.1 <u>Determinación de la actividad pirofosfatasa</u>	54
2.4.1.1 Actividad pirofosfatasa soluble	55
2.4.1.2 Actividad pirofosfatasa asociada a membranas	56
2.4.2 <u>Determinación de la actividad ATPasa</u>	56
2.4.3 <u>Ensayos de bombes de protones a través de membranas</u>	57
2.5 Determinación de clorofila	58
2.6 Análisis de proteínas	58
2.6.1 <u>Determinación de proteínas</u>	58
2.6.2 <u>Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</u>	59
2.6.2.1 Preparación de las muestras	59
2.6.2.2 Desarrollo de electroforesis en gel mediante el método de Laemmli	59
2.6.2.3 Teñido de geles de poliacrilamida	60
2.6.3 <u>Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa</u>	60
2.6.4 <u>Inmunodetección por Western blot</u>	61
2.7 Métodos genéticos de manipulación del DNA	62
2.7.1 <u>Plásmidos utilizados</u>	62
2.7.2 <u>Métodos de transgénesis</u>	64
2.7.2.1 Preparación de células de <i>E. coli</i> para transformación por electroporación	64
2.7.2.2 Transformación de células de <i>E. coli</i> por electroporación	64

2.7.2.3 Transformación de células de <i>E. coli</i> por choque térmico	65
2.7.2.4 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	65
2.7.2.5 Transformación de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	66
2.7.2.6 Transformación de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	66
2.7.3 <u>Aislamiento del DNA</u>	67
2.7.3.1 Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a pequeña escala	67
2.7.3.2 Aislamiento del DNA genómico de levadura	68
2.7.3.3 Aislamiento del DNA genómico de <i>Synechocystis</i>	69
2.7.3.4 Aislamiento del DNA genómico de microalgas eucarióticas	69
2.8 Análisis del DNA	70
<u>2.8.1 Amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa</u>	70
2.8.1.1 Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo	71
<u>2.8.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa</u>	73
<u>2.8.3 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa</u>	74
<u>2.8.4 Determinación de la concentración y pureza del DNA</u>	74
<u>2.8.5 Restricción del DNA</u>	75
<u>2.8.6 Desfosforilación de extremos de DNA</u>	75
<u>2.8.7 Formación de extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes</u>	76
<u>2.8.8 Formación de extremos romos a partir de extremos 5' protuberantes</u>	77
<u>2.8.9 Ligación de fragmentos de DNA</u>	77
<u>2.8.10 Clonación de fragmentos de DNA mediante el sistema Gateway</u>	77
<u>2.8.11 Secuenciación automática del DNA mediante marcaje fluorescente</u>	79
2.9 Aislamiento y análisis del RNA	80
2.9.1 <u>Aislamiento de RNA de microalgas eucarióticas</u>	80
2.9.2 <u>Estimación de la concentración, pureza e integridad del RNA</u>	81
2.9.3 <u>Obtención de cDNA a partir de RNA</u>	81
2.10 Análisis de secuencias de DNA y proteínas mediante métodos informáticos	82
2.11 Microscopía	82
2.11.1 <u>Análisis de localización subcelular mediante microscopía de fluorescencia</u>	82

2.11.2 <u>Ensayos cualitativos de acidificación del lumen vacuolar en levadura</u>	83
2.12 Estadística	83
3. RESULTADOS	
3.1 Expresión heteróloga de la sPPasa de <i>Moorella thermoacetica</i> en levadura	85
3.1.1 <u>Efecto de la fusión con el dominio CBS sobre la funcionalidad de la sPPasa Ipp1p de <i>S. cerevisiae</i></u>	93
3.2 Análisis de expresión de la región promotora del gen <i>IPP1</i>	97
3.2.1 <u>Análisis de la expresión del gen reportero γEGFP3 por la región promotora del gen <i>IPP1</i></u>	99
3.2.2 <u>Análisis de la expresión del gen <i>IPP1</i> bajo el control de las secuencias promotoras analizadas en este trabajo</u>	102
3.3 Implicaciones funcionales de variaciones inducidas en la distribución nucleocitoplásmica de la sPPasa Ipp1p de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	106
3.4 Reproducción del escenario metabólico del PPI en células vegetales utilizando <i>S. cerevisiae</i> como sistema modelo eucariótico	119
3.4.1 <u>Estudio funcional de la mPPasa AVP1 en levaduras con la distribución subcelular de Ipp1p alterada</u>	120
3.4.2 <u>Papel de AVP1 en la tolerancia de la planta modelo <i>Arabidopsis thaliana</i> a los fungicidas de tipo amino</u>	125
3.5 Regulación de las mPPasas de microalgas eucarióticas por condiciones ambientales tróficas y de estrés	131
3.5.1 <u>Efecto de la salinidad en microalgas que proliferan en hábitats diversos y poseen distintos tipos de H⁺-PPasas</u>	131
3.5.1.1 Caracterización de las actividades PPasa soluble y ligada a membrana de las especies de microalgas estudiadas	133
3.5.1.2 Efecto del potasio sobre la actividad PPasa asociada a las fracciones de membrana de las diferentes microalgas estudiadas	135
3.5.1.3 Efecto del sodio sobre la actividad PPasa asociada a las fracciones de membrana de las diferentes microalgas estudiadas	137
3.5.1.4 Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de mPPasa de las distintas especies de microalgas analizadas	140
3.5.2 <u>Efecto de la salinidad en microalgas eucarióticas marinas que poseen posibles Na⁺-PPasas</u>	149

3.5.2.1 Evidencias de que la actividad mPPasa de las tres microalgas marinas (prasinofícea, bacillariofícea, rodofita) estudiadas es debida a Na ⁺ -PPasas	150
3.5.2.2 Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa de preparaciones de membranas de las microalgas marinas estudiadas	153
3.5.2.3 Efecto del sodio en el medio de cultivo sobre la actividad mPPasa asociada a membranas de las microalgas marinas estudiadas	156
3.5.3 <u>Las microalgas Eustigmatofíceas marinas poseen una actividad mPPasa independiente de K⁺ asociada a membranas con alta tolerancia a sodio que es inducida por choque salino</u>	158
3.5.4 <u>Efecto regulador de las condiciones tróficas de cultivo sobre las H⁺-PPasas de microalgas</u>	163
3.5.4.1 Efecto de la fuente de nitrógeno combinado sobre las actividades sPPasa y mPPasa de <i>C. reinhardtii</i>	169
3.6 Expresión heteróloga de Na⁺-PPasas de distintas especies de algas eucarióticas marinas en <i>S. cerevisiae</i>	172
3.7 Obtención de cepas transformantes de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> con expresión alterada del gen que codifica la H⁺-PPasa	176
3.7.1 <u>Obtención de cepas transformantes de <i>C. reinhardtii</i> por silenciamiento génico mediante microRNAs artificiales (amiRNA)</u>	176
3.7.2 <u>Obtención de construcciones génicas para obtener transformantes de <i>C. reinhardtii</i> sobreexpresores de quimeras de PPasas con la proteína fluorescente amarilla YFP</u>	184
3.8 Expresión funcional de mPPasas heterólogas en la cianobacteria dulceacuícola <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803, y efectos sobre su tolerancia a la salinidad	187

4. DISCUSIÓN

- 4.1 Expresión heteróloga de la sPPasa de *Moorella thermoacetica* en levadura 201
- 4.2 Análisis de expresión de la región promotora del gen *IPP1* 202
- 4.3 Implicaciones funcionales de variaciones inducidas en la distribución núcleo-citoplásmica de la sPPasa Ipp1p de *Saccharomyces cerevisiae* 206
- 4.4 Reproducción del escenario metabólico del PPI de células vegetales utilizando *S. cerevisiae* como modelo eucariótico 208
- 4.5 Regulación de las mPPasas de microalgas eucarióticas por condiciones ambientales tróficas y de estrés 211
- 4.6 Obtención de cepas transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii* con expresión alterada del gen que codifica la H⁺-PPasa 216
- 4.7 Expresión funcional de mPPasas heterólogas en la cianobacteria dulceacuícola *Synechocystis* sp. PCC6803, y efectos sobre su tolerancia a la salinidad 218

5. CONCLUSIONES

6. DATOS SUPLEMENTARIOS

7. BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS**1. INTRODUCCIÓN**

Figura 1.1: Papel central del PPi en el anabolismo celular	7
Figura 1.2: Mecanismo general de acción del transporte nucleo-citoplásmico medidado por señal NLS	12
Figura 1.3: Mecanismo general de acción de las PPasas solubles Familia I	14
Figura 1.4: Topología de las H ⁺ -PPasas	19
Figura 1.5: Árbol filogenético del grupo de las mPPasas generado con MEGA4	22
Figura 1.6: Mecanismo de acción de las Na ⁺ -PPasas	23
Figura 1.7: Estructura de membranas de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	26
Figura 1.8: Especies de microalgas eucarióticas utilizadas en este trabajo	30

3. RESULTADOS

Figura 3.1.1: Representación esquemática de las construcciones de MtPPasa utilizadas para su expresión heteróloga en levadura	87
Figura 3.1.2: Complementación funcional de la deficiencia en sPPasa Ipp1p cromosómica de la cepa YPC3 por distintas construcciones de la sPPasa de <i>M. thermoacetica</i> (MtPPasa)	88
Figura 3.1.3: Niveles de proteína y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de las diferentes cepas YPC3 cultivadas en glucosa	89
Figura 3.1.4: Niveles de polipéptidos de sPPasas Familia II en extractos celulares totales de cepas transformantes derivadas de BJ5459, y expresoras de las diferentes quimeras	91
Figura 3.1.5: Niveles de proteína y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de las diferentes cepas YPC3 cultivadas en glucosa	92
Figura 3.1.6: Representación esquemática de las construcciones de <i>IPP1</i> con el dominio CBS utilizadas para su expresión heteróloga en levadura	93
Figura 3.1.7: Complementación funcional de la deficiencia en sPPasa Ipp1p cromosómica de la cepa YPC3 por distintas quimeras de Ipp1p y el dominio CBS	94
Figura 3.1.8: Niveles de proteína y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de las diferentes cepas YPC3 cultivadas en glucosa	95
Figura 3.2.1: Definición de la región intergénica de estudio	98

Figura 3.2.2: Fragmentos de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i> , obtenidos mediante PCR, de las distintas versiones del promotor del gen <i>IPP1</i> analizadas en este trabajo, separadas mediante electroforesis en gel de agarosa	99
Figura 3.2.3: Análisis de la expresión del gen reportero <i>yEGFP</i> bajo el control de secuencias promotoras de <i>IPP1</i>	101
Figura 3.2.4: Análisis de la expresión del gen <i>IPP1</i> bajo el control de las secuencias promotoras analizadas en este trabajo	103
Figura 3.3.1: Alineamiento de las secuencias de distintas sPPasas de organismos procariontes y eucariontes en la región que contiene una secuencia consenso NLS y estructura del dímero de Ipp1p (estructura PDB 2IHP)	107
Figura 3.3.2: Construcciones quiméricas de Ipp1p con localización núcleo-citoplásmica modificada utilizadas en este trabajo	109
Figura 3.3.3: Imágenes de microscopía de fluorescencia de cepas de <i>S. cerevisiae</i> derivadas de YPC3 transformadas con construcciones quiméricas de Ipp1p que presentan diferentes distribuciones subcelulares	109
Figura 3.3.4: Curvas de crecimiento de cepas de <i>S. cerevisiae</i> derivadas de YPC3 transformadas con construcciones quiméricas de Ipp1p con diferentes distribuciones subcelulares	110
Figura 3.3.5: Niveles de proteína y de actividad específica sPPasa en los extractos celulares de las cepas YPC3 de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con las distintas versiones de Ipp1p	112
Figura 3.3.6: Medidas de actividad específica sPPasa y niveles de polipéptidos de las distintas quimeras Ipp1p en las fracciones nucleares y citoplásmicas de cepas YPC3 de <i>S. cerevisiae</i> transformada con las construcciones génicas generadas en este trabajo	114
Figura 3.3.7: Análisis de los parámetros cinéticos de las quimeras de Ipp1 con distinta localización subcelular	115
Figura 3.3.8: Efecto diferencial del inhibidor del proteasoma MG132 sobre las quimeras de Ipp1p con distinta distribución núcleo-citoplásmica, en función de su localización subcelular	117
Figura 3.3.9: Interacción entre Ipp1p y los componentes del sistema de degradación proteasomal Ubiquitina y Ubp3p	118
Figura 3.4.1: Complementación funcional en levadura de la deficiencia en V-ATPasa por una H ⁺ -PPasa quimérica vegetal (TcGFPVAVP1) co-expresada con variantes quiméricas de Ipp1p con diferente localización núcleo-citoplásmica	122
Figura 3.4.2: Niveles de actividad PPasa y de bombeo de protones en las cepas transformantes que co-expresan una H ⁺ -PPasa quimérica vegetal (TGA) y variantes quiméricas de Ipp1p con diferente localización núcleo-citoplásmica	124
Figura 3.4.3: Detección de proteína Ipp1p en preparaciones de membranas totales de cada una de las cepas mediante <i>Western blot</i> utilizando un anticuerpo comercial específico anti-Ipp1p	125

Figura 3.4.4: Análisis por microscopía de fluorescencia de la acumulación intracelular de quinacrina en cepas transformantes YPC3 de <i>S. cerevisiae</i> expresoras de Ipp1p y de la H ⁺ -PPasas quimérica TcRedAVP1 tratadas con Tridemorph	127
Figura 3.4.5: Medidas de actividad mPPasa, ATPasa y de bombeo de protones en fracciones particuladas de membrana de cepas transformantes YPC3 y SAH6 de <i>S. cerevisiae</i> expresoras de TcGFPVP1 y tratadas con Tridemorph	128
Figura 3.4.6: Efecto del tratamiento con Tridemorph sobre la longitud de la raíz e hipocótilo de plántulas de <i>A. thaliana</i>	130
Figura 3.5.1: Niveles de actividad PPasa tanto soluble (sPPasa) como asociada a membrana (mPPasa) en extractos celulares de las diferentes especies indicadas cultivadas en sus condiciones óptimas específicas de cultivo	135
Figura 3.5.2: Estimulación por potasio de la actividad mPPasa asociada a membranas de cada una de las especies de microalgas estudiadas	136
Figura 3.5.3: Efecto de la adición de NaCl en la mezcla de ensayo sobre los niveles de actividad mPPasa de las preparaciones de membranas de las distintas especies analizadas en este trabajo	138
Figura 3.5.4: Parámetros cinéticos de la actividad mPPasa y efecto sobre ellos de la presencia en el ensayo de 50 mM NaCl	139
Figura 3.5.5: Efecto de la salinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad y proteína H ⁺ -PPasa de la clorofita dulceacuícola <i>C. reinhardtii</i>	141
Figura 3.5.6: Efecto de las condiciones de hipersalinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad y proteína H ⁺ -PPasa de la clorofita marina <i>C. euryale</i>	142
Figura 3.5.7: Efecto de la salinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad y proteína H ⁺ -PPasa de la clorofita dulceacuícola <i>Chlorella</i> sp. N64A	144
Figura 3.5.8: Efecto de las condiciones de hipersalinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad H ⁺ -PPasa de la clorofita marina <i>Ch. salina</i>	145
Figura 3.5.9: Efecto de las condiciones de hipersalinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad y proteína H ⁺ -PPasa de la rodofita termoacidófila <i>G. sulphuraria</i>	147
Figura 3.5.10: Niveles de actividades sPPasa y mPPasa en las especies de microalgas marinas utilizadas en este estudio	151
Figura 3.5.11: Caracterización de la dependencia de potasio de la actividad mPPasa de las especies de microalgas marinas estudiadas	153
Figura 3.5.12: Efecto de la presencia de NaCl en el ensayo de actividad mPPasa de preparaciones de membranas de tres microalgas marinas con genes de Na ⁺ -PPasas en sus genomas	155

Figura 3.5.13: Efecto de un choque hipersalino en el medio sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de actividad mPPasa de <i>O. tauri</i> , <i>Ph. tricornutum</i> y <i>P. purpureum</i>	157
Figura 3.5.14: Niveles del polipéptido de mPPasa en preparaciones de membranas de células de <i>O. tauri</i> sometidas o no a un choque hipersalino	158
Figura 3.5.15: Niveles de actividades sPPasa y mPPasa en extractos celulares de las especies de microalgas Eustigmatofíceas marinas utilizadas en este estudio	159
Figura 3.5.16: Efecto de la salinidad sobre la actividad mPPasa de la eustigmatofícea <i>N. gaditana</i>	162
Figura 3.5.17: Efecto de las condiciones tróficas sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de las PPasas de <i>C. reinhardtii</i>	165
Figura 3.5.18: Efecto de las condiciones tróficas sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de las PPasas de <i>Chlorella</i> sp. N64A	166
Figura 3.5.19: Efecto de las condiciones tróficas sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de las PPasas de la rodofita <i>Galdieria sulphuraria</i>	168
Figura 3.5.20: Efecto de la fuente de nitrógeno combinado en el medio de cultivo sobre el crecimiento y las actividades sPPasa y mPPasa de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CW15	171
Figura 3.6.1: Comprobación de los clones que contienen las ORFs de las putativas Na ⁺ -PPasas de la rodofita talofítica <i>P. yezoensis</i>	173
Figura 3.6.2: Clonación de las ORFs de las putativas Na ⁺ -PPasas de algas marinas en vectores lanzadera de levadura	175
Figura 3.7.1: Efecto de la expresión de un amiRNA contra el gen <i>HPPA</i> sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de H ⁺ -PPasa de la cepa parental CW15-325 y dos cepas transformantes, Δ HPPA1 y 2, de <i>C. reinhardtii</i>	178
Figura 3.7.2: Efecto de la salinidad sobre la cepa CW15-325 de <i>C. reinhardtii</i> y sus transformantes de silenciamiento génico por amiRNA contra <i>HPP</i> cultivadas en condiciones autotróficas y bajo estrés salino	180
Figura 3.7.3: Efecto de la salinidad sobre la cepa CW15-325 de <i>C. reinhardtii</i> y sus transformantes de silenciamiento génico por amiRNA contra <i>HPP</i> cultivadas en condiciones mixotróficas y bajo estrés salino	181
Figura 3.7.4: Efecto de la salinidad sobre la cepa CW15-325 de <i>C. reinhardtii</i> y sus transformantes de silenciamiento génico por amiRNA contra <i>HPP</i> cultivadas en condiciones heterotróficas y bajo estrés salino	183
Figura 3.7.5: Construcciones génicas para expresar PPasas en <i>C. reinhardtii</i> y <i>A. thaliana</i>	185
Figura 3.7.6: Construcciones génicas en plásmidos pOpt para expresar PPasas en <i>C. reinhardtii</i>	186

Figura 3.8.1: Obtención de los plásmidos pRDG-mPPasa y generación de la estirpe SDG de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	189
Figura 3.8.2: Comprobación del grado de integración y completa segregación de los genes que codifican mPPasas en el cromosoma de la estirpe <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 y sus estirpes transformantes, determinados mediante PCR	191
Figura 3.8.3: Crecimiento de los cultivos fotoautotróficos de la estirpe silvestre de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 y sus transformantes obtenidos con los plásmidos pRDG, pRDG-AVP1, pRDG-TcPP, pRDG-CaPP y pRDG-MmPP	191
Figura 3.8.4: Análisis de los niveles de actividad mPPasa y proteína de las distintas mPPasas en preparaciones de membranas de las estirpes silvestre y transformantes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 cultivadas en condiciones fotoautotróficas	192
Figura 3.8.5: Niveles de actividad específica y proteína mPPasa de las fracciones de membrana plasmática (MP) y membranas tilacoidales (MT) aisladas por gradiente de densidad de sacarosa de la estirpe silvestre de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 y la transformante SDG-CaPP	193
Figura 3.8.6: Efecto del estrés salino sobre el crecimiento fotoautotrófico de cultivos de la estirpe silvestre de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 y las transformantes expresoras de mPPasas	195
Figura 3.8.7: Crecimiento de las estirpes SDG y SDG-CaPP de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 en presencia de concentraciones crecientes de NaCl, y niveles de actividad específica y proteína mPPasa de las correspondientes fracciones de membranas	197
Figura 3.8.8: Estrategia de transformación para inactivar el gen <i>ppal</i> del cromosoma principal de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 y obtener estirpes transformantes carentes de la sPPasa endógena PPA1 y expresoras de mPPasas	198
Figura 3.8.9: Comprobación por PCR del grado de integración y segregación del gen <i>CCI</i> que codifica la resistencia a cloranfenicol en el locus <i>ppal</i> del cromosoma principal de los transformantes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 expresores de mPPasas	199

4. DISCUSIÓN

Figura 4.2.1: Secuencia de los 157 nucleótidos inmediatamente anteriores al gen <i>IPP1</i>	203
Figura 4.4.1: Modelo de escenario del PPI en una célula vegetal	211
Figura 4.5.1: Árbol filogenético de genes de mPPasas de distintas especies de organismos fotosintéticos	214

6. DATOS SUPLEMENTARIOS

Figura S.1: Secuencias proteicas de las quimeras utilizadas en el apartado 3.1 de resultados con sitios de corte para la proteasa de <i>S. cerevisiae</i> KEX2	224
Figura S.2: Secuencia proteica de la putativa Na ⁺ -PPasa de <i>Ostreococcus tauri</i>	224
Figura S.3: Secuencia proteica de las putativas Na ⁺ -PPasas de <i>Porphyra yezoensis</i>	225
Figura S.4: Secuencia proteica de las mPPasas de <i>Porphyridium purpureum</i>	226
Figura S.5: Determinación de la actividad sPPasa y mPPasa en extractos celulares de diferentes microalgas eucarióticas cultivadas en medios con su óptimo de salinidad	227
Figura S.6: Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa en extractos celulares de <i>Dunaliella salina</i>	229
Figura S.7: Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa en extractos celulares de <i>Coccomyxa onubensis</i>	229
Figura S.8: Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa en extractos celulares de <i>Chlorella stigmatophora</i>	230

ÍNDICE DE TABLAS**2. MATERIALES Y MÉTODOS**

Tabla I: Estirpes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas	40
Tabla II: Mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizados	47
Tabla III: Plásmidos utilizados	62
Tabla IV: Oligonucleótidos utilizados	71
Tabla V: Oligonucleótidos utilizados en el sistema <i>Gateway</i>	78

3. RESULTADOS

Tabla VI: Genes de sPPasa utilizados para la expresión heteróloga en levadura	86
Tabla VII: Especies de microalgas eucarióticas utilizadas y sus genes de H ⁺ -PPasas	133
Tabla VIII: Genes que codifican mPPasas en los genomas de las microalgas marinas estudiadas	150
Tabla IX: Putativas Na ⁺ -PPasas de la rodofita <i>Porphyra yezoensis</i>	172
Tabla X: mPPasas identificadas en los genomas de <i>Ostreococcus tauri</i> y <i>Porphyridium purpureum</i> , de las cuales las marcadas con asteriscos se han utilizado en este trabajo	174
Tabla XI: Genes de PPasas utilizados para la expresión en <i>C. reinhardtii</i>	185
Tabla XII: Genes de mPPasas utilizados para su expresión en <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	187

4. DISCUSIÓN

Tabla XIII: Pesos moleculares de las quimeras de MtPPasa e Ipp1p con el dominio CBS utilizados en este trabajo	202
Tabla XIV: Sitios de unión a factores de transcripción detectados en la secuencia promotora del gen IPP1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mediante análisis informático	205

ABREVIATURAS UTILIZADAS

μ	Micro
A	Absorbancia
AcilCoA	Acetil coenzima A
ACMA	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
ADP	Adenosín-difosfato
amiRNA	Micro RNA
AMP	Adenosín-mono fosfato
Ap	Ampicilina
Apdo	Apartado
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosín-trifosfato
BafA	Bafilomicina A
Bisacrilamida	N,N'-bis-metilén-acrilamida
cDNA	Ácido desoxirribonucleico codificante
C-terminal	Extremo carboxilo terminal
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribunucleasa
dNTP	Desoxirribonucleótido o la mezcla de los cuatro
DTT	Ditiotreitol
E	Einstein: Unidad de cantidad de radiación
E.C.	Eficiencia catalítica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Aceleración de la gravedad
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
g/l	Relación gramos por litro
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico

H⁺-PPasa	Pirofosfatasa translocadora de protones
kb	Kilobase
K_{cat}	Constante catalítica
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de Luria-Bertani
M	Molar
ME	Mexcla de ensayo
MES	Ácido 2-(N-Morfolino)etanosulfónico
MOPS	Ácido 2-(N-Morfolino)propanosulfónico
mPPasa	Pirofosfatasa de membrana
NAD⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NADH	Hidrógeno-nicotinamida-adenín-dinucleótido
Na⁺-PPasa	Pirofosfatasa de membrana translocadora de iones sodio
NES	Señal de exclusión nuclear (<i><u>N</u>uclear <u>E</u>xclusion <u>S</u>ignal</i>)
NLS	Señal de localización nuclear (<i><u>N</u>uclear <u>L</u>ocalization <u>S</u>ignal</i>)
NPC	Complejo de poro nuclear (<i><u>N</u>uclear <u>P</u>ore <u>C</u>omplex</i>)
N-terminal	Extremo amino terminal
O.D.	Densidad óptica (<i><u>O</u>ptical <u>D</u>ensity</i>)
OPA	Tampón para enzimas de restricción (<i><u>O</u>ne <u>P</u>hor <u>A</u>ll</i>)
ORF	Pauta abierta de lectura (<i><u>O</u>pen <u>R</u>eadin<u>G</u> <u>F</u>rame</i>)
OVO	Ovoalbúmina
Pi	Fosfato inorgánico
p/v	Relación peso/volumen
P-ATPasa	ATPasa translocadora de protones tipo "P"
pb	Pares de nucleótidos (bases)
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCI	Mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pKa	Constante de disociación ácida
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PPasa	Pirofosfatasa
PPi	Pirofosfato
PPi-IP	Inositol-pirofosfato
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA interferente
RNAm	RNA mensajero
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SD	Medio sintético selectivo de levadura con 2 % de glucosa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
S.E.	Error estándar de la media aritmética (<i>Standard Error</i>)
SGal	Medio sintético selectivo de levadura con 2 % de galactosa
<i>sp</i>	Especie
sPPasa	Pirofosfatasa soluble
TBE	Tampón Tris-borato/EDTA
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tampón Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
TMS	Hélice transmembrana (<i>Trans Membrane Segment</i>)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Triton X-100	t-Octilfenoxipolietoxietanol

tRNA	RNA transferente
Tween 20	Monolaurato de polioxietilensorbitano
U	Unidad de actividad enzimática
UBQ	Ubiquitina
UV	Ultravioleta
U.R.	Unidades relativas
v/v	Relación volumen/volumen
V-ATPasa	ATPasa translocadora de protones tipo "V"
V_{MAX}	Velocidad catalítica máxima
YNB	Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico
YP	Medio de cultivo complejo de levadura sin fuente de carbono
YPD	Medio rico de levadura con 2 % de glucosa
YPGal	Medio rico de levadura con 2 % de galactosa
YPGli	Medio rico de levadura con 3 % de glicerol

BASES NITROGENADAS

A	Adenosina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

AMINOÁCIDOS

A Ala Alanina

R Arg Arginina

N Asn Asparragina

D Asp Aspártico

C Cys Cisteína

E Glu Ácido glutámico

Q Gln Glutamina

G Gly Glicina

H His Histidina

I Ile Isoleucina

L Leu Leucina

K Lys Lisina

M Met Metionina

F Phe Fenilalanina

P Pro Prolina

S Ser Serina

T Thr Treonina

W Trp Triptófano

Y Tyr Tirosina

V Val Valina

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El fósforo como bioelemento

El fósforo es el quinto elemento en importancia cuantitativa como componente celular, formando parte fundamental del armazón de numerosas biomoléculas (ácidos nucleicos, coenzimas y metabolitos). También es un elemento clave en la formación y estructura de las membranas lipídicas, siendo capaz de formar complejos con proteínas, carbohidratos y lipopolisacáridos.

Es el componente fundamental del grupo químico depositario de la energía de enlace que se genera y consume en el metabolismo celular. Por ello, es el único de los bioelementos primordiales que juega un papel crucial en la bioenergética de los organismos.

De entre todos los elementos necesarios para la vida, es el único que no cambia su estado de oxidación al ser incorporado a la materia viva. Se transporta al interior celular en forma de anión ortofosfato (H_2PO_4^- , Pi), sufriendo un proceso ácido-base mediante el cual se energiza a metafosfato (PO_3^-) para ser incorporado a esqueletos carbonados y formar nucleósidos trifosfatos, mayoritariamente ATP ($\text{ADP} - \text{PO}_3^-$). En este tipo de moléculas, se encuentra formando parte del grupo pirofosfato ($\text{PO}_3^{2-} \sim \text{O} \sim \text{PO}_3^{2-}$): la estructura química cuya energía de enlace es usada por todos los organismos. En el consumo de estas moléculas, el enlace pirofosfato se rompe y libera metafosfato (PO_3^-) que será hidratado directa o indirectamente a su forma de ortofosfato (PO_4^-) (Losada, Bellido et al. 1999)

Existen otras formas de asimilar el fosfato a la materia viva, tales como en forma de polifosfatos de reserva en organismos procariotas o dentro de algún compartimento celular, como la vacuola, en organismos eucariotas. En estos mismos lugares también puede acumularse en forma de polímeros inorgánicos (Rao, Roberts et al. 1985).

La mayoría del fosfato presente en los organismos vivos se encuentra en forma de ortofostato, en alguno de los siguientes estados:

1. Libre (Pi).
2. Esterificado a una cadena hidrocarbonada a través de un grupo carboxilo (C-O-P). En azúcares-fosfato y fosfolípidos.

3. Unido a otro fosfato mediante un puente pirofosfato (R-P-O-P-R'). En polifosfatos y nucleótidos di/tri-fosfato).

4. Fosforilando proteínas a través de los grupos -OH de las cadenas laterales de las mismas.

El enlace que forma en todas estas moléculas es el enlace éster-fosfato, formado entre un grupo fosfato (PO_4^{3-}) y un grupo hidroxilo (OH^-). Este enlace se caracteriza por tener una alta estabilidad cinética a temperatura y pH fisiológicos y una alta energía libre de hidrólisis, que puede ser utilizada por la célula en multitud de funciones fisiológicas. (Lahti, Pitkäranta et al. 1988; Losada, Bellido et al. 1999).

1.2 El pirofosfato inorgánico

1.2.1 Generalidades

El pirofosfato inorgánico (PPi) es una molécula formada por dos grupos metafosfato unidos por un puente de oxígeno (P-O-P). Esta estructura constituye el grupo químico en el que se almacena la energía de enlace fundamental para la bioenergética celular. Es una molécula rica en energía, con un potencial energético de hidrólisis similar al ATP:

$$\text{PPi: } \Delta G^{0'} = -22 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ ó } -0'22 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}.$$

$$\text{ATP: } \Delta G^{0'} = -31 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ ó } -0'31 \text{ eV}\cdot\text{molécula}^{-1}.$$

Esta similitud hace suponer que ambas moléculas representan un papel similar en la bioenergética de los organismos vivos; aunque la energía libre de hidrólisis de la molécula de PPi, al contrario de la del ATP, aumenta al disminuir el pH. Esto hace que su uso sea más favorable en condiciones de pH citoplasmático bajo (de Meis 1984; Davies, Poole et al. 1992).

El PPi se identificó por primera vez en el siglo XIX al ser sintetizado por calentamiento de sales de ortofosfato sódico o potásico. Su formación en sistemas biológicos fue descrita en el año 1941, al descubrirse la acumulación del mismo en extractos de hígado de rata incubados con succinato y fructosa (Cori, Ochoa et al. 1951). La primera reacción en la que se creaba PPi fue

descrita por Kornberg en 1948, que encontró que los extractos de levaduras formaban ATP y NMN en presencia de NAD^+ y PPI, en una reacción conocida como pirofosforolisis (Kornberg and Lindberg 1948). En 1957, este mismo autor propuso que la mayoría de reacciones de pirofosforolisis “in vivo”, se dan en el sentido de la creación de PPI durante la biosíntesis de otros compuestos biológicos. Esta síntesis de PPI está acoplada a una rápida hidrólisis del mismo por acción de las pirofosfatasas inorgánicas (PPasas), haciendo las reacciones prácticamente irreversibles.

A partir de entonces, se han descubierto multitud de rutas de biosíntesis en las que se produce PPI tales como, las rutas de síntesis de polímeros como el ADN, ARN, proteínas y polisacáridos. En ellas se produce PPI cada vez que se añade un monómero a la cadena, además de producirse en la biosíntesis de cada uno de los monómeros (Lee, Cho et al. 2009).

También se produce PPI en otras reacciones, como la fotofosforilación, la fosforilación oxidativa o la glicolisis. Incluso, durante la década de los 60, se descubrió la síntesis de PPI inducida por la luz en membranas de cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky, Baltscheffsky et al. 1966).

En 1962, dos autores demostraron la capacidad del PPI para actuar como donador de energía en la formación del piruvato y, en 1965, Lipmann asumió que podría haber precedido al ATP como molécula principal del metabolismo energético durante los estadios iniciales de evolución de la vida (Serrano, Pérez-Castiñeira et al. 2007).

1.2.2 El pirofosfato como regulador

Diversos autores han demostrado que el PPI es capaz de afectar a la actividad catalítica de ciertas enzimas; principalmente con un papel inhibitorio, aunque también tiene la capacidad de activación o protección frente a la inactivación catalítica.

Se sabe que es un fuerte inhibidor de las aminoacil-tRNA sintetetasas, afectando de forma negativa a la síntesis proteica. Esto se debe a que es un producto de la reacción de activación de estas enzimas (Dignam, Rhodes et al. 1980). La fosfoproteína fosfatasa también se inactiva por la presencia de PPI,

en extractos de células de hígado de rata se observa una disminución del 75% de la actividad de esta enzima a los 10 minutos tras la adición de 0,25 mM de PPi (Khandelwal 1978). En general, afecta a todas las reacciones que requieren el catión divalente Mg^{2+} , ya que el PPi se une fuertemente a él y puede inhibir a ciertas enzimas cuando su concentración es similar o superior a la del catión (O'Sullivan and Smithers 1979).

Puede actuar como mensajero celular formando parte de la molécula de inositol-pirofosfato (PPi-IP), un compuesto perteneciente a una superfamilia de moléculas señal presente en todos los organismos eucariotas y que participan en la regulación de la homeostasis energética de las células. Los cambios en los niveles de ATP producen cambios en la concentración de PPi-IP, lo cual inicia una cascada de señalización que actúa sobre la regulación de determinados genes implicados en el metabolismo del fosfato (Thota and Bhandari 2015). La molécula de PPi-IP es capaz de pirofosforilar serinas de otras proteínas, participando así en la regulación de las mismas. Muchas de estas proteínas están implicadas en el movimiento vesicular, el metabolismo del fosfato y el control del ciclo celular (Bhandari, Chakraborty et al. 2007).

El PPi actúa como ligando del Fe^{3+} manteniendo su solubilidad, por lo que podría estar implicado en rutas de asimilación y transporte de este metal. En *Escherichia coli* se sabe que estimula el transporte de hierro al interior celular, aunque su mecanismo de acción aún no está claro (Perrotte-Piquemal, Danchin et al. 1999).

Estudios recientes muestran que la hidrólisis de PPi produce la energía necesaria para el movimiento flagelar de los espermatozoides de mamíferos, siendo su concentración muy elevada tanto en el líquido seminal como en el fluido de los oviductos de cerdo (Yi, Sutovsky et al. 2012). En humanos, las alteraciones del metabolismo del PPi pueden dar lugares a enfermedades como condrocalcinosis e hipofosfatasa (Goldman, Boije et al. 2016). La primera de ellas es un tipo de artritis causada por la acumulación de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado en los fibrocartílagos articulares (Martinez, Ramos et al. 2017).

1.2.3 Contenido celular de pirofosfato

La tasa de producción de PPi en las células en crecimiento es muy alta y esta producción debe ser compensada por rutas catabólicas eficientes para evitar los efectos tóxicos de su acumulación (Lee, Cho et al. 2009). Esta alta tasa de producción llevo a los autores a considerar que su tasa de hidrólisis debía ser igualmente alta, produciendo esto que su concentración en las células vivas fuese bastante baja (Littauer and Kornberg 1957). Sin embargo, cuando empezaron a realizarse medidas del contenido intracelular de PPi, se observó que sus niveles eran bastante dispares entre diversos organismos. Así, se pueden obtener valores tan dispares de concentración como 500 μM en *E. coli* (Kukko-Kalske, Lintunen et al. 1989) y 43 mM en células de *Rhodospirillum rubrum* expuestas a la luz (Nore, Sakai-Nore et al. 1991). Mientras que en *E. coli* la concentración de PPi permanece invariable, en organismos fotosintéticos se ve alterada por la exposición a la luz. Así es el caso de la cianobacteria *Anacystis nidulans*, que presenta un valor de 900 μM en oscuridad de 1'6 mM en presencia de luz (Bornefeld 1981).

En 1979, Carnal y Black descubren una fosfofructoquinasa en plantas dependiente de PPi que usa este metabolito como fuente energética en lugar del ATP. Esto hizo que se generara un gran interés por el estudio del contenido de PPi intracelular en las diferentes especies de plantas (Carnal and Black 1979). Medidas realizadas en *Zea mays* y *Pisum sativum* mostraron que el contenido del mismo es muy variable entre los distintos tejidos de la planta y el estadio del desarrollo en el que se encuentre. Aunque se sugirió que estos valores siempre son lo suficientemente altos en el citosol como para servir de donador de energía utilizable por las diferentes enzimas dependientes de PPi (Smyth and Black 1984) (Edwards, Rees et al. 1984). Existen numerosas evidencias de que la luz puede afectar al contenido total de PPi celular. En cromatóforos de *Rhodospirillum rubrum* se ha observado la concentración de PPi es aproximadamente un 25% de la de ATP a intensidad de luz saturante, mientras que a intensidad baja estas concentraciones son prácticamente idénticas. Esto sugiere que, bajo ciertas condiciones, la síntesis de PPi puede ser tan importante para el metabolismo energético como la de ATP (Guillory and Fisher 1972).

La diferencia más clara en cuanto al PPi entre tejidos de plantas y animales es la localización del mismo en la célula. Mientras que en tejidos fotosintéticos la mayoría se encuentra en el citosol, en tejidos animales, como el hígado de rata, este se encuentra principalmente en la mitocondria. Esto tiene mucho sentido desde el punto de vista bionérgico, ya que en plantas existen al menos tres proteínas capaces de utilizar el PPi citosólico como fuente de energía (PFP, EC. 2.7.1.90; H⁺-PPasa, EC. 3.6.1.1; UDPG-pirofosforilasa, EC. 2.7.7.9) que están ausentes en el citosol de las células de tejidos animales (Jelitto, Sonnewald et al. 1992).

1.2.4 Producción de pirofosfato en el anabolismo celular

El PPi se produce en numerosas reacciones reversibles dependientes de nucleósidos 5'-trifosfato, como son:

- Síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN)
 $(dNMP/NMP)_n + dNTP/NTP \longleftrightarrow (dNMP/NMP)_{n+1} + PPi$
- Activación de aminoácidos (aminoacil-tRNA sintetasa)
 $aa + tRNA + ATP \longleftrightarrow \text{aminoacil-tRNA} + AMP + PPi$
- Formación de NDP-glucosa
 $\text{Glucosa-1-fosfato} + NTP \longleftrightarrow \text{NDP-glucosa} + PPi$
- Formación de acil-CoA (Acil-CoA sintetasa)
 $\text{Ácido graso} + \text{CoA} + ATP \longleftrightarrow \text{acil-CoA} + AMP + PPi$
- Síntesis de AMPc (Adenilato ciclasa)
 $ATP \longleftrightarrow \text{AMPc} + PPi$

Estas reacciones forman parte de rutas metabólicas imprescindibles para la célula, tales como la síntesis de ADN y ARN, proteínas, lípidos, polisacáridos (almidón, celulosa), ácidos grasos y una amplia gama de metabolitos (Lahti 1983; Rojas-Beltrán, Dubois et al. 1999; Farré, Bachmann et al. 2001; McCormick 2004). Se produce en tres pasos de la ruta de biosíntesis de vitamina B12 y en la síntesis de clorofila a partir de fitol, durante la hidrólisis de fitil-pirofosfato. A partir de esta molécula, se pueden producir tanto vitamina K como vitamina E, liberando PPi en ambos procesos. El

elevado número de reacciones productoras de este metabolito, hace que su concentración aumente rápidamente en células en crecimiento y tenga que ser compensado por rutas catabólicas eficientes. La acumulación del PPI haría imposible la regeneración del ATP necesario para que se produzcan las reacciones de fosforilación (Lahti 1983; Pérez-Castiñeira, Gómez-García et al. 2001).

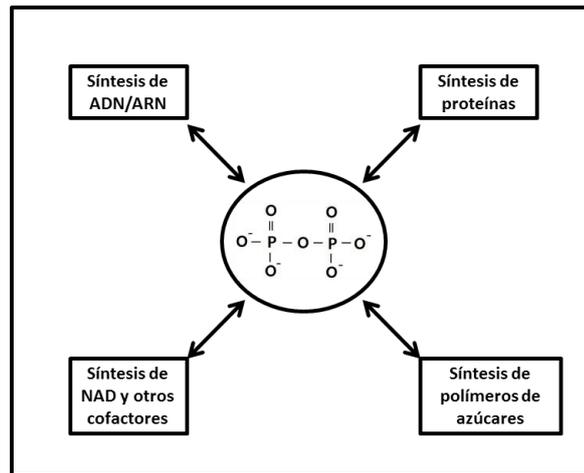


Figura 1.1: Papel central del PPI en el anabolismo celular

El NAD^+ es un cofactor que participa en multitud de reacciones redox esenciales para la transducción de energía y el metabolismo celular; siendo su síntesis la primera ruta conocida en la que participa el PPI (Kornberg and Lindberg 1948). Este cofactor participa como sustrato en la modificación covalente de proteínas por ADP-ribosilación, un proceso implicado en la reparación de daños en el ADN y la regulación de la inestabilidad genómica (Oei, Keil et al. 2005), y en el control del sistema inmunitario (Luo X et al 2015). Estudios recientes sugieren la participación del NAD^+ en el proceso de modelado de la cromatina, participando así en la regulación de la expresión génica (Nakahata and Bessho 2016). Está implicado en la inactivación de especies reactivas del oxígeno, por lo que juega un papel clave en el mantenimiento del estado redox del organismo. En células cancerosas se requiere una elevada presencia de NADH/NADPH para actuar como agentes reductores en la síntesis continua de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Esto hace que las enzimas que participan en su ruta de biosíntesis sean buenas dianas para el desarrollo de fármacos antitumorales (Tedeschi, Markert et al. 2013).

La biosíntesis de NAD^+ puede llevarse a cabo mediante dos vías diferentes: vía reciclaje y vía “de novo”. Existiendo en ambas rutas biosintéticas diversas reacciones en las que se genera PPi como subproducto. Dada la gran importancia cuantitativa y cualitativa de las coenzimas de nicotinamida NAD(H) y NADP(H) en el metabolismo celular, su biosíntesis – que genera grandes cantidades de PPi- se ha descrito en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como la primera y más importante diana de inhibición por la acumulación intracelular excesiva de PPi (Serrano-Bueno, Hernández et al. 2013), lo cual se consiguió mediante la cepa letal condicional YPC3 de esta levadura, en la cual el gen *IPP1* que codifica la sPPasa mayoritaria Ipp1p está bajo el control del promotor regulable estricto P_{GAL1} (Pérez-Castiñeira, López-Marqués et al. 2002; Drake, Serrano et al. 2010).

1.2.5 El pirofosfato en el compartimento nuclear

La producción de PPi alcanza cotas muy elevadas en el núcleo de las células eucarióticas debido a las numerosas reacciones anabólicas que se producen en el mismo, principalmente los procesos de replicación y transcripción del material genético, catalizadas por la ADN y la ARN polimerasa respectivamente. Estas dos enzimas llevan a cabo la elongación de las moléculas de ADN o ARN, añadiendo monómeros de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos trifosfato. La reacción fundamental consiste en la transferencia de un grupo fosfato mediante ataque nucleofílico en el que se libera una molécula de PPi y se forma un nuevo enlace fosfodiéster, elongándose así la cadena de ADN o ARN (Lee and Hurwitz 1990; Ferrer-Orta, Agudo et al. 2009).

Los procesos catalizados por las ADN/ARN polimerasas tienen una importancia capital para la célula, ya que son la base de procesos tan importantes como la duplicación del material genético durante la división celular, la expresión genética o la propia regulación de esta expresión. Por ello, se hace necesaria la existencia de mecanismo de control de los mismos, uno de los cuales es conocido como pirofosforólisis. Se trata de una reacción inversa a la polimerización en la que se produce la liberación de nucleótidos trifosfato

desde el extremo 3' de una estructura molde/iniciador, y que también es llevada a cabo por la ADN polimerasa. El sustrato de la reacción es el propio PPi en presencia de iones divalentes (Deutscher and Kornberg 1969). La reacción permite la eliminación de nucleótidos introducidos de forma errónea durante la replicación del ADN para que sean sustituidos por el nucleótido correcto, consiguiendo que se mantenga la fidelidad de la copia. La molécula de PPi unida a un catión divalente se une a la ADN polimerasa y produce un cambio conformacional de la misma entre un estado abierto y cerrado, paralizando la actividad de polimerización y permitiendo que se inicie la actividad de pirofosforolisis. Se ha demostrado que la ADN polimerasa libera más rápidamente el PPi cuando se une a un nucleótido erróneo que cuando se une al correcto, esto hace que pase a su forma abierta y se produzca la pirofosforolisis (Beard and Wilson 2014).

La capacidad reguladora del PPi en el interior del núcleo, unida al hecho de que su producción y consumo es constante en las reacciones que ocurren en el mismo, hace suponer que existe una férrea regulación de su concentración y de su transporte a través de la membrana nuclear.

1.3 Transporte núcleo-citoplasma

En las células eucarióticas existe un transporte bidireccional entre el núcleo y el citoplasma, imprescindible para el funcionamiento de procesos como la expresión génica, la transducción de señales o la regulación del ciclo celular. El transporte ocurre a través de grandes estructuras de membrana, con un tamaño de unos 66-125 MDa, llamadas complejos de poro nuclear (NPCs), formadas por un conjunto de 40-100 proteínas llamadas nucleoporinas que forman un canal a través de la doble membrana de la envoltura nuclear (Rout, Aitchison et al. 2000). Las moléculas menores de 60 kDa pueden atravesar el poro de forma pasiva, pero otras de mayor tamaño o importancia necesitan de un sistema de transporte específico que garantice su localización.

Este sistema está mediado por factores de transporte nuclear o proteínas transportadoras conocidas como β -carioferinas, la mayoría de ellas con

dominios HEAT en su secuencia. La regulación es llevada a cabo por pequeñas proteínas GTPasas llamadas proteínas Ran, que a su vez son activadas o inactivadas por el factor intercambiador de nucleótidos de guanina (RanGEF). Las rutas de tráfico nuclear mantienen su direccionalidad debido a la existencia de un gradiente RanGDP-RanGTP del citoplasma al núcleo. Los receptores de importación se unen al cargo en el citoplasma y lo liberan en núcleo previa unión a RanGTP, entonces pueden unirse a otro cargo o bien salir vacíos al citoplasma donde el RanGTP se hidroliza a RanGDP y libera al transportador. El RanGDP volverá a entrar al núcleo, donde el RanGEF lo volverá a convertir en RanGTP, cerrando así la ruta (Marfori, Mynott et al. 2011; Mynott, Harrop et al. 2011).

La señal de direccionalidad a núcleo mejor conocida es la secuencia de localización nuclear (NLS), observable en multitud de proteínas nucleares o nucleo-citosólicas, y que fue identificada por primera vez en una proteína del virus SV40 de simios (Kalderon, Richardson et al. 1984). Se trata de regiones de aminoácidos básicos que son imprescindibles para el reconocimiento y unión al transportador. En la NLS de SV40 se ha demostrado que la lisina P2 es imprescindible para su funcionamiento, ya que su mutación por un aminoácido no básico produce que la proteína no sea importada al núcleo (Lanford, Kanda et al. 1986). Las NLS pueden dividirse en monopartitas o bipartitas, según posean una o dos regiones básicas respectivamente, y la secuencia de aminoácidos puede ser variable dentro de unos límites. Se han establecido varias secuencias consenso para las NLS:

- Monopartitas:
 - K(R/K)X(R/K)
 - KR(R/X)K
 - KR(K/R)R
 - K(K/R)RK
- Bipartitas:
 - (K/R)(K/R)X₁₀₋₁₂(K/R)₃₋₅
 - KRX₁₀₋₁₂KRRK
 - KRX₁₀₋₁₂K(K/R)X(K/R)

En levaduras existen 14 β -carioferinas, todas pertenecientes a la familia de β -importinas, siendo la más conocida la importina- α (Imp α). Esta posee dos dominios bien diferenciados:

- Una región N-terminal de unión a RanGTP.
- Una región C-terminal con diez repeticiones armadillo en tándem que forman una estructura superhelicoidal. Las regiones armadillo (Arm) son grupos de 40 aminoácidos que forman tres α -helices y son las encargadas de reconocer a las secuencias NLS.

En el mecanismo de importación es necesaria la presencia de Ran, Imp α e Imp β . Se forma un complejo de las dos importinas unidas a una proteína con secuencia NLS, que atraviesa el NPC y liberan la proteína en el interior del núcleo. Después ambas se disocian y vuelven al exterior unidas a RanGTP, que las libera en el citoplasma hidrolizándose a RanGDP.

Los mecanismos de exportación son menos conocidos, pero se sabe que en todo ellos está implicada la unión a RanGTP. Participan proteínas como la exportina T o Crm1, que son capaces de reconocer regiones ricas en leucina en las proteínas a exportar (Kalderon, Richardson et al. 1984; Schlenstedt, Smirnova et al. 1997; Goldfarb, Corbett et al. 2004; Lange, Mills et al. 2007; Marfori, Mynott et al. 2011). Estas secuencias son llamadas secuencias de exportación nuclear (NES) y son mucho más variables que las NLS, aunque se sabe que son regiones ricas en cisteína y leucina. Hay experimentos que demuestran que la sobreexpresión de Crm1 aumenta la concentración citoplasmática de proteínas con secuencia NES, mientras que su inactivación la disminuye drásticamente (Kuge, Toda et al. 1998; Toone, Kuge et al. 1998; Maurer, Redd et al. 2001).

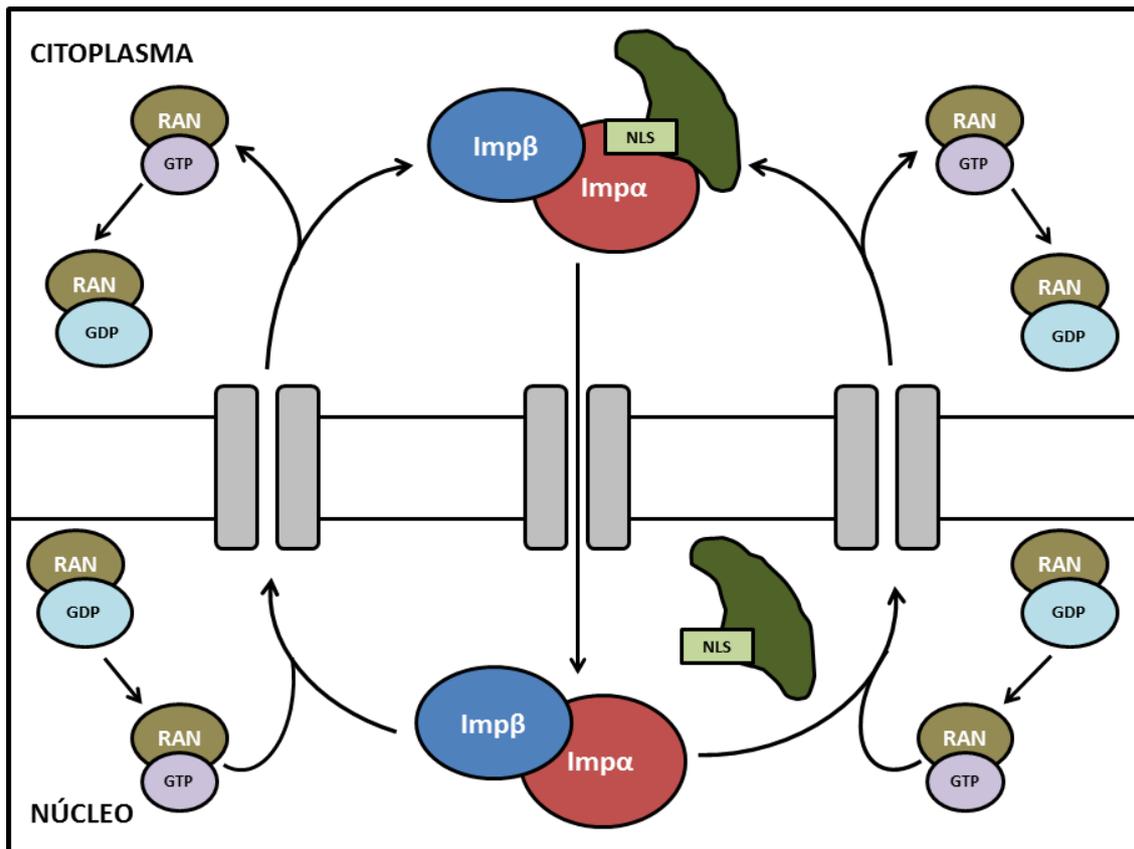


Figura 1.2: Mecanismo general de acción del transporte nucleo-citoplásmico medido por señal NLS.

1.4 Enzimas que hidrolizan PPi: pirofosfatasa inorgánica.

Las pirofosfatasa inorgánica (PPasas) son enzimas presentes en todos los dominios de la vida y cuya actividad catalítica es imprescindible para todos los procesos metabólicos que generan PPi, ya que consiste en la hidrólisis de este a dos moléculas de ortofosfato. La acumulación del PPi es perjudicial para los organismos y la delección de las PPasas inorgánicas resulta letal (Pang, Garzan et al. 2016). Ha sido imposible conseguir un mutante totalmente exento de PPasas, ya que su delección inhibe el crecimiento. Sin embargo, mutantes de *Escherichia coli* sobreexpresores de PPasas tienen menor tasa de crecimiento que aquellos que expresan niveles normales (Lahti 1983). En este mismo organismo se ha demostrado que el nivel mínimo de actividad pirofosfatasa que permite el crecimiento es de 0'01 U/mg, manteniendo la célula un valor constante de concentración de PPi de 1'1 mM aunque la actividad PPasa aumente (Chen, Brevet et al. 1990). Se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de su estructuras y función catalítica: pirofosfatasa solubles y de

membrana. Ambos tipos poseen motivos similares en la secuencia de aminoácidos correspondiente al sitio catalítico y ambos se engloban bajo el mismo código de identificación de enzimas (EC 3.6.1.1), aunque no se trata de enzimas homólogas (Rea and Poole 1993). Mientras que las primeras son proteínas citoplasmáticas solubles que regulan la homeostasis PPI/Pi, las otras son proteínas integrales de membrana que pueden llevar a cabo un transporte de iones asociado a la hidrólisis de PPI (Pang, Garzan et al. 2016). Ambos grupos comparten, sin embargo, características similares en cuanto a regulación y requerimientos. El sustrato único no es realmente el PPI, sino un complejo de Mg_2PPI , todas necesitan el Mg^{2+} como cofactor para la estabilidad del holoenzima y para su activación, y todas se inhiben irreversiblemente por la presencia de iones de Ca^{2+} (Rojas-Beltrán, Dubois et al. 1999).

1.4.1 Pirofosfatasas solubles

Las PPasas solubles se dividen en dos grandes familias no homólogas, familia I y familia II, dependiendo de su estructura primaria. No existe ninguna relación evolutiva entre ellas ni a nivel de secuencia, ni de estructura. Su única característica común es la capacidad para hidrolizar el $Mg^{2+} \cdot PPI$, siendo un ejemplo claro de convergencia evolutiva. Ambas familias necesitan concentraciones micromolares de Mg^{2+} para su activación, pero las de familia II también precisan de niveles nanomolares de Mn^{2+} u otros iones divalentes (Fabrichniy, Lehtiö et al. 2004).

La presencia de PPasas solubles es un rasgo común a todos a los organismos, aunque las de familia II aparecen principalmente en bacterias y archeas, aunque también en algunos organismos eucarióticos como el alga *Ostreococcus tauri* (Albi-Rodríguez and Serrano 2008).

1.4.1.1 Pirofosfatasas solubles Familia I

Es la familia mayoritaria y sus miembros aparecen tanto en organismos procariotas (bacterias y archeas) como eucariotas (hongos, plantas y animales). Son miembros de la familia de fosfohidrolasas Pfam PF00719. Las más estudiadas son la PPasa procariótica de *Escherichia coli* y la eucariótica de *Saccharomyces cerevisiae*, catalizando ambas la hidrólisis de Mg^{2+} -PPi. En el mecanismo de catálisis se transfiere un ortofosfato directamente al agua, sin formarse un intermediario fosforilado de la proteína (Kankare, Neal et al. 1994). La secuencia consenso *D-hyd-D-P-ali-D-ali-ali* (*hyd*: Ser, Gly o Asn; *ali*: Cys, Ile, Leu, Val o Met) está presente en todas las PPasas de familia I, conociéndose como dominio PROSITE PS00387 (Cooperman, Baykov et al. 1992; Kankare, Neal et al. 1994).



Figura 1.3: Mecanismo general de acción de las PPasas solubles Familia I.

La PPasa de *S.cerevisiae* es un homodímero de 286 aminoácidos y con un peso molecular de 32-37 kDa por monómero (Kolakowski, Schloesser et al. 1988). Su sitio activo está formado por 17 residuos polares que pueden interactuar con el ión metálico unido al sustrato o producto. Este sitio activo está muy conservado en la familia I, apareciendo 13 de los 17 aminoácidos del sitio activo en todos los miembros de la misma (Cooperman, Baykov et al. 1992).

La PPasa de *E. coli* es un homohexámero formado por seis subunidades de aproximadamente 20kDa cada una. Cada monómero está formado por 175 aminoácidos dispuestos en dos α -hélices y nueve láminas β (Kankare, Neal et al. 1994). La conformación espacial de la proteína deja una cavidad superficial correspondiente al sitio activo, con uno de los extremos de una de las α -hélices formando parte del mismo (Baykov, Dudarenkov et al. 1995).

A pesar de sus diferencias, ambas proteínas presentan prácticamente la misma conformación tridimensional entre sus monómeros. Estudios de cristalografía demuestran que hay una superposición exacta de 150 de los aminoácidos que forman el monómero. La principal diferencia parece ser que la

PPasa de *S.cerevisiae* tiene 26 aminoácidos más en el extremo N-terminal y 54 en el extremo C-terminal (Kankare, Neal et al. 1994).

Los niveles más altos de actividad “in vitro” se han conseguido a pH alcalino (8-9), y con iones metálicos unidos al sitio activo además del PPi. La presencia de iones metálicos es esencial para la actividad debido a la presencia de cuatro sitios de unión (I, II, III y IV) en el sitio activo, en la posición IV se une el $Mg^{2+}\cdot PPi$ y en los otros tres Mg^{2+} libre. Estos iones metálicos interaccionan con los grupos fosfato facilitando su hidrólisis al aumentar la electrofilia de los átomos de fósforo, consiguiendo así una bajada del pKa y una estabilización del estado de transición. Además proporcionan la conformación espacial requerida para la unión del sustrato.

Además de PPi, estas enzimas son capaces de hidrolizar otros sustratos como ATP o polifosfatos. Sin embargo, estos estudios se han realizado “in vitro” y las catálisis más eficientes se han obtenido usando como cofactores iones divalentes distintos del Mg^{2+} . Por lo tanto, no se puede asegurar que este efecto se produzca también en condiciones fisiológicas (Zyryanov, Shestakov et al. 2002; Zyryanov, Vener et al. 2004).

El Ca^{2+} produce una fuerte inhibición de la actividad en todos los miembros de la familia incluso a concentraciones muy bajas (Yang and Wensel 1992). Las razones de esta inhibición pueden deberse a la sustitución del Mg^{2+} por Ca^{2+} en el sitio activo, o la formación de un compuesto de $Ca^{2+}\cdot PPi$ no hidrolizable (Samygina, Popov et al. 2001). Sorprendentemente, se ha descrito que la PPasa soluble mitocondrial del protozoo parásito *Leishmania major* presenta mayor actividad catalítica en presencia de Ca^{2+} (Gómez-García, Ruiz-Pérez et al. 2004).

1.4.1.2 Pirofosfatasas solubles Familia II

Las PPasas de familia II aparecen en tres especies de Arqueas, 53 especies de bacterias y algunos eucariotas. Las especies bacterianas son mayoritariamente patógenas; como por ejemplo *Streptococcus mutans*, responsable de la formación de la placa dental y de la aparición de las caries

(Fabrichniy, Lehtiö et al. 2004); o *Vibrio Cholerae*, el patógeno responsable del cólera, que presenta también un PPasa soluble de familia I (John 1970). El hecho de que aparezcan en un elevado número de especies bacterianas patógenas hace que sean un buen objeto de estudio para desarrollar inhibidores específicos que permitan inhibir el crecimiento de estas especies patógenas (Fabrichniy, Lehtiö et al.).

Son proteínas que forman parte de la superfamilia de fosfoesterasas con dominios DHH-DHHA2 (código Pfam PF02833) que en ningún caso presentan similitudes, ni en estructura, ni en secuencia con las PPsas solubles de familia I. Sin embargo, la conformación espacial del sitio activo y el mecanismo catalítico, son comunes en ambas familias (Shintani, Uchiumi et al. 1998). Son homodímeros en los cuales cada monómero presenta dos dominios bien definidos, unidos por un linker flexible, con el sitio activo entre ellos. Su organización estructural es muy importante, ya que presentan regulación alostérica (Klemme and Gest 1971).

Su actividad en presencia de Mg^{2+} es similar a las de las PPsas solubles de familia I; sin embargo, en presencia de otros iones divalentes (Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} ...) aumentan hasta cinco veces su Kcat. La presencia de estos iones por sí solos no es suficiente para su funcionamiento, ya que, al igual que el resto de PPsas, necesitan de Mg^{2+} para la unión del sustrato al sitio activo. Sin embargo, no son inhibidas por la presencia de Ca^{2+} (Zyryanov, Vener et al. 2004). La interfase entre los dos monómeros se forma por la interacción de cinco láminas β del N-terminal de cada uno de ellos y el sitio activo se encuentra cerca del C-terminal. Los N-terminales poseen dos sitios de unión a iones divalentes activadores, que al unirse producen un cambio conformacional que desemboca en la apertura de los C-terminales permitiendo la captación de sustrato y la salida del producto (Fabrichniy, Lehtiö et al. 2004).

La primera PPasa descrita perteneciente a esta familia fue la de *S.mutans*, formada por dos monómeros iguales de 309 aminoácidos y 33,4 kDa cada uno (Merckel, Fabrichniy et al. 2001).

Al menos el 25% de los representantes de la familia II poseen un dominio de unión a nucleótidos de adenina en su extremo N-terminal llamado

dominio CBS, que fue descrito por primera vez en la cistationina- β -sintasa (Bateman 1997). Este dominio aparece normalmente por duplicado en cada monómero, dentro de una secuencia de aproximadamente 100-150 aminoácidos. Una de las PPasas con dominios CBS más conocidas es la de *Morella thermoacetica*, estando su actividad regulada por la unión de nucleótidos de adenina a estos dominios. El ATP aumenta la actividad de la proteína, mientras que el ADP y el AMP la inhiben, todos ellos con una afinidad submicromolar. El enzima es un homodímero de 48,1 kDa por subunidad con estructura y características similares al resto de los miembros de la familia. Mantienen el requerimiento de Mg^{2+} , pero a su vez requieren Mn^{2+} o Co^{2+} para alcanzar su máximo de actividad. Presenta dos conformaciones estructurales que dependen del nucleótido que ocupe los dominios reguladores: H (más activa) y L (menos activa). Se ha sugerido que el dominio CBS actúa como un inhibidor interno que hace sensible a la proteína a cambios conformacionales producidos por su unión a nucleótidos; la unión a ADP/AMP refuerza esta inhibición, mientras que el ATP la contrarresta (Jämsen, Baykov et al. 2010; Tuominen, Salminen et al. 2010).

El AMP actúa como un inhibidor competitivo, bajando solo la K_M del enzima, mientras que el ADP actúa como un inhibidor mixto que baja la V_{max} además de la K_M , disminuyendo además la afinidad de la proteína por el ATP. Este último actúa como un activador mixto, ya que reduce la K_M y aumenta la V_{max} .

Se ha sugerido que en *M. thermoacetica* esta proteína puede estar implicada en la respuesta a diversos tipos de estrés. El organismo presenta una PPasa de membrana que normalmente se encuentra inactiva, al competir por el sustrato de forma menos eficiente que la PPasa soluble de familia II. En situaciones de estrés que disminuyan el ratio ATP/ADP+AMP, la proteína soluble se inactiva y permite la actividad de la proteína de membrana, la cual puede generar un gradiente de protones asociado a la hidrólisis de PPi que puede ser utilizado por el organismo como fuente de energía (Jämsen, Tuominen et al. 2007).

1.4.2 Pirofosfatasas de membrana translocadoras de iones

Las pirofosfatasas de membrana (mPPasas) son proteínas integrales de membrana, extremadamente hidrofóbicas, que son capaces de acoplar la hidrólisis de PPi al transporte de protones a través de membranas biológicas (Serrano, Pérez-Castiñeira et al. 2007). En bacterias y archeas, generan un gradiente de protones que puede ser aprovechado como fuerza ión-motriz para generar ATP o realizar otros procesos de transporte a través de las membranas, especialmente en situaciones de estrés o de baja energía. En eucariotas, actúan en paralelo a las ATPasas de protones, ayudando a mantener la acidificación y funcionalidad de los orgánulos internos. En plantas, también están relacionadas con el desarrollo dependiente de auxinas y su sobreexpresión para mejorar la resistencia del organismo a la escasez de agua o nutrientes, el frío o la salinidad (Li, Yang et al. 2005; Zhang, Shen et al. 2011).

A pesar de estar englobadas dentro del mismo grupo que las dos familias de PPasas solubles (EC 3.6.1.1) por el único criterio de que hidrolizan en mismo sustrato, son muy diferentes de ellas tanto en secuencia de aminoácidos como en estructura y las únicas característica que comparten son la capacidad de hidrolizar PPi y la dependencia funcional del catión Mg^{2+} (Serrano, Pérez-Castiñeira et al. 2007). Tampoco presentan ninguna relación en cuanto secuencia o estructura con las distintas bombas de protones que utilizan ATP (ATPasas) ni con los transportadores ABC (Belogurov and Lahti 2002). Estudios de expresión heteróloga en levaduras han demostrado que son las bombas de protones primarias más simples que se conocen (Sarafian, Kim et al. 1992; Kim, Zhen et al. 1994; Maeshima 2000). Las mPPasas son proteínas muy ancestrales que poseen un único dominio hidrofóbico de aprox. 600 aa (código Pfam PF03030) evolutivamente muy conservado, desde las arqueas a las plantas superiores, aunque hasta la fecha no se han encontrado en hongos y metazoos (Serrano, Pérez- Castiñeira et al. 2007).

La presencia de mPPasas fue descrita por primera vez durante los años 60 en membranas de cromatóforos de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky 1967), donde también se demostró que el PPi era capaz de llevar a cabo reacciones dependientes de energía como la síntesis de ATP

(Sen, Bhuyan et al. 2009). A partir de la clonación y secuenciación del gen codificante de la mPPasa mayoritaria de *A. thaliana* (AVP1) en 1992 (Sarafian, Kim et al. 1992), se han secuenciado multitud de secuencias de posibles genes codificantes para mPPasas en bacterias (Belogurov and Lahti 2002) y otros muchos microorganismos.

A nivel bioquímico, se trata de proteínas homodiméricas compuestas por unidades de 70-80 kDa que contienen unos 650-800 aminoácidos dispuestos en 16 α -hélices transmembrana (TMSs), con grandes bucles citoplásmicos que contienen el sitio de unión a sustrato y los dominios funcionales (Serrano et al 2007). El sitio activo está formado por seis hélices TM (M5, M6, M11, M12, M15 y M16) y sus bucles citoplásmicos, formando un anillo interno que se encuentra rodeado por un anillo externo del que forman parte las otras diez hélices (Segami, Makino et al. 2014).

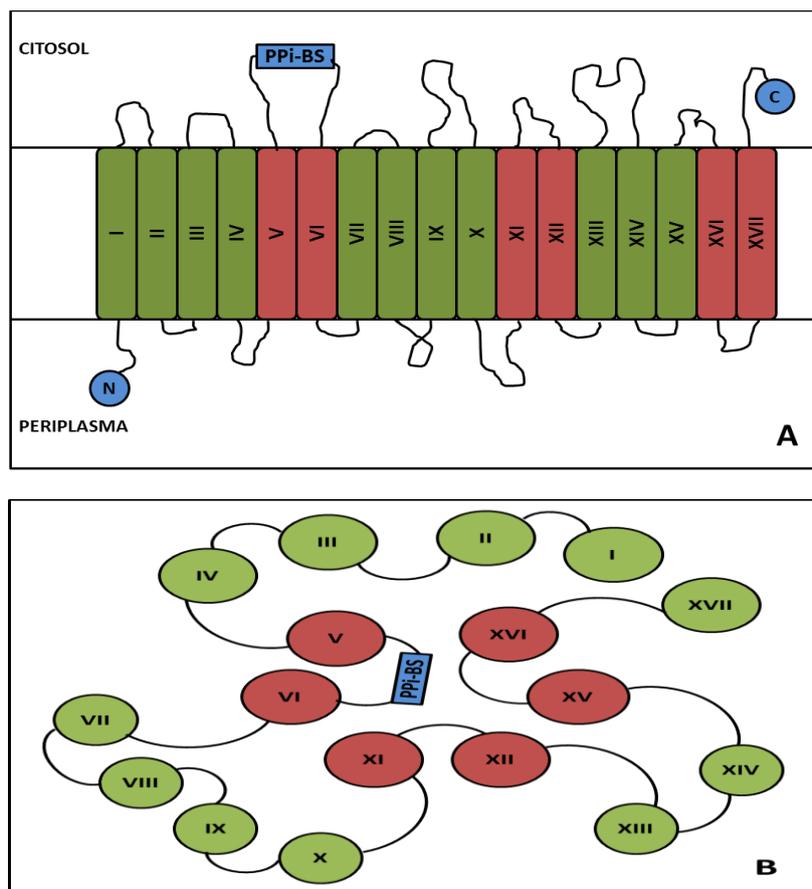


Figura 1.4: Topología de las H^+ -PPasas. La estructura terciaria de las distintas H^+ -PPasas difieren en el número de segmentos transmembrana que presentan (16 ± 1). En rojo se muestran los segmentos que forman el anillo interno y están relacionados con la actividad catalítica, mientras que en verde se muestran los segmentos del anillo externo. PPi-BS: Sitio de unión a PPi.

Se pueden dividir en dos clases bioquímicas en función de su sensibilidad al potasio (K^+): las K^+ -dependientes (tipo planta) y las K^+ -independientes (tipo procariota). Esta sensibilidad depende de un único residuo del sitio GNXX(A/K)A, siendo la presencia de A indispensable, pero no suficiente por sí sola, para la activación de la proteína por K^+ (Davies, Rea et al. 1991; Belogurov and Lahti 2002; Serrano, Pérez- Castiñeira et al. 2007).

Las mPPasas están presentes en las membranas de todos los procariotas fotosintéticos que llevan a cabo fotosíntesis anaerobia, pero no aparecen en las cianobacterias oxigénicas. En eucariotas, están en todos los miembros de la línea verde evolutiva (de algas unicelulares a organismos terrestres) y no se conoce su existencia en hongos y animales (Serrano, Pérez- Castiñeira et al. 2007).

La mPPasa más conocida es la K^+ - dependiente de *Arabidopsis thaliana* (AVP1), habiéndose demostrado que su mutación produce una parada del crecimiento de raíces, tallos y flores. Se ha propuesto que este efecto es debido a un fallo en la creación de un gradiente de protones adecuado que produce una alteración en la distribución de las auxinas (Ferjani, Segami et al. 2011). En este organismo existen otros dos genes que codifican mPPasas, tratándose en ambos casos de miembros de la clase K^+ -independiente. La presencia de estas tres proteínas con función redundante se explica por su distinta distribución en los tejidos de la planta y su expresión diferencial durante el desarrollo del organismo (Hernández, Herrera-Palau et al. 2016). Está ampliamente demostrado que la sobreexpresión homóloga de AVP1 otorga una mayor tolerancia a salinidad a la planta (Gaxiola, Li et al. 2001). Posteriormente se ha realizado la sobreexpresión heteróloga de AVP1 en distintas especies de cultivo (alfalfa, maíz, arroz...), obteniéndose el mismo resultado (Pizzio, Paez-Valencia et al. 2015; Gaxiola, Regmi et al. 2016). Se ha determinado teóricamente que AVP1 es capaz de acidificar la vacuola hasta un nivel de pH de 3,1, asumiendo que el pH citosólico sea de 7,2 (Ferjani, Segami et al. 2014).

En aquellos organismos que poseen tanto H^+ -PPasa como H^+ -ATPasas, estas suelen colocalizar y ambos participan en la acidificación de orgánulos,

dándose una redundancia funcional que lleva a preguntarse sobre el significado fisiológico de la misma (Rea and Poole 1993; Dettmer, Hong-Hermesdorf et al. 2006). La relación entre ambas bombas no está clara, pero estudios recientes en *Vigna unguiculata* demuestran una regulación diferencial de ambas en respuesta a estrés ambiental (Sobreira, Maia et al. 2014). También hay estudios que sugieren que ambas proteínas están restringidas a zonas de composición lipídica distinta.

1.4.2.1 Pirofosfatasas de membrana translocadoras de sodio

Desde el descubrimiento de las mPPasas se había pensado que estas eran capaces únicamente de transportar protones, o potasio en casos concretos, pero los últimos estudios han demostrado que algunas mPPasas K^+ -dependientes funcionan realmente como bombas de sodio (Na^+ -PPasas) (Luoto, Nordbo et al. 2013). En 2005, se descubrió una mPPasa que requería de la presencia de sodio para su actividad en la bacteria hipertermófila *Thermotoga maritima* (Belogurov, Malinen et al. 2005) y posteriormente, en 2007, se identificaron por primera vez dos mPPasas que tenían la capacidad de bombear sodio, una en la bacteria mesófila *Methanosarcina mazei* y otra en la bacteria termófila *Moorella thermoacetica* (Malinen, Belogurov et al. 2007). A partir de entonces, se han llevado a cabo estudios filogenéticos de las Na^+ -PPasas de diversos organismos que sugieren que son una subfamilia de mPPasas K^+ -dependientes formando un clado monofilético. Posiblemente son las predecesoras de las mPPasas transportadoras de protones, y el cambio en el ión transportado se ha dado varias veces en líneas evolutivas independientes. Esta evolución sería la misma que la producida entre las ATPasas, donde una bioenergética basada en el sodio precedió a la bioenergética basada en el uso de protones.

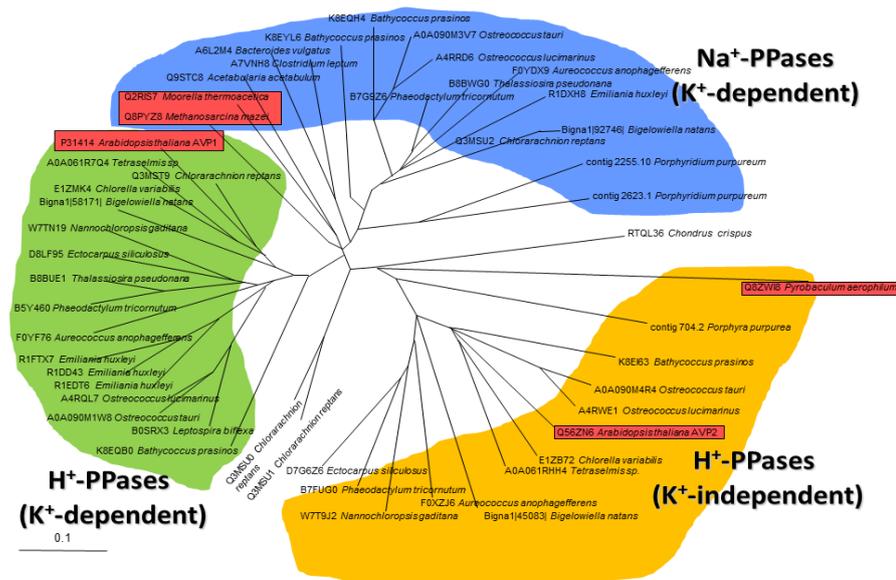


Figura 1.5: Árbol filogenético del grupo de las PPasas de membrana generado con MEGA4.

Se ha identificado un residuo de ácido glutámico (Glu) indispensable para el mecanismo de transporte, localizado en la interfase entre el citosol y la membrana. En Na^+ -PPasas se encuentra en la hélice 6, mientras que en las H^+ -PPasas se encuentra en la hélice 5 o en el interior de la membrana (Luoto, Nordbo et al. 2013).

La expresión heteróloga de la Na^+ -PPasa de *M. mazei* en *E.coli* ha permitido realizar estudios de cinética enzimática. La presencia de Na^+ es absolutamente imprescindible, ya que se necesita la unión de uno o dos de estos iones para que se dé la hidrólisis de PPi . La principal función del K^+ es aumentar la afinidad del enzima por el Na^+ a través de un cambio conformacional de la estructura, haciendo que el máximo de actividad enzimática se produzca cuando ambos están presentes. El Na^+ puede unirse al mismo sitio que el K^+ produciendo una activación de menor amplitud, esto parece ser una característica única de este subgrupo de mPPasas. Al igual que en el resto de PPasas, el sustrato es el Mg^{2+}PPi , por lo cual necesitan de la presencia de Mg^{2+} .

El mecanismo de acción de estas proteínas es el mismo que el del resto de PPasas en cuanto a hidrólisis de PPi, produciéndose la hidrólisis del mismo previa unión a la enzima a través de iones de Mg^{2+} . Esta hidrólisis produce la liberación de un ión de Na^+ desde su sitio de unión hacia el canal de transporte, siendo reemplazado por un H^+ que a su vez será reemplazado por un nuevo ión de Na^+ . Este mecanismo permite comprender mejor la aparición de las mPPasas K^+ -dependientes, ya que una mutación en el sitio de unión del Na^+ haría que el protón liberado en la hidrólisis de PPi atravesara el canal iónico (Baykov, Malinen et al. 2013; Luoto, Baykov et al. 2013; Luoto, Nordbo et al. 2013).

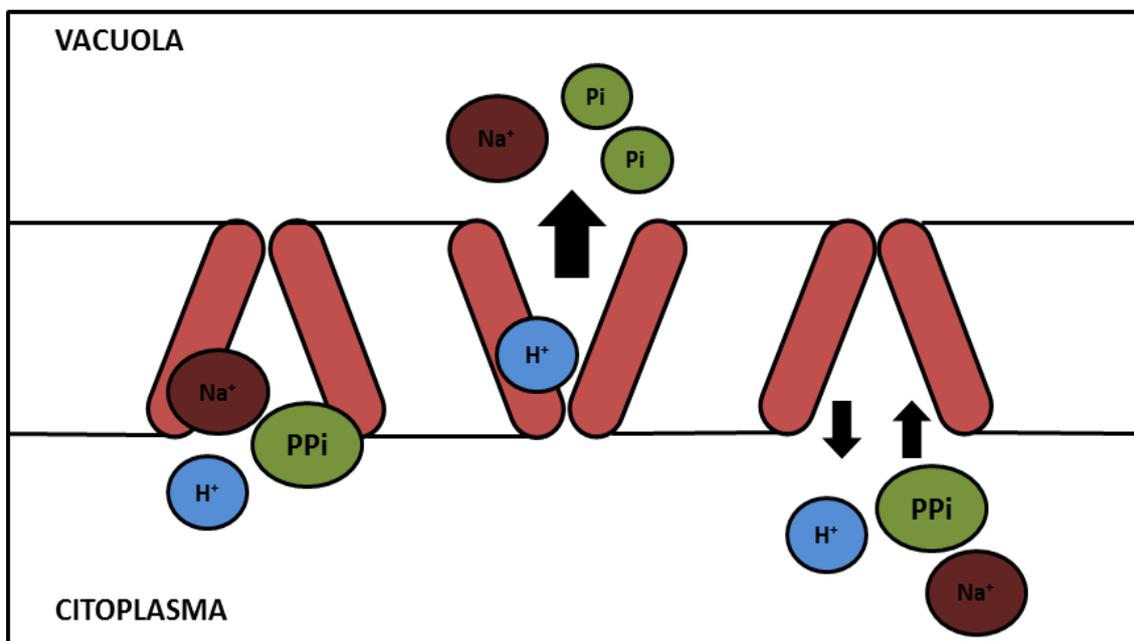


Figura 1.6: Mecanismo de acción de las Na^+ -PPasas. El sitio de unión a Na^+ se pierde durante la evolución, dando origen a las H^+ -PPasas.

1.5 Pirofosfatasas en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *S. cerevisiae* es el organismo más estudiado en relación al metabolismo del PPi, siendo ampliamente utilizado para expresión heteróloga de PPasas de distintos organismos (Baykov and Shestakov 1992; Pérez-Castiñeira, Hernández et al. 2011). Este organismo presenta dos genes que codifican sendas PPasas solubles, no habiéndose encontrado ningún indicio de la presencia de genes que codifiquen mPPasas. La más expresada de ambas es la sPPasa citosólica Ipp1, una proteína esencial para la viabilidad celular (Pérez-

Castiñeira, Gómez-García et al. 2001). La depleción total de esta enzima produce la muerte masiva de células en condiciones fermentativas y la parada del crecimiento en fase S del ciclo celular de células con metabolismo respiratorio (Hernández, López-Lluch et al. 2011). La otra sPPasa de este organismo es una enzima mitocondrial llamada Ipp2 y cuya depleción no produce inhibición del crecimiento, pero sí un fenotipo similar al de los mutantes *petite* que carecen de ADN mitocondrial. Esto indica que la presencia de esta proteína es indispensable para mantener el genoma mitocondrial (Lundin, Baltscheffsky et al. 1991).

En este mismo organismo se ha llevado a cabo la expresión heteróloga de la mPPasa de *A. thaliana* (AVP1), comprobándose que es capaz de complementar funcionalmente la ausencia de Ipp1 y de la ATPasa vacuolar (Pérez-Castiñeira, Hernández et al. 2011).

1.6 Microalgas

El término microalgas se usa para denominar a un grupo heterogéneo de organismos fotosintéticos unicelulares, tanto eucariotas como procariotas. El número de especies descritas contabilizadas es de 40000 – 60000, aunque se estima que el número de especies por descubrir puede ser mucho mayor. Son los responsables de la producción de la mitad del oxígeno atmosférico y de un cuarto de la productividad acuática global (Raven and Falkowski 1999). Presentan un potencial enorme para aplicaciones comerciales y biotecnológicas, debido a que su productividad es mucho mayor que la de plantas y a que algunas de ellas pueden vivir en condiciones extremas de salinidad, temperatura o acidez (Cadoret, Garnier et al. 2012). Sus aplicaciones biotecnológicas son muy variadas e incluyen producción de biodiesel, biorremediación, producción de compuestos de interés industrial, fijación de CO₂ atmosférico... (Hernández-Pérez and Labbé 2014). Las especies que componen este grupo pueden tener una gran diversidad en su metabolismo; incluyendo especies autotróficas, heterotróficas y mixotróficas (Choong, Tan et al. 2016).

1.6.1 Cianobacterias

Son un grupo heterogéneo de microalgas procariotas que surgió hace 2'6-3'5 billones de años, siendo los organismos fotosintéticos más antiguos que se conocen. Son morfológicamente muy diversos, pudiendo ser unicelulares, filamentosos, coloniales... Pueden vivir en diferentes condiciones como agua dulce, alta salinidad o incluso en medio terrestre y son conocidas por su capacidad para realizar distintos tipos de metabolismo. Todos realizan fotosíntesis oxigénica, pero algunas especies pueden realizar fotosíntesis anoxigénica dependiente de sulfuro (Cohen, Jørgensen et al. 1986; Reynolds 1987). En oscuridad o en condiciones anoxigénicas, pueden sintetizar energía mediante fermentación (Lau, Matsui et al. 2015).

La aparición de las cianobacterias primitivas produjo que la atmósfera se enriqueciera en oxígeno, permitiendo la aparición de organismos capaces de utilizarlo para producir energía (Hagemann 2011). Múltiples estudios genéticos sugieren que dieron lugar a la aparición de organismos fotosintéticos, como las algas y las plantas superiores, mediante un proceso de endosimbiosis (Mereschkowsky 1905; Margulis 1970).

La característica más llamativa de las cianobacterias es la capacidad que presentan algunas especies para desarrollar unas células especiales, llamadas heterocistos, donde se produce la fijación de nitrógeno atmosférico. La necesidad de esta especialización se debe a que la fijación de nitrógeno atmosférico es un proceso llevado a cabo por la nitrogenasa, la cual es sensible a la presencia de oxígeno. Estas células son uno de los pocos ejemplos de diferenciación celular en procariotas y se producen en respuesta a la falta de nitrógeno en el medio (Muñoz-García and Ares 2016).

Su presencia en multitud de ecosistemas diversos, pone de manifiesto la impresionante capacidad de estos organismos para adaptarse a multitud de cambios en los factores ambientales. Una de las características implicadas en esta capacidad puede ser su complejo sistema de membranas celulares, ya que están compuestas por una membrana interna rodeada de una pared celular, que a su vez está rodeada por una membrana externa. Además de todas estas

membranas, presentan una tercera capa interna en la que están los fotosistemas y que son conocidas como membranas tilacoidales (Hagemann 2011).

1.6.1.1 Cianobacterias usadas en este estudio: *Synechocystis sp.* PCC 6803

La cianobacteria *Synechocystis sp.* (PCC 6803) es un tipo bacteria gran negativa que ha sido utilizada como modelo en multitud de estudios, debido a que una alta similitud con el cloroplasto de organismos sintéticos eucariotas (Gao, Wang et al. 2015). En 1996, se secuenció totalmente su genoma, siendo el primero de todas las cianobacterias. Se trata de un genoma compacto con un 87% del mismo ocupado por posibles genes codificantes para un total de 3168 proteínas (Kaneko and Tabata 1997). Además del cromosoma principal, existen un total de seis plásmidos procedentes de eventos endosimbióticos (Berla and Pakrasi 2012). Es un organismo ideal para llevar a cabo estudios de mutagénesis por su facilidad de transformación y su capacidad de llevar a cabo recombinación homóloga (Williams 1988). El organismo puede crecer en un rango muy variado de situaciones metabólicas, desde la fotoheterotrofia a la fotoautotrofia total, haciendo que sea un buen sistema para el estudio de procesos fundamentales como la fotosíntesis (Gao, Wang et al. 2015).

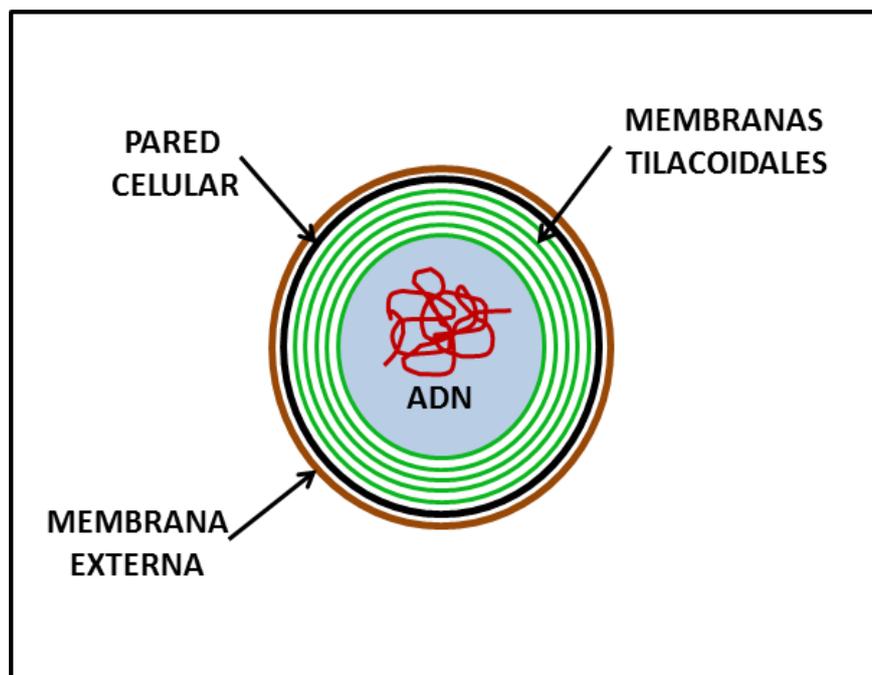


Figura 1.7: Estructura de membranas de *Synechocystis sp.* PCC6803

En su metabolismo del fosfato están implicadas dos proteínas principalmente, una exopolifosfatasa (PPX, EC 3.6.1.11.) que hidroliza los extremos de las moléculas de polifosfato y una pirofosfatasa soluble (PPA, EC 3.6.1.1.). Estudios llevados a cabo por nuestro grupo demuestran que la actividad de esta última es esencial para la viabilidad celular, habiendo resultado imposible obtener un mutante totalmente deficiente en PPA (Gómez-García, Losada et al. 2003). Hasta la fecha, no se conoce la presencia de mPPasas en cianobacterias.

1.6.1.2 Respuesta a estrés salino en Cianobacterias.

Las concentraciones bajas de sodio son necesarias para el metabolismo de las cianobacterias, ya que participa de forma activa en la captación de nutrientes y en el transporte fotosintético de electrones (Elanskaya, Karandashova et al. 2002). Por otro lado, altas concentraciones de este ión pueden ser dañinas, debido a que tiene un efecto negativo sobre la citocromo c oxidasa y disminuye la actividad de los fotosistemas (Joset, Jeanjean et al. 1996).

La cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 es moderadamente halotolerante y su respuesta a altas concentraciones salinas se basa en expulsar sodio de forma activa, acumular potasio y acumular solutos neutros para mantener la homeostasis celular (Karandashova, Elanskaya et al. 2002). Después de un choque salino, la concentración de sodio intracelular aumenta drásticamente en los primeros minutos y, después de 20-60 minutos, se produce una bajada hasta niveles similares de células en condiciones normales. Esta rápida respuesta sugiere la existencia de mecanismo de extrusión de sodio presentes de forma constitutiva en el organismo. Se ha demostrado la existencia en el genoma de este organismo de seis genes que codifican para antiportadores Na^+/H^+ (NhaS1-6), que presuntamente actuarían de forma coordinada en la respuesta salinidad (Hagemann 2011). Se han llevado a cabo estudios mutagénicos de estos genes, tanto de formas aislada como múltiple, y se ha observado que el NhaS3 es esencial para la viabilidad celular, no habiéndose podido conseguir la segregación completa de mutantes deficientes en el mismo

(Elanskaya, Karandashova et al. 2002). Estudios de expresión heteróloga en *E.coli* demostraron que sólo tres de estos genes (NhaS1, NhaS3 y NhaS4) presentaban realmente actividad antiportadora Na^+/H^+ , siendo el NhaS3 el que presentaba la mayor actividad (Wang, Postier et al. 2002). Estos transportadores usan el gradiente electroquímico generado por bombas primarias de protones como la H^+ -PPasa o la citocromo oxidasa respiratoria (Blumwald, Wolosin et al. 1984; Nitschmann and Packer 1992).

1.6.2 Microalgas eucarióticas

Se trata de los organismos eucariotas fotosintéticos más simples que se conocen (Margulis and Sagan 1990) y se caracterizan por presentar una alta plasticidad fenotípica, lo cual les permite vivir en una gran variedad de ambientes distintos, como ambientes marinos o incluso en el suelo (Sieburth 1979). Su gran diversidad filogenética se corresponde con la capacidad que presentan para sintetizar una alta variedad de metabolismo; lo cual, unido a su facilidad de cultivo y rapidez de crecimiento, las hace ser unos organismos ideales para la fabricación industrial de compuestos (Gimpel, Henríquez et al. 2015). Su composición de lípidos las hace una fuente potencial de biocombustibles y, además, sintetizan una variedad de lípidos que no pueden ser sintetizados por los animales, lo que hace que sean de gran interés para la alimentación (Pohl and Zurheide 1979).

Se estima que el grupo está compuesto por 22000-26000 especies, divididas en nueve clases siendo las más importantes las siguientes:

- Chlorophyceae (Algas verdes).
- Phaeophyceae (Algas pardas).
- Pyrrophyceae (Dinoflagelados).
- Chrysophyceae (Algas doradas).
- Bacillariophyceae (Diatomeas).
- Rhodophyceae (Algas rojas).

Esta división se ha realizado en función de su morfología y su composición de pigmentos, aunque las nuevas técnicas de análisis filogenético

están revelando que su taxonomía es mucho más compleja de lo que se pensaba (Hemaiswarya, Raja et al. 2013).

Algunos de sus miembros se han adaptado a la vida en medios extremos de salinidad, temperatura y/o acidez. Uno de estos casos es el del alga Clorofícea *Dunaliella salina*, que puede vivir en ambientes con concentraciones de cloruro sódico por encima de 3M (Oren 2014), o el alga Rodofícea *Galdieria sulphuraria*, que tiene su óptimo de crecimiento en medios con pH 2 y puede crecer a temperaturas de hasta 60°C (Reeb and Bhattacharya 2010).

1.6.2.1 Microalgas eucarióticas utilizadas en este trabajo

Se han utilizado cinco especies pertenecientes a la Clase de las Clorofíceas: dos del género *Chlamydomonas* (*C. reinhardtii* y *C. euryale*), otras dos del género *Chlorella* (*Ch. salina* y *Ch. vulgaris*) y una del género *Ostreococcus* (*O. tauri*). También se han utilizado dos especies de la Clase de las Rodofíceas (*Galdieria sulphuraria* y *Porphyridium purpureum*) y una especie de la Clase de las Bacillariofíceas, la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*.

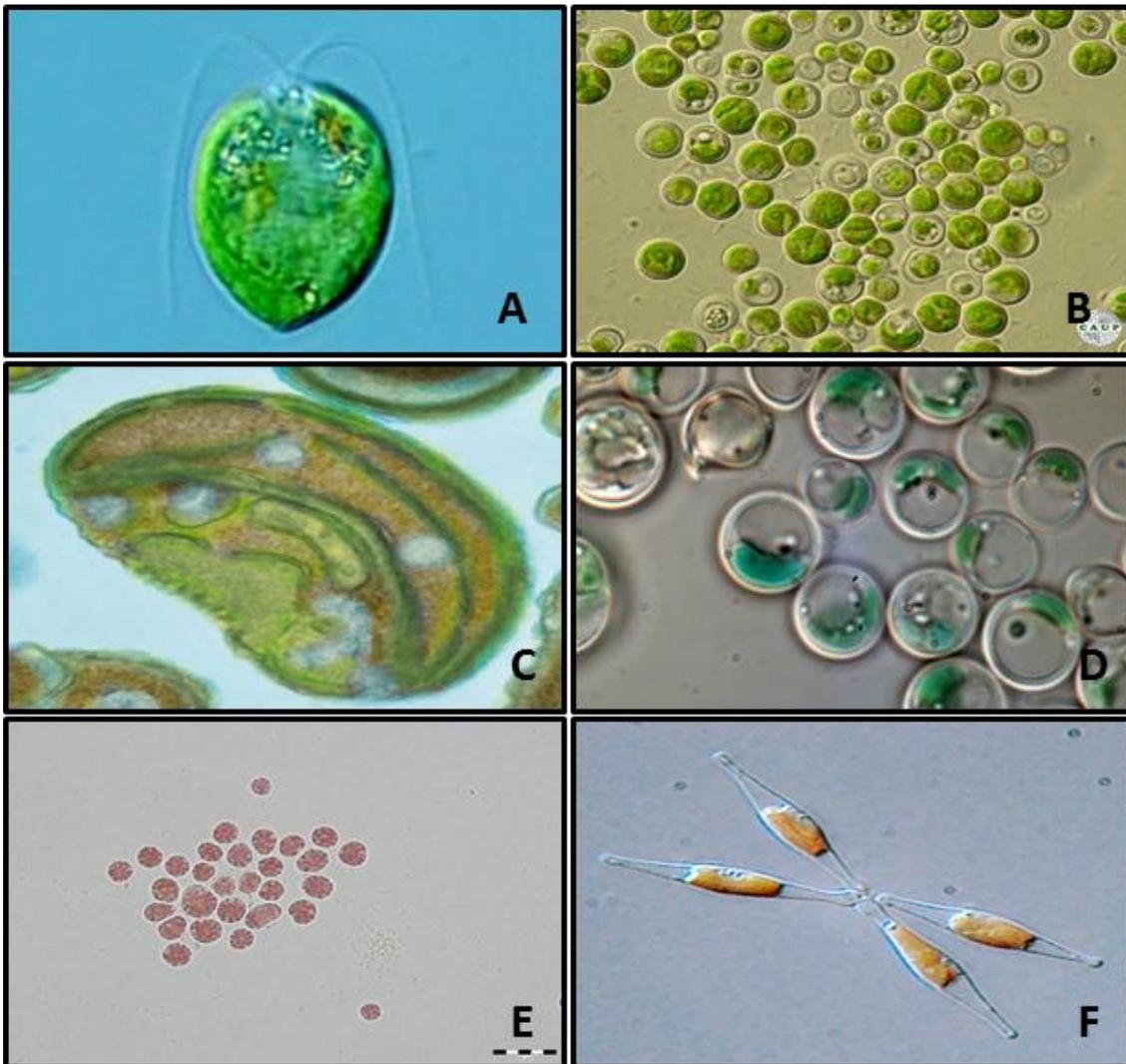


Figura 1.8: Especies de microalgas eucarióticas utilizadas en este trabajo. A: *Chlamydomonas* sp. ; **B:** *Chlorella* sp. ; **C:** *Ostreococcus taur* ; **D:** *Galdieria sulphuraria* ; **E:** *Porphyridium purpureum* ; **F:** *Phaeodactylum triconutum*.

El género *Chlamydomonas* se engloba dentro de la familia Chlamydomonadaceae en el orden Volvocales, que incluye tanto especies unicelulares como coloniales, siendo muchas de las especies del género más cercanas a estos organismos coloniales que a otros unicelulares de su mismo género. Las especies del género *Chlamydomonas* presentan una estructura característica con dos flagelos anteriores de la misma longitud, una pared celular y un único cloroplasto o cromatóforo que contiene uno o más pirenoides (Harris 2009). El pirenoide es una estructura especializada donde se concentra la enzima RuBisCO, enzima esencial para la fijación del CO₂, y que está conectado a los tilacoides por una serie de tubos, lo cual se ha sugerido que

permite conectar las dos fases de la fotosíntesis (Engel, Schaffer et al. 2015). En ella también se produce el almacenamiento de almidón (López-Juez 2007). La estructura del cloroplasto ha sido la herramienta tradicional utilizada para establecer la taxonomía del grupo (Ettl 1976), aunque posteriormente se ha revisado en base a características moleculares como la secuencia del RNA 18s (Pröschold, Marin et al. 2001). Se encuentra distribuidas globalmente, desde zonas polares a tropicales, y se han aislado tanto en agua dulce como salada y en suelos (Harris 2009).

La especie tipo de este género es *C. reinhardtii*, identificada en 1888 (Dangeard 1888) y es la especie más utilizada en laboratorio para análisis genéticos y bioquímicos. Su pared celular está compuesta principalmente por glicoproteínas ricas en hidróxiprolina (Harris 2009). Algunos autores la consideran el ancestro común de animales y plantas (Merchant, Prochnik et al. 2007). Existen dos cepas principales de uso en laboratorio: la cepa 21GR, considerada como la cepa silvestre de la especie, y la cepa CW15, un mutante que no presenta pared celular (Flowers, Hazzouri et al. 2015). Su genoma está secuenciado completamente (Blaby, Blaby-Haas et al. 2014) y se encuentra a disposición pública en base de datos. La célula vegetativa es haploide, presentando dos tipos sexuales (+/-), lo cual le permite realizar tanto reproducción asexual como sexual (Lauersen, Kruse et al. 2015). Normalmente vive en condiciones de autotrofia; pero también puede vivir en condiciones de mixotrofia y heterotrofia, usando acetato como fuente de carbono. Últimamente se está utilizando esta especie como generador de energía, debido a la alta producción de H₂ que se da en su metabolismo, el cual puede ser utilizado para generar energía limpia (Melis and Happe 2001; Zhang, Dechatiwongse et al. 2015). En cuanto al metabolismo del PPI, su genoma cuenta con tres genes que codifican PPasas: dos para PPasas solubles, una cloroplástica (AJ298231.1) y otra mitocondrial (AJ298232.1), y una para uno H⁺-PPasa dependiente de K⁺ (AJ304836.1) (Pérez-Castiñeira, López-Marqués et al. 2001; Gómez-García, Losada et al. 2006).

Otra especie importante dentro de este género es *C. euryale*, un tipo de microalga aislado en 1957 por Lewin en muestras de agua marina (Lewin 1957). Se usó en laboratorio está menos extendido, pero debido a su tipo de vida

marina, puede usarse para entender los mecanismos de resistencia a estrés que se dan en este género. En cuanto a metabolismo del PPI, presenta las tres mismas tres Pasas que la especie *C. reinhardtii*.

El género *Chlorella* fue definido por Beijerinck en 1890, al definir a la especie tipo del grupo conocida como *Ch. vulgaris* (Fott and Nováková 1969). Desde entonces se han identificado más de 100 especies incluyendo organismos de agua dulce, marinos, en suelos e incluso endosimbiontes (Karakashian and Karakashian 1965). Cabe destacar que todos ellos presentan una morfología celular esférica, subesférica o elíptica (Bock, Krienitz et al. 2011). Se reproducen mediante autoesporas, que son liberadas por rotura de la pared celular de la célula madre pudiendo quedar unidas a ellas mediante mucílago y formando una pequeña colonia (Fott and Nováková 1969). Algunas especies como *Ch. sorokiniana* tienen la capacidad de producir compuestos farmacológicos, que pueden ser utilizados para tratar diversas enfermedades. Estudios con este organismo han demostrado que puede regular la respuesta inmune de organismos animales, y sus extractos se han utilizado para inducir apoptosis en células tumorales (Lin, Tsai et al. 2017).

Las especies del género *Chlorella* utilizadas en este trabajo presentan dos genes que codifican para Pasas de membrana en su genoma, uno para una H⁺-PPasa independiente de K⁺ y otro para una dependiente de K⁺. La capacidad de *Ch. salina* para crecer en medios de alta salinidad, ha hecho que sea usada para movilizar el nitrógeno y el fósforo acumulado en aguas residuales (Wong and Chan 1990). Esta capacidad para crecer en medios salinos, unida a la alta concentración de proteínas de su composición, hace que se utilice como alimento para la cría de peces en piscifactorías.

El organismo eucariota de vida libre más pequeño que se conoce es el alga verde *O. tauri* (Courties, Perasso et al. 1998). Es un alga marina perteneciente a uno de los grupos más primitivos de eucariotas conocidos, siendo uno de los antecesores de las plantas terrestres actuales. Se trata de organismos unicelulares que no presentan flagelos ni pared celular y que sólo tienen una mitocondria y un cloroplasto. Esto, unido a su pequeño tamaño y su facilidad de cultivo, hace que sea un excelente organismo modelo para estudios

en laboratorio (Chrétiennot-Dinet, Courties et al. 1995). Su genoma tiene una densidad de genes extremadamente alta, debido a acortamiento de regiones intergénicas y fusión de genes, siendo un genoma con una complejidad estructural elevada (12,5 Mb distribuidas en 20 cromosomas). A pesar de ello, su genoma se encuentra totalmente secuenciado (Derelle, Ferraz et al. 2006). Su uso está muy extendido en el estudio del metabolismo del hierro, que está muy relacionado con respuesta a especies reactivas del oxígeno (Lelandais, Scheiber et al. 2016), y en respuesta a patógenos, prestando especial atención a la síntesis de compuestos antimicrobianos y antivirales (Yau, Hemon et al. 2016).

Las algas de la clase Rodofíceas (algas rojas) forman un grupo heterogéneo que incluyen organismos unicelulares, y filamentosos o pseudoparenquimáticos (talofitas multicelulares), todos ellos sin presencia de flagelos ni centriolos. Se conocen unas 6100 especies, pero se estima que pueden existir unas 14000 más aún no descritas (Price, Chan et al. 2012). La utilización de ficobiliproteína como pigmento fotosintético es una característica común al grupo. Son principalmente algas marinas, aunque existen algunas especies de agua dulce, prefiriendo las zonas tropicales o templadas. Debido a la capacidad que presentan algunas especies para fijar carbonato cálcico, son elementos importantes en la formación de los arrecifes de coral. Muchas especies del grupo son utilizadas en nutrición humana, por ejemplo las especies talofíticas multicelulares del género *Porphyra*, debido a su composición rica en compuestos farmacológicos y compuestos bioactivos (Kong, Mao et al. 2009). En este trabajo se ha utilizado la Na⁺-PPasa de una especie de este género: el alga macroscópica *Po. yezoensis*, un alga con aplicaciones biomédicas (Lee, Kim et al. 2015) y que es utilizada en biorremediación (Wu, Huo et al. 2015).

Dentro de este grupo aparecen algunos ejemplos de organismos extremófilos, como el alga roja acidófila unicelular *Galdieria sulphuraria*. Este microorganismo vive en aguas termales sulfurosas, pudiendo soportar rangos de pH de 0,5 a 5 y temperaturas entre 50 y 60°C (Hirooka and Miyagishima 2016). Su genoma es pequeño y compacto, estando totalmente secuenciado e incluido en base de datos (Chan, Blouin et al. 2012). Su alta tolerancia a ambientes extremos, unida a su capacidad de producir compuestos de interés industrial, ha hecho que sea una especie muy estudiada y bien caracterizada (Reeb and

Bhattacharya 2010). En cuanto a su metabolismo, es capaz de vivir en completa oscuridad usando diversas fuentes de carbono orgánico (glucosa, acetato...) y puede resistir diversos tipos de estrés ambiental (Martinez-Garcia and van der Maarel 2016). Un uso curioso de este organismo es el rescate de moléculas de oro disueltas en medios acuáticos, ya que es capaz de incorporarlo por bioabsorción y puede recuperar hasta el 90% del oro presente en una disolución (Ju, Igarashi et al. 2016).

Otra especie interesante dentro de la Clase Rodofitas es la microalga marina unicelular *Porphyridium purpureum* identificada en 1849 por Nasegli y que empezó a estudiarse en profundidad en los años 80, por sus posibles aplicaciones para la industria farmacéutica y química. Presenta un pigmento conocido como B-ficoeritrina como se usa como colorante alimentario y como proteína fluorescente marcadora en estudios científicos (Gao, Nan et al. 2016). Su genoma está formado por 19,7 Mb que contienen 8355 posibles genes, cientos de ellos obtenidos por transferencia horizontal, y una gran cantidad de intrones (Lee, Kim et al. 2016). El estudio de estos intrones ha llevado a varios autores a proponer que esta alga podría ser uno de los ancestros de los organismos fotosintéticos actuales, enriqueciendo el genoma de esta línea por transmisión horizontal de genes (Perrineau, Price et al. 2015).

El último grupo que se estudia en esta Tesis es la clase de las Bacillariofitas o Diatomeas, un grupo ubicuo de microalgas marinas que se calcula contribuye al 20% - 25% de la fijación global de CO₂ y que han sido objeto de múltiples estudios debido a que presenta gran flexibilidad en su metabolismo, en especial en lo referente a la fotosíntesis (Scholz, McManus et al. 2014). Existen aproximadamente 100000 especies de diatomeas, aunque no todas pertenecen a esta clase, con la característica común de presentar una pared celular rígida formada por silicatos (Wang and Seibert 2017). Esta característica única les otorga una ventaja evolutiva sobre otras especies de microalgas con las que comparte hábitat.

La especie modelo para el estudio de las diatomeas es *Phaeodactylum tricoratum*, una especie marina utilizada en la producción de biodiesel. Su pared celular es inusualmente fina (Huang, He et al. 2011) y puede presentar

hasta cuatro morfotipos distintos: oval, fusiforme, trirradiado y cruciforme; siendo los tres primeros los más comunes. La transformación de unos morfotipos a otros está influida por los factores ambientales a los que se enfrenta (salinidad, temperatura, disponibilidad de nutrientes...) (He, Han et al. 2014). Su genoma de aproximadamente 30 Mb se encuentra completamente secuenciado y es bien conocida la abundancia que presenta en genes obtenidos por transferencia horizontal desde bacterias, lo cual le otorga la capacidad de realizar funciones metabólicas únicas entre las microalgas, como la ruta de oxidación de ácidos grasos o un ciclo de la urea centrado en sus mitocondrias (Veluchamy, Lin et al. 2013).

Tres de las especies de microalgas marinas utilizadas en esta Tesis (*O. tauri*, *P. purpureum* y *Ph. tricornutum*) presentan la característica común de contener en su genoma genes que codifican varias mPPasas de tipo I y II, y entre ellas ciertas mPPasas que por los análisis de comparación de secuencias realizados por nuestro grupo podrían ser consideradas Na^+ -PPasas, aunque es necesario realizar nuevos estudios funcionales para confirmarlo. Estas mPPasas serían las primeras Na^+ -PPasas descritas en organismos eucarióticos, y supondrían una clara ventaja adaptativa para estas microalgas que viven en hábitats ricos en sodio.

1.7 Objetivos de la Tesis Doctoral

1. Expresar funcionalmente la pirofosfatasa soluble (sPPasa) de la Familia II de *Moorella thermoacetica* (MtPPasa) en el eucariota modelo *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Analizar funcionalmente la secuencia del promotor del gen *IPPI* que codifica Ipp1p, la sPPasa mayoritaria de *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Reproducir en *Saccharomyces cerevisiae* el escenario metabólico del PPi de organismos fotosintéticos, mediante la co-expresión de una pirofosfatasa de membrana y variantes de Ipp1p con localización núcleo-citoplásmica alterada.
4. Analizar las implicaciones funcionales y fisiológicas de la distribución núcleo-citoplásmica de la sPPasa Ipp1p de *Saccharomyces cerevisiae*.
5. Estudiar el efecto de la salinidad y tipo de metabolismo (auto-, mixo- o heterotrófico) sobre los niveles de actividad y proteína de las PPasas solubles y de membrana (mPPasas) de diferentes especies de microalgas eucarióticas, tanto marinas como dulceacuícolas.
6. Obtener cepas mutantes de la microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* con la expresión de su H⁺-PPasa alterada, y evaluar el papel de esta mPPasa en la respuesta fisiológica a condiciones de estrés (salinidad) y a cambios metabólicos (auto-, mixo- o heterotofía).
7. Expresar funcionalmente diferentes mPPasas (H⁺-PPasas y Na⁺-PPasas) en la cianobacteria modelo *Synechocystis* sp. PCC6803 y verificar si confieren tolerancia a salinidad.
8. Identificación y clonación de genes de nuevas Na⁺-PPasas de microalgas marinas de diversos grupos taxonómicos (Prasinofíceas, Bacillariofíceas, Rodofíceas). Caracterizar funcionalmente las mPPasas de microalgas marinas, tanto en su organismo nativo como mediante su expresión heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae*.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido presentados en diversos congresos nacionales e internacionales o han sido publicados en revistas científicas de ámbito internacional.

Publicaciones:

Serrano-Bueno G., Madroñal, JM., Manzano-López, J., Pérez-Castiñeira, JR., Muñiz, M., Hernández, A. y Serrano, A. (2017) “Nuclear proteosomal degradation of yeast inorganic pyrophosphatase Ipp1p, a nucleocytoplasmic protein whose stability depends on its subcellular localization” (Enviado, en revisión).

Hernández, A, Herrera-Palau R., Madroñal, JM., Albi T., López-Lluch, G., Pérez-Castiñeira, JR., Navas, P., Valverde, F. y Serrano, A. (2016) “Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase AVP1 is Involved in Amine Fungicide Tolerance in *Arabidopsis thaliana* and Provides Tridemorph Resistance in Yeast.” Frontiers in plant science 7:85.

Comunicaciones a congresos:

Pérez-Castiñeira, JR., Madroñal, JM., Hernández, A. y Serrano, A. (2017) “Salt Stress Affects Complementation of the Soluble Cytosolic Pyrophosphatase of Yeast by Functionally Different Membrane-bound Ion-translocating Pyrophosphatases”. VII Congreso Europeo de Microbiólogos FEMS 2017, Valencia, España.

Madroñal, JM., Pérez-Castiñeira, JR. y Serrano, A. (2017) “Wide Occurrence and Physiological Relevance of Sodium-Pumping Pyrophosphatases in Marine protists”. VII Congreso Europeo de Microbiólogos FEMS 2017, Valencia, España.

Hernández, A., Madroñal, JM., Pérez-Castiñeira, JR. y Serrano, A. (2016) “Functional relation between lipids, proton pumps and autophagy mechanism in yeast” I NEAR (Network of Excellence for Autophagic Research) Meeting, Madrid, España.

Hernández, A., Pérez-Castiñeira, JR., Madroñal, JM. y Serrano, A. (2015) “Acidification-dependent defects in membrane traffic and autophagy in yeast sterol mutants” VII Congreso Europeo de Protistología (VII ECOP-ISOP Joint Meeting), Sevilla, España.

Albi, T., Madroñal, JM. y Serrano, A. (2015) “Similarities and differences of proteins involved in inorganic polyphosphate metabolism in bacteria and photosynthetic protist” VII Congreso europeo de Protistología (VII ECOP-ISOP Joint Meeting), Sevilla, España.

Madroñal, JM., Hernández, A., Pérez-Castiñeira, JR. y Serrano, A. (2015) “Sodium-translocating membrane pyrophosphatases, a novel strategy for ionic homeostasis in photosynthetic marine protist” VII Congreso Europeo de Protistología (VII ECOP-ISOP Joint Meeting), Sevilla, España.

Serrano-Bueno, G., Hernández, A., Madroñal, JM., Pérez-Castiñeira, JR. y Serrano, A. (2013) “Relations Between Autofagy, Energetic Metabolism and Inorganic Pyrophosphatases in *Saccharomyces cerevisiae*” I Reunión Nacional sobre Autofagia, Madrid, España.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Organismos y condiciones de cultivo

2.1.1 *Escherichia coli*

2.1.1.1 Estirpes de *E. coli* utilizadas

Los distintos plásmidos utilizados en este trabajo se propagaron en la estirpe DH5- α (*supE44 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1*) (Hanahan 1983).

Para la clonación de las ORF de pirofosfatasa de membrana, los plásmidos se propagaron en la estirpe BL21(DE3) (F':: Tn10 *proA+B+lacIq D (lacZ) M15/ompT (Ion) hsdS (r_B-m_B-*, una *E. coli B*) (Maniatis, Fritsch et al. 1982).

2.1.1.2 Cultivo de *E. coli* en medio líquido

Tanto el material como los medios empleados fueron previamente esterilizados por medio de un autoclave. Los cultivos en medio líquido se realizaron utilizando medio Luria-Bertani (Sambrook, Fritsch et al. 1989): NaCl 10 g/l, bactotripton 10 g/l, extracto de levaduras 5 g/l. Las células se incubaron en agitadores orbitales a 37°C y 200 rpm. Los antibióticos se incorporaron al medio a partir de una disolución concentrada, esterilizada por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m de poro y teniendo en cuenta que la temperatura del medio no fuese superior a 50 °C. Para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, el medio LB se suplementó con 100 μ g/ml de ampicilina (Ap) o 50 μ g/ml de kanamicina (Km).

2.1.1.3 Cultivo de *E. coli* en medio sólido

Para los cultivos en medio sólido se utilizó medio LB suplementado con agar de grado bacteriológico (Aplichem) al 2% (p/v). Al igual que en los medios líquidos, para el cultivo y selección de bacterias portadoras de plásmidos, los medios se suplementaron con el antibiótico correspondiente a las concentraciones antes indicadas y se añadieron teniendo en cuenta que la

temperatura del medio no sobrepasara los 55 °C aproximadamente, justo antes de extender el medio en placas de Petri.

2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.2.1 Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas

Las estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla I.

Tabla I: Estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Estirpe	Características
W303-1a	MATa, <i>ade2-1 can 1-100 his3-11, 15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>
YPC3	<i>W303-1a ipp1::HIS3 GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-IPP1</i>
SAH6	<i>YPC3 vph1Δ::KanMX4</i>
BJ5459	ATCC 208284: MATa, <i>ura3-52 trp1 lys2-801 leu2Δ1 his3Δ200 pep4Δ::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL cir⁺</i>
YPC5	<i>W303-1a ena1-4Δ::HIS3 ipp1_{UAS}-ipp1_{TATA}::TRP1-GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-IPP1</i>
YPC6	<i>W303-1a ena1-4Δ::HIS3 nha1Δ::LEU2 ipp1_{UAS}-ipp1_{TATA}::TRP1-GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-IPP1</i>
BJ5459	MATa, <i>ura3-52 trp1 lys2-801 leu2Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R GAL</i>

2.1.2.2 Cultivo de *S. cerevisiae* en medio líquido

Por lo general, las levaduras se cultivaron en medio complejo YPD (Sherman, Fink et al. 1987): glucosa 20 g/l, proteosa peptona 20 g/l, extracto de levaduras 10 g/l.

Para los experimentos con el mutante YPC3 se utilizó el medio YPD descrito anteriormente, sustituyendo la glucosa 20 g/l por galactosa 20 g/l (YPGal) o por glicerol 30 g/l (YPGli, condiciones respiratorias, MR).

Las levaduras se cultivaron desde placas de medio sólido en tubos de 10 ml con 2 ml de medio. Se dejaron crecer a 30 °C con agitación (150-200 rpm) hasta fase estacionaria. Tras esto, se reinocularon en matraces Erlenmeyer de volumen variable y se dejaron crecer en las mismas condiciones sin sobrepasar nunca una O.D.₆₀₀ igual a 1 durante el tiempo necesario para cada experimento.

Cuando se necesitó cultivar las células en medios selectivos, se usó medio sintético SD (Trecó and Lundblad 2001): 0,17 g/l de Base Nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato amónico (YNB) (Sigma) -como fuente de fósforo, potasio, sulfato, magnesio, calcio, vitaminas y oligoelementos-, 0,5 g/l de sulfato amónico y 2 g/l de glucosa. Este medio fue suplementado con un aporte adicional de aminoácidos y nucleótidos dependiendo de las auxotrofías de las extirpes a cultivar (Sherman 1991). Todos los materiales y medios utilizados se esterilizaron en un autoclave, excepto la mezcla de aminoácidos y nucleótidos que se filtró. En ciertos procedimientos, se necesitó seleccionar las levaduras en galactosa, para ello se utilizó un análogo del medio SD en el cual la glucosa es sustituida por galactosa en la misma proporción, llamado medio SGal. Si la situación lo requería, el medio se tamponó con tampón MES-Tris 50 mM a pH adecuado. Los cultivos se llevaron a cabo de la misma forma que lo expuesto anteriormente para los medios complejos.

2.1.2.3 Cultivos de *S. cerevisiae* en medio sólido

Las placas de medio complejo YPD o YPGal se obtuvieron suplementando con 2 g/l de agar bacteriológico a los medios preparados según se indica anteriormente.

Para la obtención de placas de medio selectivo, se autoclavó una cantidad de agua necesaria a la que se añadió una cantidad de agar suficiente para que la concentración final fuese de 2 g/l. Tras enfriar esta mezcla hasta aproximadamente 55 °C, el medio se suplementó con los componentes necesarios según los protocolos expuestos en el apartado anterior y se extendió en placas de Petri.

2.1.2.4 Cultivos de *S. cerevisiae* en medios especiales

Para el estudio de la complementación de la V-ATPasa se prepararon placas de medio YPD a pH 5,6 y 7,5. Para ello, el medio se tamponó con Tris-

HCl 50 mM a pH adecuado. Cuando fue necesario, se añadió bafilomicina (Baf A) hasta una concentración de 2 $\mu\text{g/l}$ a las placas ya solidificadas.

Para los ensayos de crecimiento en medio líquido, se usaron tubos de cultivo de 10 ml con 2 ml de medio YPD a pH 5,6 y 7,5 a los que se les añadió Baf A hasta una concentración de 2 $\mu\text{g/l}$ en caso necesario.

2.1.3 Cianobacterias

2.1.3.1 Estirpes de cianobacterias utilizadas

La estirpe empleada para los ensayos de sobreexpresión heteróloga de PPasas de membrana fue la cianobacteria unicelular, no formadora de heterocistos *Synechocystis sp.* PCC6803, perteneciente a la sección I de la clasificación taxonómica definida por Rippka (Rippka, Deruelles et al. 1979).

2.1.3.2 Cultivo de *Synechocystis* en medio líquido

Las cianobacterias se cultivaron en condiciones axénicas empleando el medio BG11 descrito por Rippka (Rippka, Deruelles et al. 1979), que se compone de NaHCO_3 12mM, NaNO_3 17,6 mM, MgSO_4 0,3 mM, CaCl_2 0,24 mM, Na_2CO_3 0,20 mM, K_2HPO_4 0,2 mM, H_3BO_3 46 μM , ácido cítrico 28,5 μM , citrato de hierro amonio (17% Fe) 6 mg/ml, MnCl_2 9,1 μM , Na_2 -EDTA 24,9 μM , Na_2MoO_4 1,6 μM , ZnSO_4 0,8 μM , CuSO_4 0,3 μM y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 0,2 μM . El medio se preparó a partir de un concentrado que contenía la mayoría de las fuentes minerales a una concentración 100x excepto el K_2HPO_4 y la fuente de nitrógeno (NaNO_3), usado a una concentración de 17,5 mM, que se añadían por separado previa esterilización en un autoclave. Cuando se requería, el medio se suplementó con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina (Km).

Los cultivos en medio líquido se realizaron en condiciones de esterilidad utilizando matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de medio de 50-100 ml, que posteriormente eran incubados en agitadores orbitales en cámaras termostalizadas a 30 °C con iluminación continua de luz blanca a una intensidad luminosa entre 25 y 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y agitación constante de 100 rpm.

2.1.3.3 Cultivo de *Synechocystis* en medio sólido

El cultivo en medio sólido se realizó añadiendo un 1% (p/v) de Bacto-Agar (Difco, E.E.U.U.) al medio BG11, esterilizándolo por separado del resto de nutrientes y mezclando ambos justo antes de expandirlo en placas de Petri a una temperatura aproximada de 55 °C.

Las células de cianobacterias se extendían con un asa de microbiología estéril y las placas se colocaban dentro de unos recipientes rectangulares de metacrilato transparentes en cámaras termostalizadas a 30 °C y bajo luz blanca continua con una intensidad luminosa entre 25 y 30 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.1.4 Microalgas eucarióticas

2.1.4.1 Estirpes de microalgas eucarióticas utilizadas

Los experimentos fisiológicos se llevaron a cabo con un total de doce especies de microalgas eucarióticas, todas unicelulares, pertenecientes a las clases Chlorophyceae, Rhodophyceae, Bacillariophyceae y Eustigmatophyceae.

Entre las especies de la clase de las clorofíceas, se utilizaron las microalgas dulceacuícolas *Chlamydomonas reinhardtii* estirpe 21gr (silvestre) y *Chlorella sp.* NC64A (CCAP211/84) y *Coccomyxa onubensis* (acidófila); y las especies marinas *Chlamydomonas euryale* 25-89, *Ostreococcus tauri* RCC745 y *Chlorella salina* 8-86. Se usaron dos especies unicelulares de la clase rodofíceas, la microalga extremófila (termoacidófila) *Galdieria sulphuraria* 74W y la microalga marina *Porphyridium purpureum* 1380-1a. Se utilizaron, también, una especie de la clase de las bacilariofíceas, la diatomea marina *Phaeodactylum tricorutum* 07/0502, y tres especies de eustigmatofíceas marinas, *Nannochloropsis gaditana*, *N. oculata* 38.85 y *N. salina* 40.85.

Además, se llevaron a cabo experimentos de transformación génica de *C. reinhardtii* utilizando para ello la estirpe deficiente en pared celular CW15, un mutante derivado de la estirpe 21gr, y su derivada auxótrofa para arginina CW15-325 (*cw_amt⁺ arg7-8 nit1⁺ nit2⁺*).

2.1.4.2 Cultivo de microalgas eucarióticas en medio líquido

Las distintas especies de microalgas se cultivaron en sus medios específicos debido a las diferentes necesidades fisiológicas de cada una de ellas.

Las especies *C. reinhardtii*, *C. euryale* y *Chlorella* sp. NC64A se cultivaron fotoautotróficamente en el medio mineral descrito por Sueoka et al (Sueoka, Chiang et al. 1967): KH_2PO_4 5,3 mM, K_2HPO_4 8,3 mM, MgSO_4 0,06 g/l, CaCl_2 0,02 g/l, trazas Hutner y KNO_3 1,5 g/l o NH_4Cl 0,5 g/l según se necesite usar una u otra fuente de nitrógeno. Para la especie *C. euryale* el medio se suplementó con NaCl 8,77 g/l. Para el cultivo de la cepa de *C. reinhardtii* CW15-325, el medio Sueoka se suplementó con 0,1 g/l de arginina. La especie *G. sulphuraria* se cultivó fotoautotróficamente a pH 2 en el medio mineral descrito por Gross (Gross and Schnarrenberger 1995): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5 g/l, MgSO_4 0,35 g/l, KH_2PO_4 0,3 g/l, NaCl 0,02 g/l, CaCl_2 0,02 g/l, FeSO_4 0,69 g/l, EDTA-Na 0,93 g/l y una solución de elementos traza (H_3BO_3 , MnCl_2 , ZnSO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, CuSO_4 , Na_3VO_4 y CoCl_2), ajustando el pH a 2 con H_2SO_4 . La especie *Co. onubensis* se cultivó fotoautotróficamente a pH 2,5 en un medio específico (Silverman and Lundgren 1959). Las especies *P. purpureum*, *Ph. tricornutum* y las tres *Nannochloropsis* se cultivaron fotoautotróficamente en el medio F/2 de Guillard (Guillard and Ryther 1962): KNO_3 0,15 g/l, NaH_2PO_4 0,113 g/l, una solución de metales traza (FeCl_3 , CuSO_4 , Na_2MoO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 y MnCl_2) y una solución de vitaminas (tiamina, biotina y Vit B12), completando hasta un litro con agua de mar filtrada. Las especies *O. tauri* y *Ch. salina* se cultivaron fotoautotróficamente en el medio específico para *Acaryocloris marina* descrito por Swingley y col. (Swingley, Chen et al. 2008): NaNO_3 0,2 g/l, Na_2HPO_4 4 mg/l, K_2HPO_4 5 mg/l, una solución de metales traza (Fe-EDTA , Mn-EDTA , $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, ZnSO_4 , CoSO_4 , Na_2MoO_4 , CuSO_4 , H_2SeO_3 y MnCl_2) y una solución de vitaminas (tiamina, biotina y Vit B12), completando hasta 1 l con agua de mar filtrada.

Los cultivos en medio líquido se desarrollaron en condiciones de esterilidad utilizando matraces de Erlenmeyer de 1 l de capacidad con 100-200 ml del medio correspondiente, que posteriormente eran incubados en agitadores

orbitales bajo luz blanca continua ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.) en cámaras termostalizadas a 20 °C, 25 °C o 30 °C según la especie.

Los transformantes de *C. reinhardtii* obtenidos durante la realización de este trabajo se cultivaron en 100-200 ml de medio Sueoka con NH_4Cl o KNO_3 como fuente de nitrógeno a una concentración final de 10 mM. Estos cultivos se desarrollaron en matraces de 500 ml de capacidad en las mismas condiciones descritas anteriormente.

2.1.4.3 Cultivo de microalgas eucarióticas en medio sólido

Para los cultivos en medio sólido se añadió un 1% (p/v) de Bacto-Agar (Difco, E.E.U.U.) a los medios, esterilizándolo por separado del resto de nutrientes y mezclando ambos justo antes de expandirlo en placas Petri a una temperatura aproximada de 55 °C.

Las células de microalgas se extendían usando perlas de vidrio estériles y las placas se colocaban dentro de unos recipientes rectangulares de metacrilato transparentes en cámaras termostalizadas a 25 °C y bajo luz blanca continua con una intensidad luminosa de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

2.1.4.4 Condiciones especiales de cultivo

Para los experimentos fisiológicos en distintas condiciones nutricionales, los cultivos de *C. reinhardtii* se desarrollaron en medio TAP amonio (Harris 2013) con acetato sódico 17 mM como fuente de carbono, en luz continua para las condiciones de mixotrofia y en oscuridad para condiciones de heterotrofia. Los cultivos de *Chlorella sp.* NC64A se desarrollaron en medio Sueoka suplementado con 17 mM de glucosa, en luz continua para las condiciones de mixotrofia y en oscuridad para las condiciones de heterotrofia. Los cultivos de *G. sulphuraria* se desarrollaron en el medio descrito por Gross (Gross and Schnarrenberger 1995) suplementado con 25 mM de glucosa, en luz continua para condiciones de mixotrofia y en oscuridad para condiciones de heterotrofia.

Para las condiciones de fotoautotrofia se utilizaron los medios descritos en el apartado anterior.

Para los estudios fisiológicos del efecto de la salinidad sobre la expresión de las distintas PPasas de membrana, se desarrollaron los distintos cultivos hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento y, en este punto, se suplementaron con la cantidad de NaCl adecuada para obtener las concentraciones finales que se indican en el capítulo correspondiente de resultados. Los controles se realizaron añadiendo al cultivo un volumen de agua estéril idéntico al volumen de disolución salina añadido al resto de cultivos. Todos los cultivos se mantuvieron en estas condiciones durante 24 horas antes de recoger las células.

2.1.5 *Arabidopsis thaliana*

2.1.5.1 Cepas de *A.thaliana* utilizadas

En este trabajo se ha utilizado el ecotipo Columbia de *A.thaliana*, perteneciente a la familia de las Brassicáceas, como planta silvestre. Además se han utilizado los mutantes de inserción de T-DNA de los genes de *AVP1* y *AVP2* (*fugu5-1*, *fugu5-3*, *avp2-1* y *avp2-2*), que codifican las H⁺-PPasas dependiente e independiente de K⁺ respectivamente. Los mutantes deficientes de *AVP1* (*fugu5-1* y *fugu5-3*) se obtuvieron del Dr. A. Ferjani (Tokyo Gakugei University, Tokyo, Japan), mientras que los mutantes de *AVP2* (*avp2-1* y *avp2-2*), designados en este trabajo como *sm1* y *sm2*, se obtuvieron de la colección del “Salt Lake Institute Genomic Analysis Laboratory” (EE.UU.). La homocigosis de las inserciones de T-DNA se comprobaron mediante PCR. Las características de los mutantes utilizados se muestran con más detalle en la Tabla II.

Tabla II: Mutantes de *Arabidopsis thaliana* utilizados

Mutante	Gen	Proteína	Mutación	Referencia
<i>fugu 5-1</i>	At1g15690	AVP1	A709-T	(Ferjani, Segami et al. 2011)
<i>fugu 5-3</i>	At1g15690	AVP1	A553-T, Δ554-558	(Ferjani, Segami et al. 2011)
<i>avp2-1 (sm1)</i>	At1g78920	AVP2	Quinto intrón	(Hernández, Herrera-Palau et al. 2016)
<i>avp2-2 (sm2)</i>	At1g78920	AVP2	3' UTR	(Hernández, Herrera-Palau et al. 2016)

2.1.5.2 Esterilización y germinación de semillas en placas de Petri

Para el cultivo de las plantas en placas de Petri se procedió a la esterilización de las semillas de *A. thaliana*. En función del experimento se utilizaron dos métodos alternativos de esterilización: en líquido o por vapor.

Para la esterilización en líquido, las semillas se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml y se añadió a los mismos 1 ml de solución de hipoclorito, (CaCl₂ 0,34 M y Tritón X-100 0,02% (v/v)). Los tubos se agitaron durante 20 min con ayuda de un agitador automático y se descartó la solución, se añadió 1 ml de etanol 70% (v/v) y se volvieron a agitar durante 2 min. A partir de ese momento, todos los pasos posteriores se realizaron en esterilidad, realizándose 3 lavados consecutivos con agua desionizada estéril. Las semillas se precipitaron con un breve pulso de centrifugación y se resuspendieron finalmente en 1 ml de agar de cobertera (Difco agar 0,2% (p/v)) para su siembra.

Para la esterilización por vapor, las semillas se distribuyeron en tubos eppendorf de 1.5 ml abiertos dentro de una cámara de vacío, junto con un vaso de precipitado que contenía una solución de lejía (o hipoclorito sódico al 50% (v/v)) al que se añadió ácido clorhídrico al 1,2% (v/v) justo antes de establecer el vacío. Mediante este vacío se mantuvieron las semillas en contacto con los gases de cloro durante toda la noche, sembrándose a la mañana siguiente en cámaras estériles.

Una vez esterilizadas las semillas, se sincronizaron manteniéndolas a 4 °C y en oscuridad durante 4-5 días, lo que asegura que su germinación se produzca al mismo tiempo.

Posteriormente, las semillas se sembraron en placas de Petri estériles con medio MS 0,5X: NH_4NO_3 1,65 g/l, MgSO_4 0,18 g/l, CaCl_2 0,33 g/l, KH_2PO_4 0,17 g/l, KNO_3 1,9 g/l y una solución de microcomponentes (MnSO_4 , H_3BO_3 , Na_2MoO_4 , KI, CoCl_2 , CuSO_4 , Fe-EDTA y ZnSO_4), se suplementaron con sacarosa 1% (p/v), se tamponaron con MES 0,5 g/l, pH 5,8 y se solidificaron con Phytigel (Sigma-Aldrich) al 0,4% (p/v).

Las placas con las semillas se colocaron en cámaras de cultivo (fitotrón) modelo SG-1400 (Radiber S.A., España), con un fotoperíodo de día largo o DL (16 h de luz / 8 h de oscuridad) o de día corto o DC (8 h de luz / 16 h de oscuridad), con una humedad relativa del 70% y temperaturas de 22 °C y 20 °C en los periodos de luz y oscuridad, respectivamente. La intensidad luminosa al nivel de las plantas se mantuvo entre 100 y 120 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca.

2.1.6 Curvas de crecimiento de los cultivos

Para la confección de las curvas de crecimiento de los distintos organismos, las células se cultivaron en los correspondientes medios líquidos según se indica en los apartados anteriores y, a distintos tiempos, se tomaron muestras que permitían determinar la densidad óptica (a 600 nm para microalgas y levaduras, 580 nm para *Synechocystis*), o la cantidad de pigmentos (para los organismos fotosintéticos), que se realizaba según el Apdo 2.5, de los cultivos. 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

Para la mayoría de microorganismos la recogida de células habitual se realizó habitualmente mediante centrifugación en centrífugas preparativas refrigeradas Beckman AvantiTM usando rotores JLA 16.250 y JA 25.50. Se utilizaron regímenes a temperatura constante (4 °C), de 800 g durante 10 min para levaduras y de 1000-2000 g para microalgas y cianobacterias. Para cultivos inferiores a 1,5 ml se utilizó una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C a 5000 g durante 5 min. Cuando en estos experimentos se requería transferir células entre distintos medios de cultivo, se recogieron de la misma forma pero en condiciones de esterilidad y lavando dos veces con medio fresco nuevo, resuspendiendo finalmente en el nuevo medio a la concentración celular adecuada.

2.3 Preparación de extractos celulares

2.3.1 Preparación de extractos celulares de *S. cerevisiae*

2.3.1.1 Obtención de fracciones solubles

Para la obtención de las fracciones solubles, las células se crecieron durante el tiempo necesario para cada experimento hasta una O.D.₆₀₀ de 0,5-1 y, tras recolectarse por centrifugación según se ha descrito en el apartado anterior, se lavaron con agua fría y se resuspendieron en tres volúmenes de tampón de rotura (TR: Tris H-Cl 25 mM (pH 8,0), glicerol 10%, β-mercaptoetanol 4 mM, DTT 2 mM, EDTA-Na 2 mM, MgCl₂ 10 mM, benzamidina 1 mM, ácido ε-aminocaproico 1 mM, PMSF 1 mM) a 0 °C. La rotura se produjo por agitación en presencia de 500 µl de perlas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) por cada ml de preparación celular, sometiendo la mezcla a cinco períodos de agitación vigorosa de 1 min, con ayuda de un agitador automático, alternados con períodos de 1 min en hielo. El homogenado se centrifugó 20 min a 20000 g para eliminar las perlas de vidrio, orgánulos grandes intactos y restos de células enteras. El sobrenadante constituye el extracto soluble (fracción de proteínas solubles) total.

2.3.1.2 Fraccionamiento subcelular: Obtención de fracciones citosólicas y nucleares

Todas las centrifugaciones para las preparaciones de fracciones nucleares y citosólicas se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-80.

Las células se cultivaron en 500 ml de medio complejo durante la noche hasta alcanzar una $O.D._{600} = 1$. A continuación, las células fueron convertidas en protoplastos mediante digestión de la pared celular con una mezcla de enzimas líticas, pectinasas y celulasas (Lallzyme MMX; Lallemand, www.lallemand-health-solutions.com). Para ello, las células recogidas por centrifugación se lavaron dos veces con agua fría y se resuspendieron en 20 ml de tampón de lavado (TL: Tris-HCl 50 mM (pH 9,4), β -mercaptoetanol 20 mM) con el que se incubaron a temperatura ambiente y agitación suave durante 20 min. A continuación se lavaron las células con tampón SCS (sorbitol 1 M, ácido cítrico 20 mM (pH 5,8)), se resuspendieron las células en tampón SCS con 0,05 g/ml de Lallzyme y se incubaron a 30 °C con agitación suave hasta generar protoplastos. Se considera que el proceso es óptimo cuando la $O.D._{600}$ entre una alícuota de células resuspendida en agua es 10 veces inferior a una alícuota resuspendida en tampón SCS. Seguidamente se centrifugaron los protoplastos a 3000 g durante 7 min, a partir de este punto todo el proceso se realizó a 4 °C y todos los tampones incluyeron inhibidores de proteasas -PMSF, benzamidina y ácido ϵ -aminocaproico- todos ellos a una concentración final de 1 mM.

Para la separación de las fracciones citosólicas y nucleares, los protoplastos se resuspendieron en tampón Ficoll (TF: Ficoll 400 18%, glicerol 20%, MES-NaOH 20 mM (pH 6,5), $MgCl_2$ 0,5 mM) y se homogeneizaron 6-8 veces con un homogeneizador de teflón. Este homogenado se colocó suavemente sobre 10 ml de tampón Ficoll-glicerol (TFG: Ficoll 400 7%, glicerol 20%, MES-NaOH 20 mM (pH 6,5), $MgCl_2$ 0,5 mM) y se centrifugó durante 30 min a 21500 g (rotor Sorvall SW28). Una vez completada esta centrifugación, se recogieron 5-10 ml de la fase superior y se centrifugaron nuevamente durante 30 min a 100000 g (rotor Sorvall 70Ti), obteniéndose como sobrenadante la fracción citosólica libre de núcleos. El precipitado obtenido en la centrifugación a 21500 g se resuspendió en 20 ml de TF y se centrifugó

durante 15 min a 3300 g (rotor Sorvall SW28). El sobrenadante obtenido se centrifugó durante 30 min a 21500 g (rotor Sorvall SW28) y el precipitado resultante se resuspendió en 500 µl de TR, obteniéndose así la fracción nuclear libre de citosol (Zhang and Reese 2006).

2.3.1.3 Preparación de preparaciones membranas y extractos solubles

Todas las centrifugaciones para las preparaciones de membrana se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman modelo XL-80 usando los rotores 70-Ti a 120000 g durante 30 min.

Para la preparación de membranas y extractos solubles de levadura, las células se cultivaron durante la noche en 200 ml de medio complejo hasta saturación. Tras ser recogidas por centrifugación, se lavaron con agua fría y se resuspendieron en 5 ml de tampón A (TA: Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glicerol 10%, β-mercaptoetanol 4 mM, DTT 2 mM, EDTA 2 mM, MgCl₂ 10 mM, benzamidina 1 mM, ácido ε-aminocaproico 2 mM, PSMF 1 mM) a 0 °C, tras lo cual se procedió a su rotura por agitación en presencia de perlas de vidrio como se describe en el apartado 2.3.1.1. El homogenado se diluyó hasta 15 ml con tampón B (TB: Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), glicerol 10%, DTT 2 mM, EDTA 1 mM) y se centrifugó durante 10 min a 700 g (rotor Sorvall SS-34), para eliminar las perlas de vidrio y las células completas. El sobrenadante se centrifugó a 120000 g (rotor Beckman 70Ti) durante 30 min para sedimentar la fracción total de membranas. El sobrenadante procedente de esta ultracentrifugación constituyó el extracto crudo soluble. El precipitado de membranas se homogeneizó con un homogeneizador de teflón en 10 ml de tampón de “stripping” (TS: Tris-HCl 60 mM (pH 8,0), glicerol 12% (p/v), KCl 0,72 M, CaCl₂ 11mM y PMSF 1 mM) y se centrifugó una vez más en las mismas condiciones para eliminar posibles contaminaciones por proteínas de la fracción soluble. El precipitado se volvió a lavar una vez más con TB y finalmente se resuspendió y homogeneizó en 0,5-1 ml del propio TB. Esta preparación final constituye la fracción de membranas totales.

Para la preparación de microsomas se realizó un paso de centrifugación adicional previo a la primera centrifugación para eliminar en el precipitado la fracción mitocondrial. Este paso consiste en una centrifugación a 20000 g (rotor Beckman JA 25.50) durante 20 min. El resto del procedimiento es el mismo que el descrito para la preparación de membranas totales.

2.3.2 Preparación de extractos celulares de microalgas eucarióticas

Para la obtención de extractos celulares de microalgas tanto solubles como de membrana se siguió el mismo procedimiento que en el caso de las levaduras, pero con algunas diferencias en el proceso de rotura. La rotura se produjo en presencia de 500 µl de perlas de vidrio de 0,2 µm de diámetro (Sigma-Aldrich), sometiendo la mezcla a diez períodos de agitación vigorosa de 1 min, con ayuda de un agitador automático, alternándolos con períodos de 1 min en hielo. En algunos casos, la rotura se produjo sometiendo los concentrados celulares a 6 períodos de sonicación de 20 segundos a una amplitud del 30 %, en un sonicador digital BRANSON, alternados con períodos de 30 segundos en hielo.

Tras esto, el resto del proceso continuó tal y como se detalla en el apartado 2.3.1 para las preparaciones de levaduras.

2.3.3 Preparación de extractos celulares de *Synechocystis*

2.3.3.1 Obtención de extractos crudos

Los extractos crudos de *Synechocystis* se prepararon mediante rotura con perlas de vidrio. Para ello, las células se recogieron como se indica en su apartado correspondiente, se lavaron con agua fría y se resuspendió el precipitado en un volumen adecuado de TR. A esta suspensión se añadió una cantidad equivalente a 150 µl de perlas de vidrio de 0,2 µm de diámetro (Sigma-Aldrich) por cada 100 µl de tampón y se sometió a 10 períodos de agitación vigorosa de 1 min, con ayuda de un agitador automático, alternándolo con períodos de 1 minuto en hielo. Los restos celulares y las proteínas no

solubles se separaron de la fracción soluble por centrifugación durante 15 minutos a 13.000 g y 4 °C, considerándose el sobrenadante libre de perlas y restos celulares como el extracto celular.

2.3.3.2 Obtención de preparaciones de membranas

Para la obtención de preparaciones de membranas, se desarrollaron cultivos celulares en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio BG11 hasta que la concentración de clorofila era de 4 µg/ml aproximadamente. Posteriormente se recogieron las células por centrifugación a 7000 g a 4 °C durante 10 min y se resuspendieron en 40 ml de tampón de tilacoides (TL: HEPES NaOH (pH 7,0) 25 mM, CaCl₂ 5 mM, MgCl₂ 5 mM y glicerol 15%). A continuación, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, se repitieron los lavados dos veces más y finalmente se resuspendieron las células en un volumen de TL adecuado para que la concentración final de clorofila quedase aproximadamente a 1 mg/ml. Posteriormente se tomaron 500 µl de suspensión celular a los que se le añadió PMSF 1 mM y 500 µl de perlas de vidrio pretratadas con EDTA.Na (0,5 M (pH8)) en un tubo Eppendorf y se sometieron a diez periodos de agitación vigorosa de 1 min, con ayuda de un agitador automático, alternándolo con periodos de 1 minuto en hielo. Tras centrifugar a 5000 rpm y 4 °C durante 5 min en una centrífuga Eppendorf de sobremesa, se descartó el precipitado compuesto por células enteras y perlas de vidrio, y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf, que se centrifugó nuevamente a 13000 rpm y 4 °C durante 20 min. El sobrenadante constituido por la fracción de proteínas solubles se descartó si no era necesario, y la fracción de membranas que se encontraba como precipitado se resuspendió en 20 µl de TL y se trató con un micro-homogeneizador para resuspender completamente las membranas.

2.3.4 Preparación de extractos celulares de *A. thaliana*

2.3.4.1 Preparación de preparaciones de membranas y extractos celulares

Para la obtención de preparaciones de membranas de *A. thaliana*, aproximadamente 0,5-1 g de material fresco vegetal se congeló con N₂ líquido, se pulverizó con ayuda de un mortero y se resuspendió en 4 ml de tampón A (Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glicerol 10% (v/v), β-mercaptoetanol 4 mM, DTT 2 mM, EDTA 1 mM y MgCl₂ 10 mM) a 4 °C. Para la inhibición de las proteasas presentes en el extracto, el tampón A se suplementó con una mezcla comercial de inhibidores de proteasas específica para *Arabidopsis* al 0,1% (v/v) (Sigma-Aldrich). Los homogenados se diluyeron hasta 20 ml usando tampón B (Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), glicerol 10% (v/v), DTT 2 mM y EDTA 1mM) y se centrifugaron a 7000 g durante 10 min para eliminar restos de paredes celulares y células enteras. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100000 g (rotor Beckman 60Ti) durante 30 min para sedimentar la fracción total de membranas y se recogió el sobrenadante, que se consideró como extracto crudo soluble. El precipitado, que constituye la fracción de membranas, se homogeneizó en 20 ml de TS y se ultracentrifugó en las mismas condiciones anteriores para eliminar cualquier posible contaminación por pirofosfatasa soluble. Por último se volvió a lavar el precipitado con tampón B y se resuspendió definitivamente en 1 ml de este mismo tampón, guardándose las muestras a -80 °C para su posterior utilización.

2.4 Determinaciones de las actividades enzimáticas

2.4.1 Determinación de la actividad pirofosfatasa

La actividad pirofosfatasa, tanto soluble como de membrana, se determinó espectrofotométricamente midiendo la liberación de fosfato (Upson, Haugland et al. 1996). Para esto último se utilizó el método de Rathbun y Betlach (1969), usando una mezcla de acetato potásico, ácido tricloroacético (TCA) y formaldehído como solución de parada, y cloruro estannoso (SnCl₂; Sigma-Aldrich) como reductor. En disolución ácida y en presencia de molibdato amónico, los ortofosfatos forman un complejo de fosfomolibdato amónico que, al reducirse, presenta una coloración azul que puede ser medida a una longitud

de onda adecuada. El reductor utilizado en nuestros ensayos fue el cloruro de estaño II (Sigma-Aldrich).

Una unidad de actividad pirofosfatasa se define como la cantidad de enzima que es capaz de hidrolizar 1 μmol de PPI en 1 min. La concentración de fosfato se interpoló de una recta de calibrado previamente establecida con ortofosfato sódico.

Para todos los experimentos, las medidas se realizaron por triplicado de forma independiente y los resultados se obtuvieron como la media de todos los datos.

2.4.1.1 Actividad pirofosfatasa soluble

Las medidas de actividad pirofosfatasa soluble (sPPasa) se realizaron en una mezcla de ensayo (ME: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), MgCl_2 2 mM, Na_2PPI 0,3 mM) y una cantidad adecuada del extracto celular en un volumen final de 200 μl . En algunos casos se añadió NaF a 1 mM para inhibir completamente la actividad sPPasa y establecer el nivel de actividad residual de los extractos. Las reacciones enzimáticas se realizaron a 30 °C durante un tiempo suficiente para que se produjera una reacción medible según los niveles de actividad sPPasas de los distintos organismos. La reacción se terminó mediante la adición de 400 μl de agua desionizada y 270 μl de una mezcla compuesta por: TCA al 30% (p/v), acetato sódico 3,5 M y formaldehído al 37% (p/v). El color se desarrollaba mediante la adición sucesiva de 30 μl de molibdato amónico 2% (p/v) y 60 μl de SnCl_2 0,16% (p/v). La absorbancia se midió a 735 nm tras dejar desarrollar el color durante 5 min. En todas las determinaciones se realizaron medidas control en ausencia del correspondiente sustrato y de la preparación enzimática.

Las medidas de actividad pirofosfatasa soluble en el caso de las sPPasas Familia II, como la sPPasa de *Moorella thermoacetica*, se realizaron de la misma manera que se ha descrito anteriormente con la salvedad de que en estos casos la muestra requería una pre-incubación de 30 min a 30 °C con MnCl_2 2

mM o CoCl_2 2mM, previa a la adición del sustrato. Además, en estos casos, la ME contenía MgCl_2 a una concentración de 10 mM.

2.4.1.2 Actividad pirofosfatasa asociada a membrana

Las medidas de actividad pirofosfatasa de membrana (mPPasa) se realizaron utilizando una mezcla de ensayo (ME) y una cantidad adecuada de la preparación de membranas en un volumen final de 200 μl . Las reacciones enzimáticas se realizaron tal y como se describe en el apartado anterior, pero se realizaba un paso de centrifugación a 13000 g durante 5 min en una centrífuga Eppendorf de sobremesa, previo al desarrollo del color azul, en el caso de las preparaciones de membranas de organismos fotosintéticos para eliminar el color de los pigmentos de las membranas.

En todos los casos se añadió NaF a una concentración final de 1 mM para inhibir posibles restos de actividad sPPasa.

En el caso de las determinaciones de actividad mPPasa dependiente de potasio, la ME se suplementó con 100 mM de KCl y se realizaron controles para cada una de las muestras enzimáticas en ausencia de esta sal.

Para determinar el efecto de los niveles sodio en el ensayo sobre la actividad mPPasa, se suplementó la ME con la cantidad apropiada de una solución de NaCl para obtener las concentraciones finales deseadas. Los controles se realizaron añadiendo la misma cantidad de agua desionizada que de solución salina en cada caso.

2.4.2 Determinación de la actividad ATPasa

Para determinar la actividad ATPasa de fracciones de membrana de gradientes, el procedimiento que se siguió fue análogo al de la actividad mPPasa, midiendo el Pi liberado utilizando como reductor cloruro de estaño y ATP como sustrato. Así, Las medidas de la actividad ATPasa se realizaron en una mezcla que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8), MgCl_2 2 mM, ATP 0,2 mM y

una cantidad adecuada de la preparación de membranas en un volumen final de 200 μ l. En el caso de las determinaciones de actividad V-ATPasa, la cual se inhibe específicamente con el antibiótico bafilomicina (LC Laboratorios, USA) (Bowman, Graham et al. 2004), la mezcla de reacción se suplementó con una concentración final de bafilomicina A (BafA) 100 nM y se realizaron controles para cada una de las muestras enzimáticas en ausencia de este antibiótico. Las reacciones enzimáticas se incubaron a 37 °C durante 10 min y, a continuación, la reacción se terminó mediante la adición de 400 μ l de agua y 270 μ l de la mezcla de parada acetato/formaldehído/TCA descrita anteriormente. A continuación, se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf de mesa a 13000 rpm durante 5 min, y los sobrenadantes se trasladaron a tubos limpios. Finalmente, se le añadieron 30 μ l de una disolución ácida de molibdato amónico y 60 μ l de una disolución de SnCl₂. Transcurridos 10 min y desarrollado el color, se midió la absorbancia a 735nm. En todas las determinaciones se realizaron medidas control en ausencia del correspondiente sustrato y de la preparación enzimática.

2.4.3 Ensayos de bombeo de protones a través de membranas

Para realizar los ensayos de bombeos de protones a través de membranas biológicas, las preparaciones de microsomas, obtenidos de la forma que se especifica en el apartado 2.3.1, se resuspendieron en tampón TKE (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), KCl 2 mM, EDTA 1 mM, y los inhibidores de proteasas benzamidina, ácido ϵ -aminocaproico, y PSMF, 1 mM de cada uno) para favorecer la formación de vesículas. El gradiente de pH se ensayó midiendo la disminución de la fluorescencia (“quenching”) producida durante la acumulación de la sonda fluorescente ACMA en el interior de vesículas acidificadas por las H⁺-ATPasas o las H⁺-PPasas. Para ello se utilizó una mezcla de reacción conteniendo: 1 μ L de ACMA, MOPS-Tris 20 mM (pH7,2), 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂ y una cantidad suficiente de las preparaciones de microsomas (mayor a 50 μ g de proteína). El ensayo se inició añadiendo ATP a una concentración final de 1,5 mM para el caso del gradiente producido por ATPasas, o añadiendo PPi a una concentración final de 2 mM en el caso de

gradientes producidos por H^+ -PPasas. Para deshacer el gradiente de pH y recuperar la fluorescencia, se añadió gramicidina D a una concentración final de 3 μ M o el agente desacoplante CCCP a la misma concentración final.

2.5 Determinación de clorofila

El contenido celular de clorofila de los cultivos de microalgas eucarióticas y cianobacterias se determinó espectrofotométricamente en extractos celulares obtenidos con metanol, según una modificación del protocolo descrito por Mackinney (Mackinney 1941). Un ml de suspensión celular se centrifugó durante 5 min a 11000 g en una centrífuga Eppendorf de sobremesa y el sedimento se resuspendió en 1 ml de metanol absoluto. Tras agitar vigorosamente durante 1 min con la ayuda de un agitador automático, la preparación se volvía a centrifugar en las condiciones anteriores, 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 $13,43 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.6 Análisis de proteínas

2.6.1 Determinación de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas de las muestras se siguió el método de Bradford (Bradford 1976). Para ello, las muestras se suplementaron con agua desionizada hasta un volumen de 0,2 ml y se les añadió 1 ml de reactivo de determinación de proteínas (BioRad) diluido 1:5 con agua desionizada, incubándose las mezclas durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia de las mismas a 595 nm. Para la confección de la recta patrón, se utilizaron cantidades conocidas de ovoalbúmina.

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 suplementaron con 0,2 volúmenes de tampón de carga 5x (TC5x: Tris-HCL 0,3 M (pH 6,8), glicerol 50%, SDS 10%, β -mercaptoetanol 25% y azul de bromofenol 0,05%). Las muestras, una vez suplementadas con TC5x, se calentaron a 65-100 °C durante 5 min en el caso de proteínas solubles y no se calentaron en el caso de proteínas de membrana.

En caso de que fuese necesario concentrar las muestras, la cantidad deseada de proteínas se precipitó con TCA al 10% (p/v) de concentración final, manteniéndose en hielo durante 10 min antes de centrifugar en una centrífuga Eppendorf de sobremesa a 13000 rpm durante 5 min. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se lavaron dos veces con 1 ml de acetona en el caso de proteínas de membrana o de etanol:éter (1:1) en el caso de proteínas solubles, incubándose en hielo y centrifugando del mismo modo. Tras secar el precipitado unos segundos al aire, se resuspendió en TC5x.

2.6.2.2 Desarrollo de la electroforesis en gel mediante el método de Laemmli

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizaron en geles de poliacrilamida que contenían SDS, según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli 1970). El gel separador se preparó al 8, 10 o 12% (p/v) de poliacrilamida, a partir de un disolución acrilamida:bisacrilamida 38:2. Los demás componentes utilizados fueron: SDS 0,1% (p/v), tricloroetanol 0,1% (p/v) y Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8). El gel de empaquetamiento de las muestras se preparó al 4% (p/v) de poliacrilamida con la misma composición que la usada para el gel separador, con SDS al 0,1% (p/v) y Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8). Los geles se polimerizaron con APS 0,1% (p/v), usando como agente catalizador TEMED a una concentración final de 6 mM.

La electroforesis se llevó a cabo a 100V, voltaje constante. Para el desarrollo de la electroforesis, se usaron aparatos Mini-Protean II y Mini-Protean III (Bio-Rad). Como tampón de electrodos se utilizó Tris-HCL 25 mM, glicina 0,32 M (pH 8,3) y SDS 0,1% (p/v).

2.6.2.3 Teñido de geles de poliacrilamida

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se tiñeron sumergiendo los geles durante 30 min en una disolución de azul de Coomasie “Brilliant Blue R” (Sigma-Aldrich) a 0,1% (p/v) en una mezcla 5:4:1 de agua:etanol:ácido acético (v/v/v). Los geles se lavaron a continuación con esta mezcla para retirar el exceso de colorante. Para su posterior mantenimiento, se secaron los geles entre dos láminas de celofán durante 24h.

Para determinar la movilidad electroforética relativa de las proteínas en estudio, se usaron patrones de proteínas preteñidos See Blue[®] Pre-Stained Standars (Novex) y Pre-Stained SDS-PAGE Estándar Broad Range (BioRad) con rangos útiles de entre 20 y 150 kDa. Antes de ser cargados en los geles de poliacrilamida, los patrones de Novex se hirvieron a 100 °C durante 3-5 min. Los patrones de BioRad se mantuvieron a -20 °C y se descongelaron inmediatamente antes de cargarlos en el gel, sin realizar ningún tratamiento previo.

2.6.3 Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

La transferencia a membranas de nitrocelulosa se realizó utilizando un aparato de transferencia semi-seca “Trans blot SD” de la marca BioRad y el sistema de tampón Towbin (Towbin, Staehelin et al. 1979). Tras la electroforesis de las muestras de proteína, el gel de poliacrilamida se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de diámetro de poro previamente humedecida con tampón de transferencia (TT: 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 colocó una pila de tres papeles MM Chr (Whatman)

humedecidos en el mismo TT.

La transferencia se llevó a cabo sometiendo el “sándwich” a un voltaje constante de 25 V durante 45 min. Para comprobar la efectividad de la transferencia, las proteínas transferidas fueron teñidas en el filtro de nitrocelulosa con una disolución de colorante rojo Ponceau S al 0,2% (p/v) disuelto en una disolución de TCA al 3% (p/v), tras lo cual se lavó con abundante agua.

2.6.4 Inmunodetección por Western blot

La membrana con las proteínas adsorbidas se incubó durante una hora en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM), suplementado con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) como bloqueante y Timerosal (Sigma-Aldrich) al 0,02% (p/v) como preservante. A continuación, se añadió el antisuero conteniendo el anticuerpo primario en una dilución apropiada (1:1000 a 1:10000) y se incubó con agitación suave a 4 °C toda la noche. Tras esta primera incubación, la membrana se lavó tres veces durante 10 min con TBS suplementado al 0,1% (v/v) de Tween-20 y una última vez durante el mismo tiempo con la misma disolución de leche en polvo en TBS suplementado con 0,1% (v/v) de Tween-20. A continuación se incubó durante al menos una hora con una dilución 1:10000 de anticuerpo secundario (antisuero de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano -ROCHE-) en TBS. Tras la segunda incubación, la membrana se lavó tres veces durante 10 min con TBS suplementado con 0,1% de Tween-20.

La visualización específica de las proteínas sobre la membrana se realizó mediante quimioluminiscencia. Para ello, tras el último lavado, se añadió de forma uniforme sobre toda la membrana una solución “Millipore ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate”, siguiendo las instrucciones del fabricante (Millipore, Menlo Park, EE.UU.). A continuación, se captó la señal bien mediante un transiluminador marca Gel DocTM X.R. (BioRad) conectado a un ordenador personal con el software Quantity One (BioRad) o bien mediante película fotográfica. En este último caso se utilizaron películas fotográficas

KONICA que se expusieron a la membrana entre 30 segundos y 10 min antes de sumergirlas en una dilución 1/10 de solución reveladora (AGFA) hasta que aparecían las bandas. A continuación se sumergió la película en un recipiente con agua para pasarla luego a un recipiente con una dilución 1/10 de solución fijadora (AGFA). Todos los pasos, hasta que se sumergía la película en solución fijadora, se llevaron a cabo en oscuridad con la única iluminación de una luz inactiva.

2.7 Métodos genéticos de manipulación del ADN

2.7.1 Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en el presente trabajo se encuentran detallados en la Tabla II:

Tabla III: Plásmidos utilizados

Plásmido	Características	Ref./Casa comercial
pRS1024	Vector multicopia de expresión de levadura que contiene el promotor y el terminador constitutivos del gen <i>PMA1</i> y como marcador de selección el gen <i>LEU2</i>	(Villalba, Palmgren et al. 1992)
pRS699	Vector multicopia de expresión de levadura que contiene el promotor y el terminador constitutivos del gen <i>PMA1</i> y como marcador de selección el gen <i>URA3</i>	(Serrano and Villalba 1995)
pUG35	Vector de expresión en levadura que contiene el promotor MET25 y el terminador CYC-1, permite la fusión en el extremo C-terminal de yEGFP3 y tiene como marcador de selección el gen <i>URA3</i>	(Cormack, Bertram et al. 1997)
pUG36	Vector de expresión en levadura que contiene el promotor MET25 y el terminador CYC-1, permite la fusión en el extremo N-terminal de yEGFP3 y tiene como marcador de selección el gen <i>URA3</i>	(Cormack, Bertram et al. 1997)
pMBL1-T	Vector (Ap ^r) para clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	Dominion mbl
pBluescript II SK	Vector para clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	Stratagene

Materiales y Métodos

pSpark®	Vector para clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	Canvax
pYES2.0	Vector multicopia de expresión en levadura que contiene el promotor GAL1, el terminador CYC-1 y como marcador de selección el gen <i>URA3</i>	Thermo-Fisher
p426GPD	Vector multicopia de expresión en levadura que contiene el promotor GPD, el terminador CYC-1 y como marcador de selección el gen <i>URA3</i>	(Mumberg, Müller et al. 1995)
p416GPD	Vector centromérico de expresión en levadura que contiene el promotor GPD, el terminador CYC-1 y como marcador de selección el gen <i>URA3</i>	(Mumberg, Müller et al. 1995)
p415Met25	Vector centromérico de expresión en levadura que contiene el promotor MET25, el terminador CYC-1 y como marcador de selección el gen <i>LEU2</i>	(Mumberg, Müller et al. 1995)
pMS539	Vector (<i>ARG7</i>) que permite clonar miRNAs de <i>Chlamydomonas</i> bajo el promotor de la nitrato reductasa (derivado de pChlamyRNA2)	(Schmollinger, Strenkert et al. 2010)
pKW 118	Vector que contiene una plataforma integrativa de <i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	(Wilson, Sessitsch et al. 1995)
pRL 171	Vector que contiene el casete de resistencia a cloramfenicol CC1 clonado en polilinker LHEH1 cortado con <i>EcoRI</i> . Ap ^r Cm ^r	(Elhai and Wolk 1988)
pRL 161	Vector que contiene el casete de resistencia a kanamicina CK1 clonado en polilinker LHEH1 cortado con <i>BamHI</i> . Ap ^r Km ^r	(Elhai and Wolk 1988)
pBSCr	Vector de expresión en <i>C. reinhardtii</i> con promotor constitutivo Hsp70A/RbcS2	(Lucas-Reina, Romero-Campero et al. 2015)
pNIA2	Vector de expresión en <i>C. reinhardtii</i> con promotor Nit1 inducible por nitrato	(Lucas-Reina, Romero-Campero et al. 2015)
pEarlyGate 100	Vector de expresión en plantas, compatible con el sistema Gateway, sin Tag	(Earley, Haag et al. 2006)
pEarlyGate 101	Vector de expresión en plantas, compatible con el sistema Gateway, con Tag de HA y YFP en el C-terminal	(Earley, Haag et al. 2006)
pEarlyGate 104	Vector de expresión en plantas, compatible con el sistema Gateway, con Tag de YFP en el N-terminal	(Earley, Haag et al. 2006)

2.7.2 Métodos de transgénesis

En la mayor parte del trabajo realizado, las células competentes de *E. coli* se obtuvieron directamente del Servicio de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Universidad de Sevilla-CSIC).

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

Las células de *E. coli* se cultivaron 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 recogió por centrifugación a 3500 g durante 5 min a 4 °C y se resuspendió 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.

2.7.2.2 Transformación de células de *E. coli* por electroporación

Para la transformación, 100 µl de células competentes previamente descongeladas se mezclaron con el DNA deseado en un volumen de 1 µl y se mantuvieron en hielo 1 min, tras lo cual se transfirieron a cubetas de electroporación de 1 cm (BIO-RAD), previamente enfriadas en hielo al menos durante 1 min, y se sometieron a la acción de un pulso eléctrico de 2500 V. Inmediatamente, se añadió 1 ml de LB y se transfirió 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 extendieron sobre medio sólido LB con antibiótico y se dejaron secar.

2.7.2.3 Transformación de células de *E. coli* por choque térmico

La transformación de células competentes por choque térmico se realizó añadiendo a la suspensión celular, previamente descongelada, el DNA en un volumen máximo de 10 μ l. Tras 15 min de incubación en hielo, se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 2 min, se incubó en hielo durante 2 min más y se le añadió entre 400 μ l y 1 ml de medio LB, incubando entre 30 min y 1 h a 37 °C. Finalmente, las células se centrifugaron en una centrífuga Eppendorf de sobremesa a 8000 rpm durante 30 s y, tras eliminar la mayor parte del sobrenadante, se sembraron en placas de medio LB con el antibiótico deseado.

2.7.2.4 Transformación de *S. cerevisiae*

Las levaduras se transformaron usando el protocolo TRAF0 de alta eficiencia del método del acetato de litio (LiAc) (Gietz and Woods 2002). Cultivos de 10 ml de la estirpe de levadura deseada se crecieron a 30 °C y con una agitación de 150 rpm en matraces de 50 ml de medio mínimo, con la fuente de carbono adecuada, durante toda la noche hasta saturación. A la mañana siguiente, se diluyeron los cultivos hasta una O.D.₆₀₀ de 0,2 en un volumen de 10 ml de medio complejo, con la fuente de carbono adecuada. Estos cultivos se dejaron crecer, bajo las mismas condiciones anteriores, durante unas 5-6 horas hasta que alcanzaron una O.D.₆₀₀ de aproximadamente 1. Entonces se centrifugaron a 3000 g durante 10 min y se lavaron una vez con agua.

Para la transformación, 5 μ g de DNA se mezclaron con el precipitado celular y se le añadieron 240 μ l de polietilenglicol (PEG) 50% (p/v), 36 μ l de acetato de litio 1M, 5 μ l de DNA de esperma de salmón 1% (p/v) y agua estéril hasta un volumen final de 360 μ l. Tras una agitación vigorosa de 30 s, las mezclas se incubaron en un baño termostatzado a 42 °C durante 40 min. Tras esto, las células se sedimentaron por centrifugación durante 30 s a 13000 rpm y se descartaron los sobrenadantes. Los precipitados celulares se resuspendieron en 150 μ l de agua estéril y se extendieron en placas de medio selectivo de levadura con galactosa como fuente de carbono.

2.7.2.5 Transformación de *Synechocystis* sp. PCC6803

La transformación de *Synechocystis* con DNA plasmídico se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Chauvat (Chauvat, Vries et al. 1986). Las células se cultivaron hasta una O.D.₅₈₀ de 1-1,5. A continuación se recogieron 40 ml de cultivo por centrifugación a temperatura ambiente y las células se lavaron dos veces con medio fresco para eliminar las posibles nucleasas extracelulares. Tras los lavados, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo y se distribuyeron en alícuotas de 200 µl en tubos de poliestireno-cristal de 10 ml (Soria Greiner S.A., España). A las alícuotas se le añadieron entre 1 y 3 µg del DNA a transformar, resuspendido en tampón TE (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA-Na 1mM). La mezcla se incubó en agitación e iluminación durante 1,5 h y, posteriormente, se sembró en cajas de medio BG11 sin antibióticos, sobre filtros Nucleopore 85 MM (Whatman, EE.UU).

Tras un periodo de incubación de al menos 18 h en condiciones normales de cultivo, para permitir la expresión de la resistencia conferida por el DNA exógeno, los filtros se pasaron a cajas de medio BG11 que contenían el antibiótico pertinente. Las colonias transformantes resistentes aparecieron tras 10-15 días de incubación y se debieron a la introducción del DNA exógeno en el DNA cromosómico de *Synechocystis*, ya que los plásmidos introducidos no contenían origen de replicación para *Synechocystis*. En rondas posteriores de réplicas para forzar la segregación de las copias cromosómicas mutantes, se aumentó la concentración de los antibióticos hasta 80 µg/ml para cloramfenicol y 500 µg/ml para kanamicina.

2.7.2.6 Transformación de *Chlamydomonas reinhardtii*

Las transformaciones de *C. reinhardtii* se llevaron a cabo usando una modificación del protocolo de Kindle (Kindle 1990). Las células del mutante deficiente en pared celular y auxótrofo para arginina CW15-325 se cultivaron en 300-500 ml de medio TAP suplementado con amonio en matraces de Erlenmeyer de 1 l, en cámaras termostatazadas a 25 °C y luz blanca continua de intensidad luminosa $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, hasta alcanzar la fase estacionaria (5-6

días). Los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 min y se resuspendieron en medio mineral mínimo Sueoka con amonio, concentrándolos 100 veces. En tubos de cultivo de 10 ml, se preparó una mezcla con 500 µl de perlas de vidrio (0,4-0,6 mm; Braun Biotech International, Alemania), 100 µl de PEG-8000 20% (p/v) y 900 µl de los cultivos concentrados de *C. reinhardtii*, a la que se añadieron 500 ng del plásmido linearizado cuya inserción en el genoma deseaba obtenerse. Esta mezcla se agitó vigorosamente con ayuda de un agitador automático durante 8 s y se diluyó añadiendo 5 ml de medio mínimo sin amonio, centrifugando y descartando el sobrenadante. A continuación, las células se resuspendieron en otros 5 ml de medio mínimo sin amonio y se dejaron decantar las perlas de vidrio. Las suspensiones celulares se transfirieron entonces a tubos Falcon con 50 ml de medio mínimo y se incubaron en luz continua durante al menos 5-6 h para permitir la expresión del gen de autotrofia para arginina. Finalmente, los cultivos se concentraron por centrifugación hasta 0,5 ml y se extendieron en placas de medio sólido TAP amonio sin suplementación de arginina. Las placas se desarrollaron en condiciones normales hasta que se observó el crecimiento de colonias.

2.7.3 Aislamiento del DNA

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

Para la purificación de plásmidos de *E. coli* se utilizaron dos métodos: uno rutinario, basado en la lisis alcalina, y otro comercial, en el que se utilizó el juego de reactivos “Spin Clean™ Plasmid Miniprep” (MBiotech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este último método se empleó cuando se requerían preparaciones plasmídicas con un alto grado de pureza, como por ejemplo para la secuenciación automática del DNA.

La purificación de plásmidos por lisis alcalina se realizó habitualmente siguiendo los métodos descritos por Sambrook (Sambrook, Fritsch et al. 1989). De forma resumida, los cultivos de células desarrollados durante toda la noche a 37 °C en agitación, se recogieron por centrifugación a 8000 g durante 2 min en tubos Eppendorf de 1,5 ml y los precipitados celulares se resuspendieron en

100 µl de solución I (Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM (pH 8,0)). A continuación, se le añadieron 200 µl de solución II (NaOH 0,2 M, SDS 1% (p/v)) y se mezclaron las muestras invirtiendo los tubos suavemente hasta 10 veces. Para la neutralización, se añadieron 150 µl de solución III (acetato potásico 5 M (pH 4,8)) y se volvieron a mezclar los tubos invirtiéndolos suavemente hasta 10 veces. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 13000 g, tras lo que se retiraron los sobrenadantes a tubos limpios. Sobre estos sobrenadantes, se añadió 1 ml de etanol 100% (v/v) muy frío para precipitar el DNA, se dejó incubar en hielo durante 10 min y se centrifugó durante 10 min a 13000 g. Se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados en 1 ml de etanol 70% (v/v), se centrifugaron otra vez a 13000 g durante 10 min y los precipitados se secaron al aire unos minutos antes de resuspenderlos finalmente en 30 µl de agua desionizada suplementada con 0,05% (p/v) de RNAsa A (Sigma-Aldrich).

La degradación del RNA se realizó incubando estas muestras durante 10 min en un baño termostático a 65 °C.

2.7.3.2 Aislamiento del DNA genómico de levadura

Para el aislamiento del DNA genómico de levadura se utilizó el protocolo descrito por Hoffman y Winston (Hoffman and Winston 1987). Las células se crecieron durante toda la noche en un volumen de 10 ml de medio hasta saturación. Se recogieron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 5 min en tubos de 1,5 ml y se lavaron con agua dos veces. Tras esto, se descartó el sobrenadante y el precipitado resultante se resuspendió en 200 µl de mezcla de Hoffman (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), Tritón-X100 2% (p/v), SDS 1% (p/v), NaCl 100 mM y EDTA 1 mM). Para la rotura celular se añadieron 100 µl de perlas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) y se agitaron dos veces en periodos de 1 min alternados con 1 min en hielo con ayuda de un agitador automático. A continuación, se realizó una extracción añadiendo 200 µl de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y agitando nuevamente dos veces. Para precipitar el DNA, se centrifugó el homogenado a 12000 g durante 10 min y se recuperó la fase acuosa, a la que se incorporaron 1/17 volúmenes de

NaCl 5M y 500 µl de isopropanol. Tras centrifugar nuevamente y eliminar el sobrenadante, se secó el precipitado al aire durante unos minutos y se resuspendió el DNA en 20 µl de agua desionizada suplementada con 0,05% (v/v) de RNasa A (Sigma-Aldrich).

La degradación del RNA se realizó incubando estas muestras durante 10 min en un baño termostático a 65 °C.

2.7.3.3 Aislamiento del DNA genómico de *Synechocystis*

El aislamiento de DNA total de cianobacterias se llevó a cabo según el método descrito por Cai y Wolk (1990), basado en la rotura de las células con perlas de vidrio. Se recogieron células procedentes de 50 ml de cultivo en medio BG11 por centrifugación a 4 °C 3000 rpm durante 7 min y se resuspendían en 400 µl de TE. A la suspensión celular se le añadían 150 µl de perlas de vidrio (0,2 mm de diámetro, Sigma), 20 µl de SDS 10% (p/v) y 450 µl mezcla PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v)). A continuación, la suspensión se sometió a 10 periodos de 1 min en agitación vigorosa con ayuda de un agitador automático, seguido de 1 min a 0 °C. El lisado se centrifugaba a 12.000 g durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se sometía a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). El DNA se precipitaron finalmente con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y acetato sódico 0,3 M. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50 µl de TE y el RNA presente en la solución se eliminó mediante un tratamiento con RNasa (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 20 µg/ml.

2.7.3.4 Aislamiento de DNA genómico de microalgas eucarióticas

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

Las células de microalgas, alrededor de 1 g de peso fresco, se congelaron con nitrógeno líquido y se rompieron por trituración en mortero hasta obtener

un polvo muy fino. A continuación se vertieron sobre 5 ml de tampón CTAB (Tris-HCl 20 mM (pH 8,8), NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% (p/v)) precalentado a 65 °C al que se le añadían 50 µl de β-mercaptoetanol. La mezcla se incubó 15-30 min en un baño termostatzado 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 centrífuga de rotor basculante (Heraeus, Alemania), el sobrenadante se precipitó con 2/3 volúmenes de isopropanol, se incubó unos minutos a temperatura ambiente y se volvió a centrifugar, retirando el sobrenadante. Finalmente, el precipitado se lavó 20-30 min con etanol 70% (v/v) y acetato amónico 10 mM, de manera que se eliminó la mayor parte del CTAB, se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min y el precipitado se dejó secar unos minutos al aire. Este precipitado seco se resuspendió en 500 µl de agua desionizada suplementada con 0,05% (p/v) de RNAsa A (Sigma-Aldrich).

La degradación del RNA se realizó incubando estas muestras durante 10 min en un baño termostatzado a 65 °C.

2.8 Análisis del DNA

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

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un aparato MiniCyclerTM (MJ Research, EE.UU.). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl que contenía tampón comercial de la enzima (1x), 0,25 mM de cada desoxirribonucleótido (dNTPs), 20 pmol de cada oligonucleótido, 0,1-1 µg de DNA y 1 U de Taq polimerasa.

Esta mezcla, una vez desnaturalizado el DNA (94 °C, 5 min), se sometió a 29-35 ciclos sucesivos con los siguientes pasos:

- Desnaturalización del DNA molde (94 °C, 30-60 s).
- Reasociación de los cebadores (50-65 °C, 60 s).
- Polimerización (72 °C 10-20 min)

Por último se realizó una elongación final a 72 °C durante 10-20 min.

Los resultados de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de agarosa.

Para la amplificación de fragmentos de DNA que posteriormente serían utilizados para la incorporación a vectores de expresión, se utilizó la polimerasa de alta fidelidad iProofTM (BioRad), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

2.8.1.1 Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo

En la Tabla III se presentan los oligonucleótidos utilizados en reacciones de PCR durante este trabajo:

Tabla IV: Oligonucleótidos utilizados

Oligonucleótido	Secuencia
IPP1_BamHI_FW	CCCGGATCCATGACCTACACTACCA G
IPP1_SalI_RW	CCCGTCGACTTAAACAGAACCGGAG
GFP-NLS_RW	ATTCTCGAGCTATTTAACAACGACCTTTCTCTCTTTTT GGTTTGTACAATTCATCCATACCATG
IPP1_NES_RW	ATTGTCGACCAAGGTCAATCTCTCCAAGGAGGCAATTG CAAAACAGAACCGGAGATGAAG
SMPPA_BamHI_FW	CCCGGATCCATGTCTAAAATTTTAGTTTTG
SMPPA_SalI_RW	CCCGTCGACTTACCCATTA AAAACTTTC
pIPP1_SacI_FW_0,9Kb	CCCGAGCTCCATCCAATCTAATGGAATGC
pIPP1_SacI_FW_1,8Kb	CCCGAGCTCAAGCTTTGTTGATAAAGGCTATAATAGG
pIPP1_SacI_FW_0,4Kb	CCCTAATATCATGATTTAGC
pIPP1_BamHI_RW	CCCGGATCCTAGTAAATTGCGCGGCGGG
pIPP1S_BamHI_RW	CCCGGATCCGTCATCATGA GACTATCGTAT
MUTNLS_IPP1_FW	GACACCGCGGCGGGCAAG
MUTNLS_IPP1_RW	TTGGATGATTGGGTTCAA
MUTKNLS_FW	GGCGGTTGAGATTTGTTAGAACTGTTTC
MUTKNLS_RvW	CGCCGCGGTGTCTTGATG
pMET25_300_FW	GCTCTCTTGCTTTTCATCTAC
SynZHI1_KpnI_FW	GTAGGTACCTCCTGGGCTTCGGCTATGGTGGCG
SynZHI2_SacII_RW	GTACCGCGGGGATCCATCAAAAAGGCTTCCCGACTGT A
MmPPA_Syn_SalI_FW	CCCGTCGACATGGATATGTTAATCTACCTTAC
MmPPA_Syn_SpeI_RW	CCCACTAGTTCAAATAAACAGCGGTGCAAAC
SYNT_XbaI	GTATCTAGAGGGAATTCGCGGTATGGATGGCACCGATGC G

SYNT_SpeI	GTA ACTAGTGGATCCATCAAAAAAGGCTTCCCGCCGACT GTAG
SYNT_SalI	GTAGTCGACTCCTGGGCTTCGGCTATGGTGGCG
SYNT_KpnI	GTAGGTACCATTCCTATATAACCATCAAAGCC
SYNT_SacII	GTACCGCGGGGATCCATCAAAAAAGGCTTCCCGACTGT A
SYNT_EcoRI	GTAGAATTCAATCCCATATAACCATCAAAGCC
PPA1Syn_KpnI_FW	CCCGGTACCTTGGGCACTGTTAGGGCAG
PPA1Syn_SacII_RW	CCCCCGCGGTGGTCAACCAAGCAATGGC
CC1_BstXI_FW	CCCCCAACAATGTGGTTGACGGGACGGCGGCTTTG
CC1_XmnI_RW	CCCGAACATCTTCGTCGACGGATCCAAGTTCCCGGTA AGGCCATTGTGA
PPA1Syn5'_ApaI_RW	CCCGGGCCCAAGGTGTTGGGGATAAAACC
PPA1Syn3'_XbaI_FW	CCCTCTAGACAAAGATCCCCGCTACACC
NHAS3Syn5'_KpnI_FW	CCCGGTACCCTAATCTGGGGTGGGAACTG
NHAS3Syn5'_ApaI_RW	CCCGGGCCCCAAATTTTGCCTCTGGCAGAC
NHAS3Syn3'_XbaI_FW	CCCTCTAGACAAGCTACCCACCACCGCC
NHAS3Syn3'_SacII_RW	CCCGATGGGATCCGCGGATTTATC
GFP_SalI_FW	CCCGTCGACATGTCTAAAGGTGAAGAATTATTC
GFP_SalI_RW	CCCGTCGACTTCTTTGTACAATTCAATCCATACC
GFP_3xNLS_SpeI_RW	CCCACTAGTTTATACCTTTCTCTTCTTTTTTGGATCTACC TTTCTCTTCTTTTTTGGATCTACCTTTCTCTTCTTTTTTGG ATCTTTGTACAATTCAATCCATACCATG
IPP1ΔNLS_SpeI_RW	CCCACTAGTGTCTTGGATGATTGGGTTC
IPP1ΔNLS_SpeI_FW	CCCACTAGTAGATTTGTTAGAACTGTT
GFP_XhoI_RW	GCCCTCGAGTTATTTGTACAATTCAATCCATACCATG
PyrNaPP_XhoI_FW	GCCCTCGAGATGGCGAATCCAGAGGCC
PyrNaPP_PEP_XhoI_FW	GCCCTCGAGGTCCGCGACTCGGCC
PyrNaPP_XbaI_RW	GCCTCTAGATCAAGCCGCGCCTCCTC
Ipp1_6xHIS_BamHI_FW	GCCGGATCCATGCACCAACCACCAACA GATCTACC TACACTACCAGACAAA
MUTpIpp1_FW	TACA ACTTGT TTTTGA ATAC
MUTpIpp1_RW	TACA ACTTGT TTTTGA ATAC
MTPPA_FW	CCCAAGCTTATGGGTAAAGAGATTCTGGTTATC
MTPPA_RW	CCCGTCGACTTATCCCTGCAGCCAACCGGCC
MTPPA_FW2	CCCACTAGTATGGGTAAAGAGATTCTGGTTATC
MTPPA_RW2	CCCAAGCTTGAACGTCGTTACCAAGGGAG
MTPPA_FW3	CCCAAGCTTATGCGAGGAAAAAGGGTAATCC
MTPPA_RW3	CCCGTCGACGTATCCCTGCAGCAACCGCC
CBS_BamHI_FW	CCCGGATCCATGCTGGTAAACGACGTTCCG
CBS_HindIII_RW	CCCAAGCTTGACCAAGGATTACCCTTTTTC
IPP1_HindIII_FW	CCCAAGCTTACCTACACTTACCAGACAAATTG
IPP1_HindIII_RW	CCCAAGCTTAACAGAACCGGAGATGAAG

CBS_HindIII_FW	CCCAAGCTTCTGGTAAACGACGTTTCGC
CBS_SalI_RW	CCCGTCGACTTAGACCA GGATTACCCTTTTTC
AVP1_Syn_SalI_FW	GTCGACAAGATGGTGGCGCCTGCTTTG
AVP1_Syn_SpeI_RW	TCTAGATTAGAAGTACTTGAAAAG
CAPP_Syn_SalI_FW	GTCGACATCATGCAGGATCTGAATGCC
CAPP_Syn_SpeI_RW	ACTAGTTTAATCAGCCGAAGCCGGTGC
TCPP_Syn_SalI_FW	ATTGTCGACATTATGGGTGACATGAAGA GA
TCPP_Syn_SpeI_RW	ATTACTAGTTCACTCAATGTACCGCATG
HPPA_miRNA_FW	CTAGTGTGGTAGTAGGCCGATGGTTGATCTCGCTGATCG GCACCATGGGGGTGGTGGTGCATCAGCGCTATCAATTATC GGCTACTACTACCAG
HPPA_miRNA_RW	CTAGCGTGGTAGTAGCCGATAATTGATAGCGCCTGATCA CCAACCCCATGGTGCCGATCAGCGA GATCAACCATC GGCTACTACCACA

2.8.2 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa, según describieron Sambrook y *col.* (Sambrook, Fritsch et al. 1989). Los geles se prepararon en tampón TBE (Tris- H_3BO_3 90 mM (pH 8,0) y EDTA 2 mM). La concentración de agarosa (p/v) en los geles fue variable 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 suplementaron con tampón de carga de DNA (glicerol 7,2% (v/v), EDTA 20 mM (pH 8,0), azul de bromofenol 0,08% (p/v) y xileno-cianol FF 0,08% (p/v)). Como patrones de peso molecular se utilizaron los fragmentos obtenidos tras digerir completamente el DNA del fago lambda con las enzimas de restricción *HindIII* y *EcoRI* (TAKARA). Las modelos, dependiendo del tamaño del gel requerido, aplicando diferencias de potencial entre 80 y 120 V. Para la detección del DNA en los geles y su visualización, éstos se suplementaron con bromuro de etidio (1 μ g/ml). La visualización de los geles y el almacenamiento de las imágenes se llevó a cabo con un transiluminador de luz ultravioleta modelo Gel DocTM X.R. (BIORAD) o modelo Gel DocTM EZ Imager (BIORAD) conectados a un ordenador personal que permitía realizar fotografías gracias a una cámara CCD acoplada al aparato.

2.8.3 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Por lo general, los fragmentos de DNA separados por electroforesis en geles de agarosa, tal como se describe en el apartado anterior, fueron purificados usando un kit de purificación comercial de DNA desde geles de agarosa “Mini Elute™ Gel Extraction Kit” (Quiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

En algunos casos, la purificación se realizó mediante congelación a -20 °C del trozo de agarosa correspondiente a una jeringa de 1 ml y posterior extracción por presión de la fase líquida. Esta fase se sometió a una extracción posterior utilizando PCI, tras lo cual el DNA se precipitó con 1/17 volúmenes de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, y se incubó a -20 °C durante al menos 20 min. El precipitado obtenido tras centrifugar a 13000 g durante 5 min, se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en 8-10 µl de agua desionizada, previa retirada del sobrenadante y secado al aire del precipitado.

2.8.4 Determinación de la concentración y pureza del DNA

La concentración de las disoluciones de DNA se estimó sometiendo alícuotas de las mismas a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio, tal como se indica en el apartado 2.8.2. Una vez terminada la electroforesis, se comparó la intensidad de la banda obtenida con la de los patrones de DNA del fago lambda que se resolvían simultáneamente en el mismo gel y de los cuales se cargaron cantidades conocidas.

Para la estimación de la pureza de las preparaciones de DNA genómico, se diluyó 1 µl de las mismas hasta 0,5 ml con agua desionizada y se midió 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 estimó usando el coeficiente de extinción $E_{560} = 0,2 \text{ (mg/ml)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Como criterio de pureza se utilizó la relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}), que para una preparación de alta pureza se debería encontrar entre 1,8 y 1,9.

2.8.5 Restricción del DNA

Las endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por las marcas comerciales Takara y FastDigest (Thermo-Fisher). Las reacciones se llevaron a cabo, en su mayor parte, en un volumen de 20 µl, según las recomendaciones del fabricante y en el tampón suministrado con cada enzima. Las digestiones simultáneas con dos o más enzimas de restricción se realizaban en un tampón compatible de las mismas casas comerciales o en tampón OPA (One-Phor-All) compuesto por: Tris-CH₃COOH 10 mM (pH 7,5), acetato de magnesio 100 mM y acetato de potasio 500 mM. En caso de que las enzimas no fuesen compatibles en ninguno de los sistemas de tampones, la restricción se llevó a cabo de forma sucesiva en tampón OPA, usando primero la enzima que requería una concentración mayor de este tampón. A continuación, la enzima se inactivó a 80 °C durante 15-20 min y la muestra se diluyó hasta la concentración de tampón adecuada para la segunda enzima. En caso de que la primera enzima no pudiese inactivarse por calor, la restricción se llevó hasta un volumen de 50 µl con agua desionizada y se extrajo el DNA con 50 µl de PCI. La fase acuosa se precipitó con 1/17 volúmenes de acetato sódico 5 M (pH 5,3) y 2 volúmenes de etanol absoluto y el precipitado se resuspendió en el tampón adecuado para la segunda enzima.

Las restricciones de DNA plasmídico 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 DNA para posterior subclonado).

2.8.6 Desfosforilación de extremos de DNA

Para realizar ligaciones de fragmentos de DNA con extremos compatibles fue conveniente desfosforilar los extremos del plásmido sobre el que iba a realizarse la ligación para evitar la religación y aumentar así la eficiencia de la misma. Para ello, se obtuvo una preparación del plásmido según el protocolo descrito en el apartado 2.7.3.1, con la salvedad de que, en el paso final, el DNA se resuspendió en agua desionizada sin RNAsa A. Una fracción

de 1 µg del plásmido así obtenido se sometió a restricción con las enzimas deseadas en un volumen final de 20 µl, incubando al menos 4-6 h. una vez que la digestión estuvo completa, a esta mezcla de reacción se le añadió 1 U de fosfatasa alcalina (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Amersham Pharmacia Biotech), 6 µl de tampón comercial (10x) y agua desionizada hasta un volumen final de 60 µl. Tras incubar 30 min a 37 °C, se añadió 1 U adicional de la enzima y se repitió la incubación. A continuación, la mezcla de reacción se suplementó con 2 µl de EDTA 0,5 M (pH 8,0), 1 µl de RNAsa A 1% (p/v) y 6 µl de tampón de carga de DNA, y se calentó a 75 °C durante 15 min para inactivar las enzimas. El vector desfosforilado se sometió finalmente a electroforesis en un gel de agarosa y la banda de ADN correspondiente se purificó según se describe en el apartado 2.8.3.

2.8.7 Formación de extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes

Para obtener extremos romos a partir de extremos 3' protuberantes, las muestras de DNA se trataron con T4 DNA polimerasa (Takara). Tras la restricción de 1 µg de DNA en un volumen final de 20 µl, ésta se comprobó mediante electroforesis de una fracción de 2 µl de la misma y en un volumen final de carga de 10 µl. Cuando la digestión estuvo completada, en el mismo tubo se añadieron 1 µl de disolución 25 mM de dNTPs y 2 µl unidades de polimerasa y se incubó la mezcla a 14 °C durante 30 min en un baño termostático. Si se iba a proceder a una segunda restricción del DNA, se añadieron 80 µl de agua desionizada y 100 µl de PCI para inactivar la enzima, se agitó la muestra con ayuda de un agitador automático y se centrifugó. El sobrenadante acuoso se precipitó con 1/17 volúmenes de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Si no era necesaria una restricción posterior, las muestras tratadas con T4 DNA polimerasa se cargaron en un gel de agarosa y se sometieron a electroforesis para aislar el fragmento deseado.

2.8.8 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 de ellos, consistió en un tratamiento del DNA con T4 DNA polimerasa análogo al descrito en el apartado anterior. El segundo de ellos consistió en el tratamiento de las muestras con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Promega). Al igual que en el caso anterior, la reacción de restricción, en 20 µl de volumen final, se suplementó con 1 µl de una disolución 25 mM de dNTPs y 2 U de la enzima, incubando a temperatura ambiente durante 30 min. La muestra tratada con la polimerasa Klenow se procesó de modo análogo a lo descrito en el apartado anterior.

2.8.9 Ligación de fragmentos de DNA

La ligación de fragmentos de DNA se realizó mezclando preparaciones de los fragmentos e incubando las mezclas en presencia de 1-3 U de DNA ligasa del bacteriófago T4 (MBL). Las ligaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl de tampón comercial de la enzima (Tris-HCl 40 mM (pH 7,8), MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 0,5 mM). Las ligaciones de fragmentos de DNA con extremos cohesivos se incubaron a 14 °C durante al menos 2 h ó a 4 °C durante 16-24 h. Las ligaciones con extremos romos se incubaron a 14 °C durante 16 h ó a 4 °C durante al menos 2 días.

2.8.10 Clonación de fragmentos de DNA mediante el sistema Gateway

Para la generación de varios plásmidos de este trabajo se utilizó el sistema “Gateway® Technology” (Invitogen). Este sistema consiste en la clonación de un fragmento de DNA en vectores de expresión de *A. thaliana* o *C. reinhardtii* mediante dos reacciones de recombinación seriadas. Los oligonucleótidos empleados en este procedimiento se detallan en la Tabla IV. Todos los oligonucleótidos FW llevan en su extremo la secuencia *att-B*: ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT y todos los oligonucleótidos RW

llevan en extremo la secuencia *att*-B: ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT.

Para ello, en primer lugar se amplificaron mediante PCR los fragmentos a clonar utilizando cebadores que llevaran en uno de sus extremos las secuencias de reconocimiento *att*-B de la recombinasa BP, responsable de transferir el fragmento clonado al vector de entrada o pDONR. Una vez realizadas las amplificaciones, los productos de PCR se purificaron y se cuantificaron, y se preparó la primera reacción de recombinación (BP), siguiendo las instrucciones del fabricante, para introducirlos en el vector de entrada correspondiente. Con los plásmidos así generados, también conocidos como pENTRY, se transformó la estirpe de *E. coli* DE3 por electroporación.

Mediante una segunda reacción de recombinación (LR) se transfirieron los fragmentos clonados en el vector de entrada al vector correspondiente de expresión en *A. thaliana* o *C. reinhardtii*. Una vez obtenidos estos vectores, los de plantas se podrían transformar en la estirpe de *Agrobacterium* GV3101 y los de *Chlamydomonas* se usaron para transformar la estirpe de *C. reinhardtii* CW15.

Tabla V: Oligonucleótidos utilizados en el sistema Gateway. Las secuencias *att*-B se muestran en negrita

Oligonucleótido	Secuencia
PPA1_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGGTCGC
PPA1 madura FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGTC
PPA1_RW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGATCAGG
PPA1_ARS_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGGGT CCCCTGCCGGTGTTCGCCGTCGCTT
PPA1_KOZ_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGTT
PPA1-NLS_RW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGACCTTTCT CTTCTTTTTTGGGATCAGGGACA G
PPA2_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATTAC
PPA2_RW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTCGTAC
PPA2_ARS_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGGGT GCCCTCGCGGTGTTCGCCGTCGCTT
PPA2-NLS_RW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CGACCTTTCT CTTCTTTTTTGGCTCGTACAGGTT
HPPA_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCATAA

HPPA_RW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCAATG
HPPA_ARS_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGGGT GCCCTCGCGGTGTTCCGCCGTCGCTT
MmPPA_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGTT
MmPPA_RW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAATA
MmPPA_RW(-Stop)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAATAAAC
MmPPA_ARS_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGGGT GCCCTCGCGGTGTTCCGCCGTCGCTT
MmPPA_KOZ_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCAAAATG
MmPPA_KOZAt_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACAATA
MmPPA_INV_KOZAt_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACAATAA TGACCAAGAAGTTTGCTCCAACAT
OtPPA_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGCCACG
OtPPA_RW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGCCACG
OtPPA_RW (-Stop)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGCTCCTTTTGG
OtPPA_ARS_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATGGGT GCCCTCGCGGTGTTCCGCCGTCGCTT
OtPPA_KOZ_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCAAAATG
OtPPA_KOZAt_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACAATA
OtPPA_INV_KOZAt_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACAATAA TGACCAAGAAGTTTGCTCCAACAT
SmPPA_KOZ_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCAAAATG
SmPPA_RW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCATTA
SmPPA-NLS_RW	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGACCTTTCT CTTCTTTTTTGGCCATTAAACT

2.8.11 Secuenciación automática de DNA mediante marcaje fluorescente

La secuenciación automática de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Parasitología Molecular y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) 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 Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.0 (PE Biosystems). Los cromatogramas se visualizaron y analizaron usando el programa ApE v2.0.39 (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

2.9 Aislamiento y análisis del RNA

Para evitar la degradación del RNA por acción de las RNAsas se tomaron las siguientes precauciones: todo el material de vidrio utilizado se esterilizó a 200 °C durante 2 h en un horno y todas las disoluciones utilizadas, excepto los tampones Tris, fueron preparados con agua desionizada autoclavada. El material de plástico utilizado se esterilizó en un autoclave o era material comercial ya estéril y libre de RNAsas.

2.9.1 Aislamiento de RNA de microalgas eucarióticas

Para el aislamiento de RNA total en *C. reinhardtii* se utilizó el método rutinario con Trizol (Invitrogen), un reactivo compuesto por una mezcla de fenol y tiocianato de guanidinio que permite obtener un aislamiento con alta eficiencia en poco tiempo.

Para este método se recogieron 0,5-1 g de peso fresco de un cultivo crecido en las condiciones adecuadas y se produjo la rotura celular en presencia de perlas de vidrio (Sigma-Aldrich) de 0,2 mm de diámetro, sometiendo las muestras a 10 períodos de agitación de 1 min, con ayuda de un agitador automático, alternados con periodos de 1 min en hielo. Una vez obtenidos los homogenados, se le añadieron 500 µl de Trizol, se mezclaron vigorosamente durante 1 min y se le añadieron otros 500 µl de Trizol, volviéndolos a agitar vigorosamente y dejándolos reposar unos minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 15 min a 12000 g y los sobrenadantes se pasaron a tubos limpios con 200 µl de cloroformo. Se volvieron a mezclar vigorosamente y se dejaron reposar otra vez a temperatura ambiente. Los preparados se volvían a centrifugar en las condiciones anteriores y el RNA presente en la fase acuosa se precipitó mediante la adición de 625 µl de isopropanol. Tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones y se obtuvo un precipitado con el RNA, que se resuspendió en 750 µl de LiCl 3M agitando durante 10 min a temperatura ambiente. Estas muestras se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 15000 g y el precipitado se lavó con EtOH al 70 % (v/v), resuspendiendo

finalmente en 20 µl de agua desionizada previo secado al aire del precipitado. Para terminar, estas preparaciones se calentaron a 65 °C durante 10 min para facilitar su resuspensión.

2.9.2 Estimación de la concentración, pureza e integridad del RNA

De forma análoga a lo descrito en el apartado 2.7.4, fracciones de 1 µl de las preparaciones de RNA se diluyeron en 0,5 ml de agua y se midió su absorbancia ultravioleta en cubetas de cuarzo, tanto a 260 nm como a 280 nm. Como criterio de pureza se consideró una relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}) entre 1,8 y 2. Para la estimación de la concentración se utilizó un coeficiente de extinción $E = 0,25 \text{ (mg/ml)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Adicionalmente, 1 µl de las preparaciones se disolvió en 10 µl de agua desionizada, se añadieron 2 µl 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 µl de bromuro de etidio (1 mg/ml) para realizar una electroforesis y visualizar la muestra en geles de agarosa al 0,7% (p/v) preparados en tampón TBE (ver apartado 2.8.2). Esto permitió comprobar la integridad de las muestras y la concentración relativa de unas respecto a otras, según la intensidad de las bandas observadas.

2.9.3 Obtención de cDNA a partir de RNA

Para la obtención de cDNA se utilizó el juego de reactivos “QuantiTect® Reverse Transcription Kit” (Quiagen). Brevemente, 1 µl de RNA total aislado previamente se trató con DNAsa para reducir el DNA genómico contaminante hasta niveles indetectables por PCR. Posteriormente se añadió la enzima retrotranscriptasa (Quiagen) y se incubó durante 30 min a 42 °C según las indicaciones del fabricante. La enzima se inactivó incubando las muestras a 95 °C durante 2 min y posteriormente se añadieron a las preparaciones 40-80 µl de agua libre de DNAsas.

Estas preparaciones de cDNA se utilizaron para obtener los fragmentos de PCR que se clonaron mediante el sistema Gateway, usando para ello los

oligonucleótidos descritos en la Tabla V.

2.10 Análisis de secuencias de DNA y proteínas mediante métodos informáticos

La búsqueda de pautas abiertas de lectura (ORF), la traducción de las secuencias de los nucleótidos a aminoácidos y la búsqueda de las dianas de restricción, se realizó con el programa informático ApE v2.0.39. Las bandas de DNA secuenciadas se analizaron siguiendo el algoritmo BLAST (Altschul, Madden et al. 1997). El alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos realizado para los estudios de filogenia molecular se confeccionó utilizando el programa CLUSTAL X (<http://www.clustal.org>). Las secuencias de aminoácidos que no se generaron en nuestro grupo, se obtuvieron de la página web de proyectos genoma de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>).

2.11 Microscopía

El análisis microscópico se realizó en un microscopio de fluorescencia Leica DM 6000B. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital acoplada al microscopio y el software Leica AF600.

2.11.1 Análisis de localización subcelular mediante microscopia de fluorescencia

Para el análisis de localización subcelular mediante microscopia de fluorescencia en levaduras, las células se cultivaron durante toda la noche en el medio de cultivo adecuado. A continuación, se recogieron mediante centrifugación a 700 g durante 5 min en una centrífuga de mesa Eppendorf y se resuspendieron en agua. Para marcar los núcleos de levadura se utilizó el marcador fluorescente de DNA DAPI (2 µg/ml, Sigma-Aldrich), las células se incubaron durante 30 min en agitación suave y oscuridad y a continuación, se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante. Para el montaje de las

preparaciones, los cubreobjetos se trataron con una disolución de polilisina (Sigma-Aldrich) a 1 mg/ml y se dejaron secar antes de depositar en cada uno 10 µl de la suspensión celular. Tras 10 s se retiró el líquido sobrante de los cubreobjetos, se dejaron secar al aire y se colocaron sobre los portaobjetos para ser observados al microscopio.

2.11.2 Ensayos cualitativos de acidificación del lumen vacuolar en levadura

Para los ensayos cualitativos de acidificación del lumen vacuolar en levadura se utilizó Quinacrina (Sigma-Aldrich) como marcador fluorescente. Se trata de un compuesto fluorescente de pequeño tamaño que se acumula en la vacuola únicamente cuando el pH intraluminal es bajo. Para su utilización, se siguió el procedimiento descrito por Roberts y *col.* (Roberts, Raymond et al. 1991). Los cultivos se resuspendieron hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 2-4 utilizando para ello el medio complejo YP con glucosa 2% (p/v) suplementado con Na₂HPO₄ 50 mM y quinacrina 200 µM. Las muestras se dejaron incubar durante 5-10 min a temperatura ambiente, se recogieron por centrifugación y se lavaron con medio mínimo SC suplementado con Na₂HPO₄ 50 mM. Por último, se resuspendieron en medio complejo YP con glucosa 2% (p/v) y se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia, sin sobrepasar nunca los 10 min tras el tratamiento.

2.12 Estadística

Todos los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se realizaron por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-Student con $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) o $p \leq 0,001$ (***)).

3. RESULTADOS

3.1 Expresión heteróloga de la sPPasa de *Moorella thermoacetica* en levadura

Las sPPasas pueden dividirse en dos familias principales, la Familia I de enzimas dependientes de Mg^{2+} y la Familia II dependientes tanto de Mg^{2+} como de Mn^{2+} u otros cationes divalentes. La conformación espacial del sitio activo y el mecanismo catalítico para la hidrólisis de PPi son análogos en ambos casos, pero no presentan similitudes ni a nivel de secuencia ni de estructura, siendo un ejemplo claro de convergencia evolutiva (Fabrichniy, Lehtiö et al. 2004).

La bacteria anaerobia *M. thermoacetica* es un organismo acetogénico, capaz de convertir la glucosa en ácido acético (Drake and Daniel 2004) y de fijar CO_2 atmosférico en forma de acetyl-CoA y otros compuestos orgánicos (Pierce, Xie et al. 2008). En el genoma de este organismo hay genes que codifican dos PPasas distintas: una sPPasa de Familia II (MtPPasa) (Jämsen, Tuominen et al. 2007) y una Na^+ -PPasa (Baykov, Malinen et al. 2013). La MtPPasa presenta la peculiaridad de poseer en su secuencia una región de unos 100 aminoácidos de unión a nucleótidos de adenina llamada dominio *Cistationina- β - sintasa* (CBS) por la enzima donde primero se identificó, capaz de regular la actividad enzimática de la propia sPPasa en función del nucleótido que tenga unido. En resumen, la actividad PPasa catalítica de la enzima es activada por la unión de ATP e inhibida por la unión de ADP y/o AMP. Esta característica ha hecho que varios autores sugieran la posibilidad de que este dominio actúe como un sensor del estado bioenergético celular, capaz de modular la MtPPasa, lo que alteraría el metabolismo del organismo en función de las condiciones en que se encuentre (Salminen, Anashkin et al. 2014).

M. thermoacetica es un organismo termófilo, su óptimo de temperatura es de 58 °C, y vive normalmente en suelos, por lo que debe enfrentarse con frecuencia a situaciones de estrés ambiental. La regulación característica de su sPPasa junto con la presencia de una mPPasa, pueden suponer ventajas adaptativas para el organismo en estas condiciones. Cuando la razón $ATP/(ADP+AMP)$ sea baja, la sPPasa estaría inactiva lo que permitiría la actividad de las mPPasas, que pueden así contribuir a crear el gradiente

electroquímico necesario para mantener la función metabólica del organismo (Jämsen, Baykov et al. 2010).

En este trabajo hemos llevado a cabo la expresión heteróloga de la sPPasa de Familia II de *M. thermoacetica* en levaduras, con el objetivo de comprobar si es capaz de complementar funcionalmente a la sPPasa endógena de *S. cerevisiae* (Ipp1p), si la presencia de la MtPPasa supone una ventaja fisiológica para la levadura y si la actividad de la proteína varía en función del estado energético celular.

Tabla VI: Genes de sPPasas utilizados para la expresión heteróloga en levadura

GEN (Código genómico o número de acceso NCBI)	Tipo de sPPasa, organismo y reino
<i>ScIPP1</i> (YBR011C)	sPPasa Familia I de <i>S. cerevisiae</i> (Fungi)
<i>SmPPA</i> (ACC05778)	sPPasa Familia II (DHH-DHHA2 fosfoesterasa) de <i>Streptococcus mutans</i> (Monera/Bacteria)
<i>MtPPA</i> (ABC20696.1)	sPPasa Familia II (DHH-DHHA2 fosfoesterasa) con dominio CBS de <i>Moorella thermoacetica</i> (Monera/Bacteria)

Para ello se clonó mediante PCR la ORF del gen *MTPP*, que codifica la MtPPasa, a partir de un plásmido pET36b+ para expresión en *E. coli* (gentilmente donado por el Dr. A. Salminen del grupo del Prof. R. Lahti, Univ. de Turku, Finlandia), y se introdujo en plásmidos lanzadera de expresión en levadura. Se empleó un plásmido p416GPD al que se le sustituyó el promotor GPD por el promotor del gen *MET25* de *S. cerevisiae* (p416Met25) para generar la construcción de la MtPPasa nativa, y un plásmido pUG35, que permite la fusión traduccional con la proteína fluorescente verde yEGFP en su extremo C-terminal, para la construcción de la quimera MtPP-GFP. También se clonó la misma ORF, pero excluyendo la región CBS, y se introdujo en el plásmido pUG35 para obtener la construcción MtPP(Δ CBS)-GFP. Estas construcciones génicas se comprobaron tanto por restricción como por PCR.

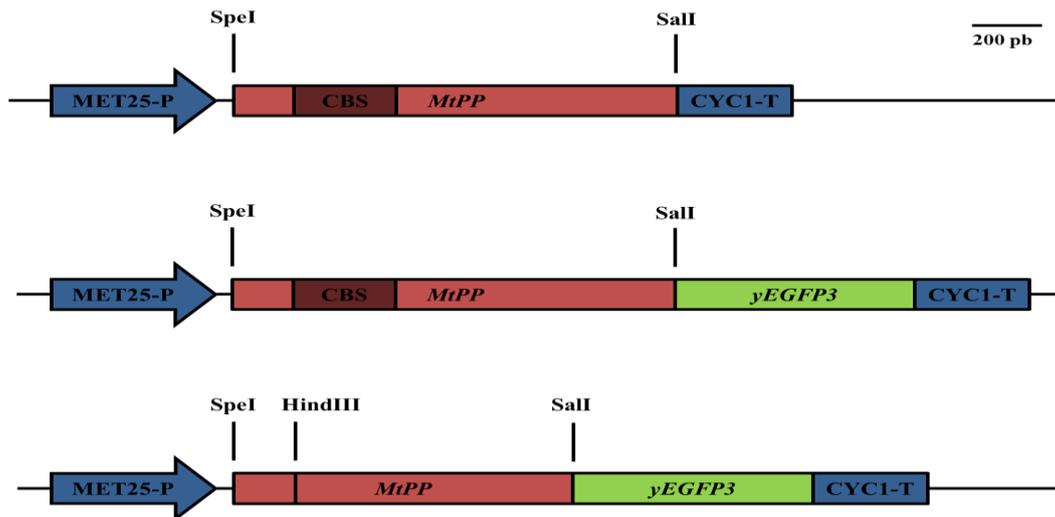


Figura 3.1.1: Representación esquemática de las construcciones de MtPPasa utilizadas para su expresión heteróloga en levadura. Met25-P: promotor del gen *MET25*; CYC1-T: terminador del gen *CYC1*; MtPP: ORF del gen codificante de la proteína MtPPasa de *M. thermoacetica*; yEGFP3: ORF del gen *yEGFP3*. Aparecen señalados los sitios de corte de restricción utilizados para generar las construcciones. Todas las quimeras tenían un tamaño aproximado de 2-3 kb.

Una vez obtenidas las construcciones (Figura 3.1.1), se utilizaron para transformar el mutante condicional de *Saccharomyces cerevisiae* YPC3. En este mutante, la copia cromosómica del gen *IPP1* se encuentra bajo el control del promotor regulable (inducible/reprimible) estricto del gen *GALI* (Drake, Serrano et al. 2010). De esta forma se puede estudiar la capacidad de estas construcciones para complementar funcionalmente la deficiencia de Ipp1p simplemente cambiando la fuente de carbono del medio de galactosa a glucosa. Se compararon las células control cultivadas en medio rico con galactosa 2% (p/v), que tienen el promotor del gen *GALI* inducido, con células crecidas en medio rico con glucosa 2% (p/v), que tienen el promotor del gen *GALI* reprimido y por tanto, carecen de la sPPasa de levadura. Debido a la especial regulación de la proteína estudiada, también se compararon con células cultivadas en condiciones estándar de respiración: medio complejo con glicerol 3% (p/v) (YPGli), en el cual la razón ATP/(ADP+AMP) debe ser teóricamente más alta y donde el promotor de *GALI* también se encuentra reprimido. Para este estudio se realizó un ensayo de goteo en cada uno de los medios citados.

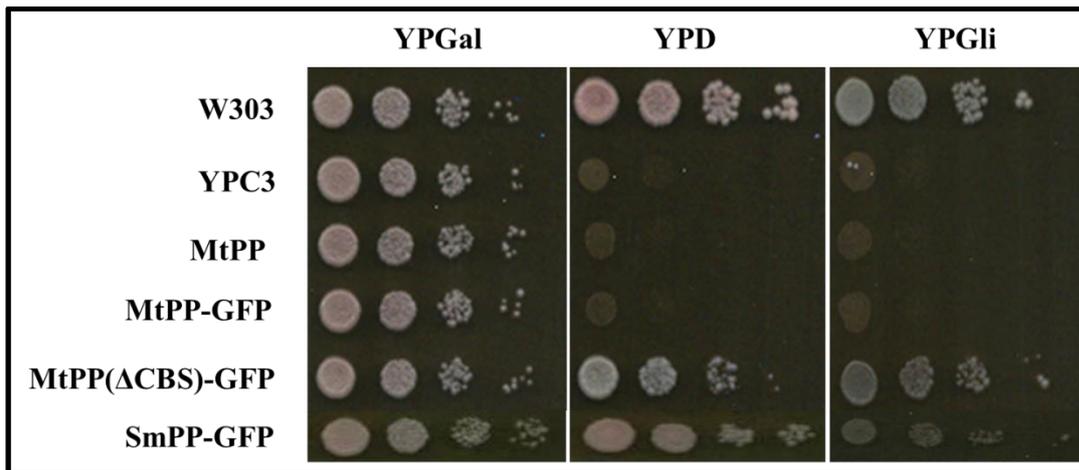


Figura 3.1.2: Complementación funcional de la deficiencia en sPPasa Ipp1p cromosómica de la cepa YPC3 por distintas construcciones de la sPPasa de *M. thermoacetica* (MtPPasa). Crecimiento comparativo en galactosa, glucosa y glicerol de las distintas cepas. Como control positivo se usó la sPPasa Familia II de la bacteria Gram+ *Streptococcus mutans* (SmPP) que carece de dominio CBS. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en agua estéril y, posteriormente, se sembraron 2,5 μ l de cada una de ellas sobre placas con galactosa, glucosa o glicerol como fuente de carbono, correspondientes aproximadamente (de izquierda a derecha) a 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células, respectivamente.

Como se aprecia en la figura 3.1.2, tras dos días de incubación, la única cepa de *Moorella* que mostró complementación funcional de la deficiencia en la sPPasa cromosómica Ipp1p fue la transformada con la construcción carente de la región CBS (MtPP(ΔCBS)-GFP). Esta cepa fue capaz de crecer tanto en condiciones de cultivo con glucosa como con glicerol.

A continuación, se determinaron tanto los niveles de polipéptido de MtPPasa mediante *Western blot* como la actividad específica sPPasa en extractos celulares totales. Las medidas de actividad se realizaron pre-incubando las muestras durante media hora a 30 °C con $MnCl_2$, al tratarse de una sPPasa de Familia II y necesitar de la presencia de cationes divalentes para alcanzar su máxima eficiencia. Estudios previos en *Escherichia coli* mostraron niveles mayores de actividad de la enzima MtPPasa en presencia de $CoCl_2$ por lo que también se determinaron los niveles de actividad en presencia de este catión (Jämsen, Tuominen et al. 2007). Para la determinación de los niveles de proteína en *Western blot* se utilizó primero un anticuerpo comercial anti-yEGFP, pero no fue posible observar la presencia de ninguna banda (datos no mostrados), por lo cual se repitieron los ensayos utilizando un anticuerpo anti-

Resultados

sPPasa específico para la sPPasa de Familia II de la microalga marina *Ostreococcus tauri* (Albi T. 2008 Identificación de Genes y Caracterización de Proteínas del Metabolismo de Polifosfatos Inorgánicos y Compuestos de Fósforo Reducido en Organismos Fotosintéticos. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla). Como control de complementación positiva se utilizó la sPPasa de Familia II de *Streptococcus mutans* fusionada a yEGFP por su extremo C-terminal (SmPP-GFP), codificada por un plásmido lanzadera de levadura con características similares a los descritos anteriormente.

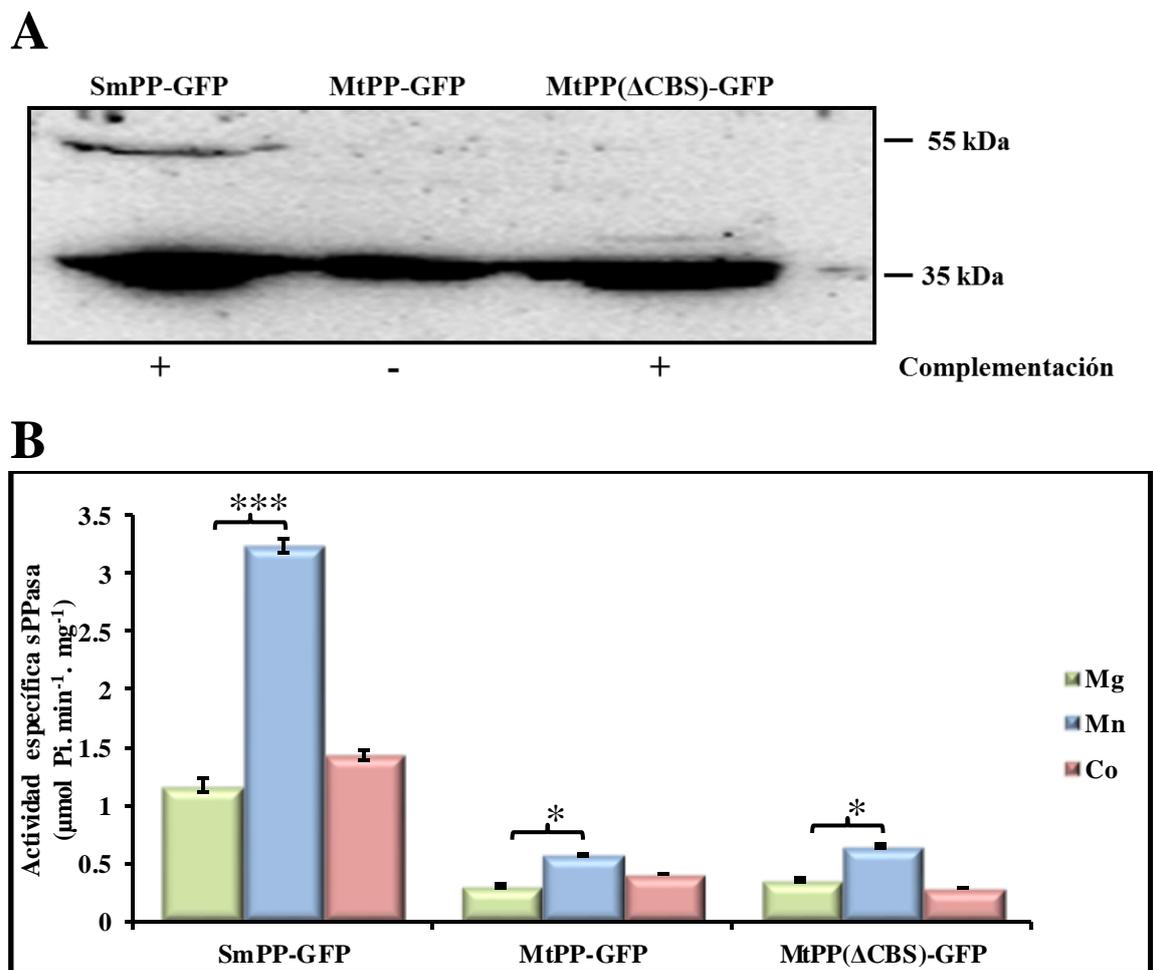


Figura 3.1.3: Niveles de proteína y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de las diferentes cepas YPC3 cultivadas en glucosa. A) Los niveles de polipéptidos de las diferentes sPPasas se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo contra la sPPasa de la Familia II de *Ostreococcus tauri*. Se aplicaron aproximadamente 25 μg de proteína por calle. B) Actividad específica sPPasa en extractos totales de las diferentes cepas transformantes. Las barras de error representan error estándar ($n = 3$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; n.s., no significativo).

El análisis por *Western blot* mostró la presencia de proteínas inmunoreactivas en todos los casos, observándose una banda principal a 35 kDa, correspondiente al tamaño esperado para el dominio catalítico sPPasa de Familia II, tanto para la SmPPasa como a MtPPasa(Δ CBS), en ambos casos sin la proteína fluorescente yEGFP (Figura 3.1.3A). Se observa una banda del mismo tamaño para la cepa MtPPA-GFP, sugiriendo estos resultados que se produce un procesamiento proteolítico que elimina la yEGFP en todos los casos y que elimina, presuntamente, también la región CBS en el caso de la proteína MtPPasa completa. En la cepa SmPP-GFP se pudo observar también una banda minoritaria de aproximadamente 55 kDa correspondiente al tamaño esperado para la quimera de la sPPasa Familia II fusionada a yEGFP. En la determinación de actividad sPPasa en extractos celulares totales (Figura 3.1.3B) se observaron niveles significativos de actividad similares en ambas cepas expresoras de MtPPasa, aunque eran notoriamente inferiores a los observados en la cepa SmPP-GFP. La actividad resultó significativamente estimulada por $MnCl_2$ en todos los casos, pero no por $CoCl_2$, confirmando este resultado que se trata de actividades de hidrólisis de PPi producidas por sPPasas de la Familia II.

Para determinar si las bandas obtenidas se debían a un procesamiento proteolítico de las quimeras *in vivo* en las células de levadura, se usaron las mismas construcciones para transformar una cepa mutante de *S. cerevisiae* deficiente en las proteasas vacuolares (BJ5459). En esta cepa no se puede controlar la expresión de la sPPasa endógena Ipp1p, por ello no se realizaron medidas de actividad en extractos celulares y sólo se llevaron a cabo ensayos mediante *Western blot* de los mismos para detectar los niveles de polipéptidos de sPPasas Familia II que presentaban. Se pudo observar que en todos los casos aparecía una única banda de aproximadamente 60 kDa, correspondiente al tamaño esperado para las quimeras completas (Figura 3.1.4). Esto parece confirmar que se producía una degradación proteolítica asociada a proteasas vacuolares en la cepa utilizada para los experimentos anteriores. Mediante análisis informático de las secuencias de las quimeras, hemos identificado varios sitios de corte específicos para la proteasa mayoritaria de levadura KEX2. Como se puede ver en la Figura S.1 de los datos suplementarios, la quimera MtPP-GFP posee cuatro sitios de corte específicos para KEX2: 160-

Resultados

RR-163 dentro de la secuencia CBS, 195-KR-198 justo después de la secuencia CBS, 430-RR-433 justo antes de la yEGFP y 652-KR-655 dentro de la secuencia de yEGFP. En la quimera Mt(Δ CBS)-GFP se pierde el sitio que está dentro de la secuencia CBS (160-RR-163). Estos sitios de corte podrían explicar el procesamiento observado para las sPPasas e Familia II bacterianas expresadas heterológamente en levadura, y sugieren una localización subcelular en compartimentos subcelulares (lisosomas, vacuola) que no permitirían complementar la deficiencia de la sPPasa citosólica Ipp1p, como se discute más adelante.

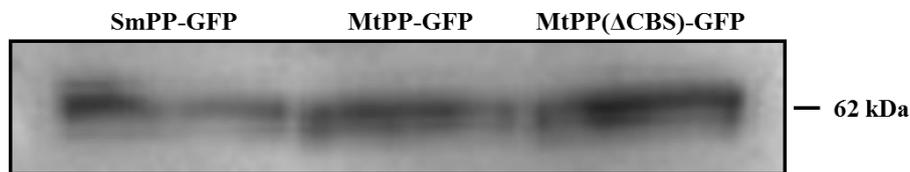


Figura 3.1.4: Niveles de polipéptidos de sPPasas Familia II en extractos celulares totales de cepas transformantes derivadas de BJ5459, y expresoras de las diferentes quimeras. Los niveles de polipéptidos de las diferentes sPPasas se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo contra la sPPasa de la Familia II de *Ostreococcus tauri*. Se aplicaron aprox 25 μ g de proteína por calle.

También se determinó si los niveles de actividad sPPasa se veían afectados por la presencia en el ensayo de concentraciones fisiológicas de nucleótidos de adenina (ATP y ADP) que se ha descrito afectan *in vitro* muy notablemente a la actividad de MtPPasa nativa (Jämsen, Tuominen et al. 2007). Para ello se realizaron las medidas en las mismas condiciones pero suplementando las muestras con 50 μ M de ATP o ADP durante la incubación con $MnCl_2$. Para las medidas control se suplementaron las muestras con un volumen de agua desionizada similar al utilizado en el resto de medidas con ATP/ADP.

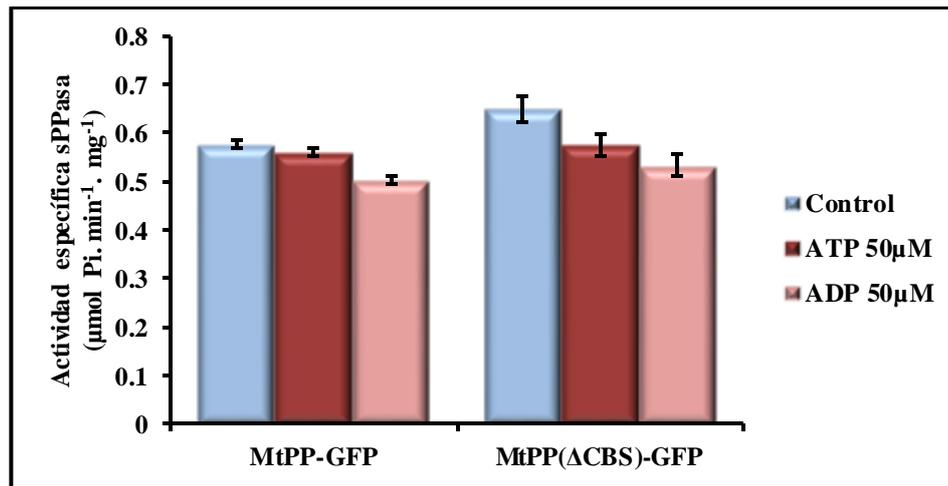


Figura 3.1.5: Niveles de proteína y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de las diferentes cepas YPC3 cultivadas en glucosa. Las muestras se suplementaron con 50µM de ATP o ADP y se incubaron durante 30 min a 30 °C de forma simultánea a la incubación con MnCl₂.

Como era de esperar para la cepa MtPP(ΔCBS)-GFP, la actividad específica sPPasa no se vio afectada en ningún caso por la presencia en el ensayo de nucleótidos de adenina. Sorprendentemente, este resultado fue el mismo para la cepa transformada con la construcción completa de MtPPasa fusionada a yEGFP (Figura 3.1.5). Este resultado, unido al obtenido por *Western blot*, sugiere una degradación proteolítica de la proteína por parte de la levadura que estaría afectando a la región CBS de la misma, y que posiblemente conllevaría su eliminación. Estos resultados explicarían la incapacidad para complementar la deficiencia de Ipp1p y, por tanto, la incapacidad de crecer en glucosa de la cepa MtPP-GFP, ya que es posible que la levadura esté confinando la proteína en algún compartimento celular distinto del citoplasma para su degradación. Al estar la proteína confinada de esta forma, por ejemplo en lisosomas o en la vacuola, sería incapaz de acceder al “pool” de P_{Pi} citosólico, por lo que, este metabolito se acumularía e impediría la proliferación celular.

3.1.1 Efecto de la fusión con el dominio CBS sobre la funcionalidad de la sPPasa Ipp1p de *S. cerevisiae*

Otro objetivo del presente trabajo fue la expresión en *S. cerevisiae* de su sPPasa homóloga Ipp1p fusionada a la región CBS de la MtPPasa, y su caracterización funcional. Para ello se realizaron construcciones con la ORF del gen *IPPI* fusionada a la región CBS por su extremo C o N-terminal, y se introdujeron en el plásmido lanzadera de expresión en levadura p416GPD, obteniéndose las construcciones Ipp1-CBS y CBS-Ipp1, respectivamente (Figura 3.1.6). Con ello se pretendía obtener una proteína Ipp1p capaz de ser regulada por los niveles de ATP, ADP y/o AMP celulares. Una vez realizadas y comprobadas las construcciones, se transformaron en la cepa YPC3 para comprobar su capacidad para complementar la deficiencia de Ipp1p mediante un ensayo de goteo en medios con galactosa, glucosa o glicerol (Figura 3.1.7).

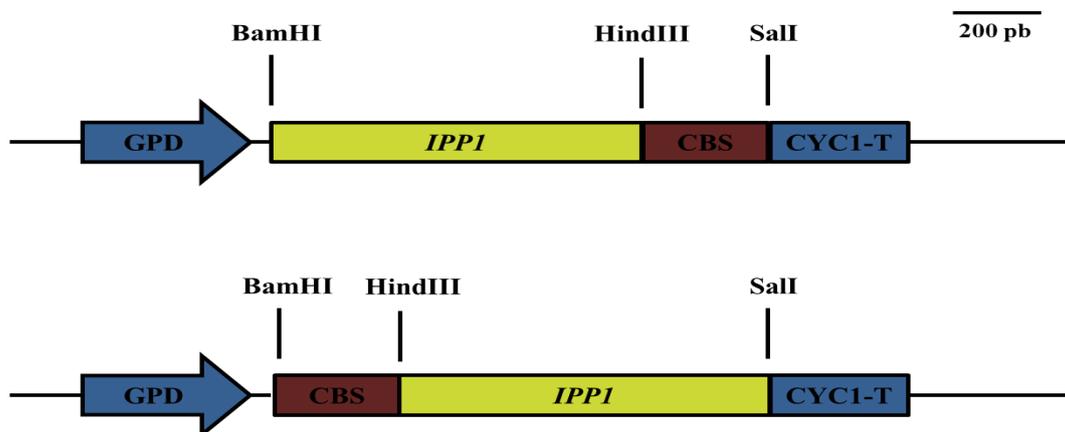


Figura 3.1.6: Representación esquemática de las construcciones de IPP1 con el dominio CBS utilizadas para su expresión heteróloga en levadura. Leyenda; GPD: promotor del gen *GAPDH3*; CYC1-T: terminador del gen *CYC1*; IPP1: ORF del gen *IPPI* de *S. cerevisiae*; CBS: Secuencia del dominio CBS de unión a nucleótidos de adenina del gen que codifica la MtPPasa de *M. thermoacetica*. Aparecen señalados los sitios de corte de restricción utilizados para generar las construcciones. Todas las quimeras tenían un tamaño aproximado de 2 kb.

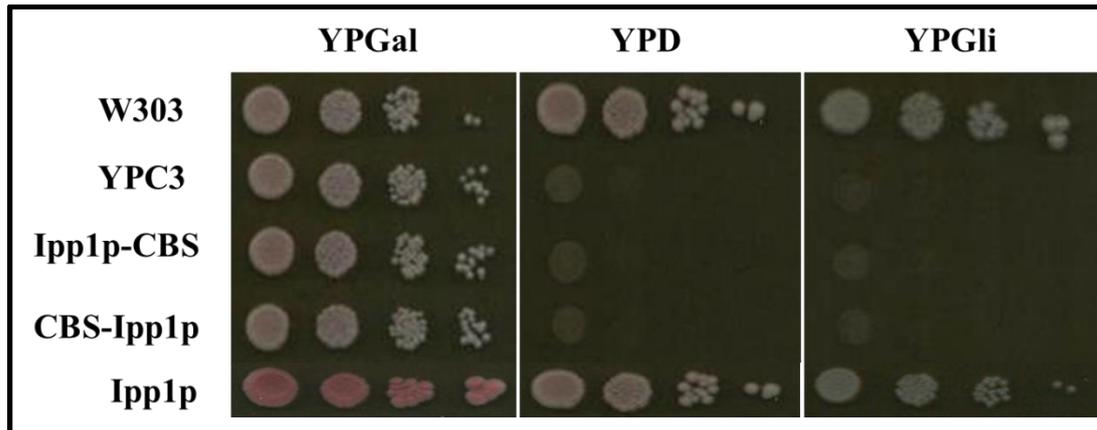
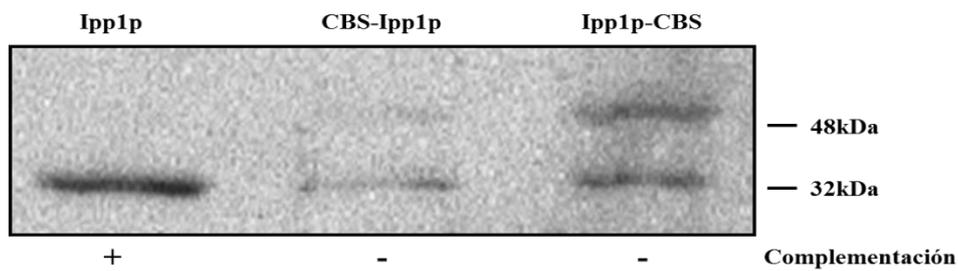


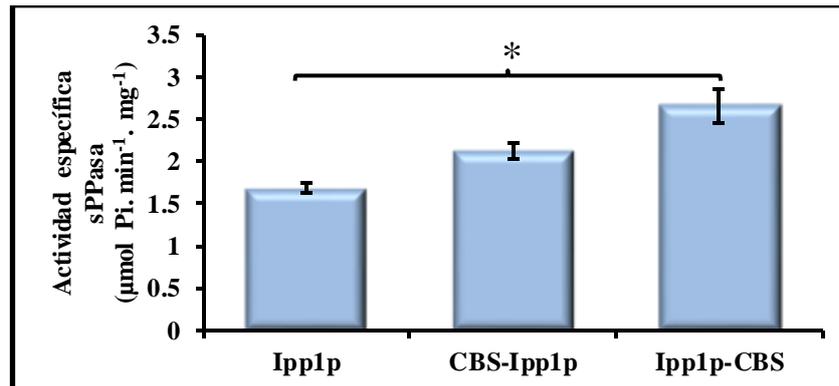
Figura 3.1.7: Complementación funcional de la deficiencia en sPPasa Ipp1p cromosómica de la cepa YPC3 por distintas quimeras de Ipp1p y el dominio CBS. Crecimiento comparativo en galactosa (YPGal), glucosa (YPD) y glicerol (YPGli) de las distintas cepas. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en agua estéril y, posteriormente, se sembraron 2,5 μ l de cada una de ellas sobre placas con galactosa, glucosa o glicerol, correspondientes aproximadamente (de izquierda a derecha) a 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 células, respectivamente.

Ninguna de las cepas expresoras de fusiones con el dominio CBS fue capaz de complementar funcionalmente la deficiencia de Ipp1p (Figura 3.1.7), de forma análoga a lo ocurrido anteriormente con la proteína MtPPasa. A continuación, se determinaron los niveles de proteína por *Western blot* y los niveles de actividad sPPasa en extractos totales de cada una de las cepas (Figura 3.1.8). Para este estudio no se llevaron a cabo incubaciones con cationes divalentes, ya que las sPPasas de Familia I solo requieren Mg^{2+} para alcanzar su máxima eficiencia catalítica. Al mismo tiempo, se midió la actividad específica de los extractos de las distintas cepas en presencia de 50 μ M de ATP o ADP, incubando durante media hora a 30 °C o añadiendo un volumen similar de agua desionizada durante la incubación en el caso de las medidas control. Como control positivo de complementación se utilizó la propia sPPasa nativa de levadura Ipp1p introducida en un plásmido lanzadera de levadura de características similares al empleado con el resto de quimeras. Para el análisis por *Western blot* se utilizó un anticuerpo específico anti-sPPasa Familia I mayoritaria PPAI de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* obtenido por nuestro grupo (Gómez-García, Losada et al. 2006).

A



B



C

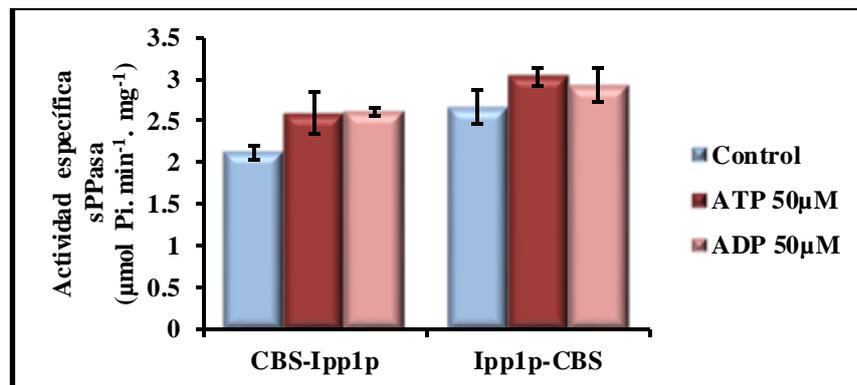


Figura 3.1.8: Niveles de proteína y actividad específica sPPasa en extractos celulares totales de las diferentes cepas YPC3 cultivadas en glucosa. **A)** Los niveles de las diferentes sPPasas se analizaron por *Western blot* con un anticuerpo contra la sPPasa Familia I de *C. reinhardtii*. En cada calle se aplicaron aproximadamente 40 µg de extractos celulares. **B)** Actividad específica ensayada en condiciones estándar de liberación de fosfato a partir de PPI en extractos totales de las diferentes cepas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; n.s., no significativo).

Los análisis por *Western blot* (Figura 3.1.8A) mostraron en todos los casos una banda de aproximadamente 32, correspondiente al tamaño de la Ipp1p nativa y al dominio catalítico sPPasa de las quimeras (Figura 3.1.8A). Además, en los extractos de las sPPasas quiméricas se apreció una banda de mayor tamaño (aprox. 48 kDa), más tenue en la cepa CBS-Ipp1p que en la Ipp1p-CBS,

que correspondería a las fusiones de Ipp1p con el dominio CBS. Estos resultados sugieren un procesamiento proteolítico de las quimeras, más eficiente en el caso de la quimera con dominio CBS N-terminal, como se discute más adelante. Mediante análisis informático de la secuencia de las quimeras se identificaron varios sitios de corte para la proteasa mayoritaria de levadura KEX2. Como se puede apreciar en la Figura S.1 de los datos suplementarios, en la quimera Ipp1p-CBS el sitio de corte para KEX2, que existe dentro de la secuencia CBS, se localiza en el extremo C-terminal de la quimera; mientras que en la quimera CBS-Ipp1p este sitio de corte se sitúa en la secuencia de unión del dominio CBS con Ipp1p. Estos sitios de corte podrían explicar los patrones de bandas observados por *Western blotting*.

En todos los casos se apreciaron niveles de actividad ligeramente mayores a los del control, siendo significativamente mayores en el caso de la quimera Ipp1p-CBS, que parece más resistente a proteólisis (Figura 3.1.8B). Sin embargo, en ninguno de los casos se apreció que los niveles se viesen significativamente afectados por la presencia de nucleótidos de, si acaso un ligero incremento en presencia de los nucleótidos (Figura 3.1.8C). Estos resultados sugieren un procesamiento proteolítico post-traducciona l de las quimeras por parte de la levadura en el que, previsiblemente, se elimine el dominio CBS introducido de forma artificial. El hecho de que las cepas expresoras de estas quimeras no sean capaces de complementar la deficiencia de Ipp1p en condiciones de crecimiento en glucosa, pero sus extractos totales presenten una alta actividad catalítica, hace suponer que las quimeras han sido translocadas y que este procesamiento proteolítico se lleva a cabo en algún compartimento subcelular distinto del citosol (lisosomas, vacuola) que impide el acceso de la proteína sPPasa al “pool” de PPi citosólico.

Los resultados de este trabajo en conjunto, nos han llevado a pensar que el dominio CBS de la sPPasa de *M. thermoacetica* (MtPPasa) es reconocido por la maquinaria celular de la levadura durante la síntesis proteica. Por tanto, la MtPPasa y las sPPasas quiméricas con el dominio CBS deben ser dirigidas hacia algún compartimento celular, como el lisosoma o la vacuola, donde sufren un procesamiento proteolítico. Esto impide la expresión funcional de las sPPasas que contengan este dominio en levadura.

3.2 Análisis de expresión de la región promotora del gen *IPPI*

En este trabajo se pretendió definir la región promotora mínima necesaria para la expresión del gen *IPPI* (YBR011C) de *S. cerevisiae*. Para ello se utilizó la base de datos de genoma de levadura conocida como “Yeast genome” (<http://www.yeastgenome.org>). Este gen se encuentra localizado en el cromosoma II de dicho microorganismo, entre las posiciones 257.112 y 257.975, comprendiendo un total de 863 pb. El gen inmediatamente anterior (aguas arriba) al gen de estudio codifica una proteína putativa del retículo endoplásmico (YBR013C) y se encuentra a una distancia aproximada de 7,5 kb.

El promotor del gen *IPPI* debe encontrarse teóricamente dentro de esta región intergénica, por lo cual se decidió seleccionarla como objeto de estudio. La mayor parte de esta región intergénica corresponde a un retrotransposón (YBRWTy1-2) de 5,9 kb, que a su vez contiene otros dos retrotransposones más pequeños (YBR012W-A/B) (Figura 3.1.2A). En vista de este dato, se decidió restringir la secuencia de estudio a la zona comprendida entre el inicio de la ORF del gen *IPPI* y el inicio del retrotransposón YBRWTy1-2, y se diseñaron oligonucleótidos para llevar a cabo la clonación de esta región genómica.

Al mismo tiempo se diseñaron oligonucleótidos para clonar por PCR distintas regiones de esta secuencia y así obtener diferentes versiones del posible promotor del gen *IPPI* (Figura 3.2.1B). Debido a las múltiples dificultades metodológicas que aparecieron durante el proceso de clonación de la región promotora de 1,9 Kb, y a la existencia en la región más distal aguas arriba del gen *IPPI* de una dudosa ORF y una región de repeticiones en tándem (pertenecientes a los retrotransposones), se descartó esta versión del promotor y se decidió trabajar con tres versiones definitivas más cortas: una de 900 pb (pIpp1 900pb), otra de 350 pb (pIpp1 350 pb) y una tercera de 900 pb en la que se habían eliminado las 157 pb más cercanas al gen *IPPI* (pIpp1 Δ 157) (Figura 3.2.1C).

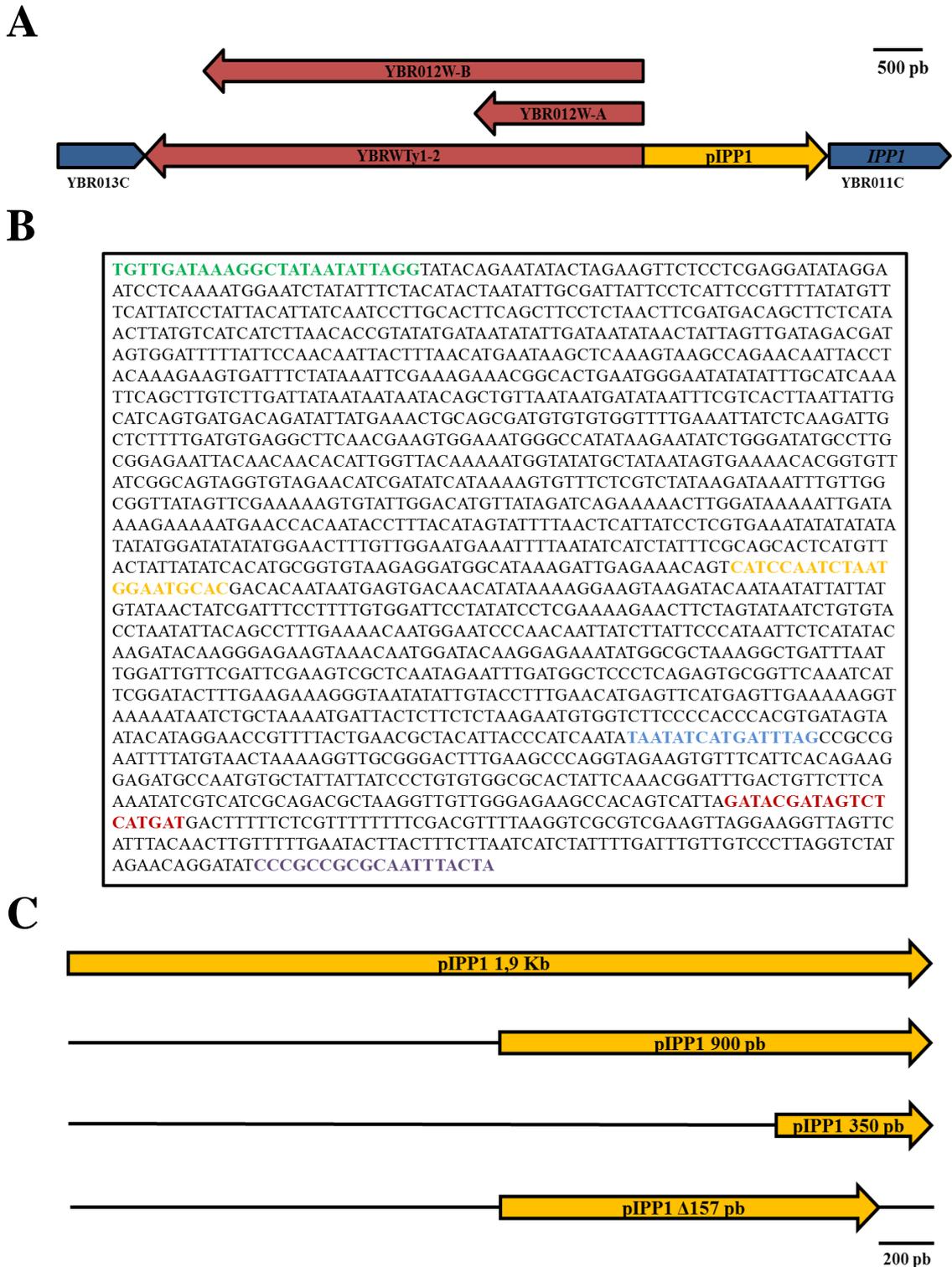


Figura 3.2.1: Definición de la región intergénica de estudio. A) Región intergénica comprendida entre los locus YBR013C e YBR011C. YBRWTy1-2, YBR012W-A e YBR012W-B: retrotransposones; pIPP1: promotor putativo del gen *IPP1*. B) Secuencia del putativo promotor del gen *IPP1*. Los oligonucleótidos utilizados se han marcado con diferentes colores; verde: Fw para región promotora de 1,9 Kb; amarillo: Fw para región promotora de 900 pb; azul: Fw para región promotora de 350 pb; morado: Rv para región promotora completa; rojo: Rv para región promotora sin las 157 pb más próximas al gen *IPP1*. C) Regiones promotoras utilizadas en este trabajo.

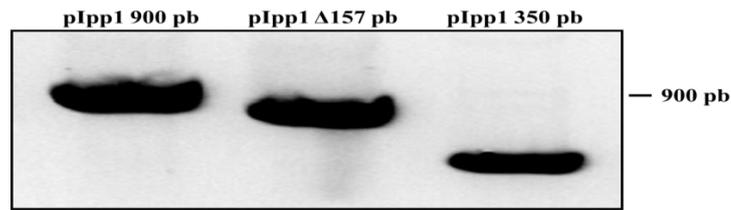


Figura 3.2.2: Fragmentos de ADN genómico de *S. cerevisiae*, obtenidos mediante PCR, de las distintas versiones del promotor del gen *IPP1* analizadas en este trabajo, separadas mediante electroforesis en gel de agarosa.

Una vez obtenidas, las tres versiones de secuencias promotoras (Figura 3.2.2), se introdujeron en plásmidos centroméricos lanzadera de levadura (p416) carentes de promotor y que contenían bien la ORF del gen reportero *yEGFP3* o la ORF del gen *IPP1*. Con estas construcciones, se procedió a transformar distintas cepas de levadura para analizar la expresión de los genes citados.

3.2.1 Análisis de la expresión del gen reportero *yEGFP3* por la región promotora de *IPP1*

Las distintas versiones de secuencias promotoras del gen *IPP1* se introdujeron en un plásmido centromérico lanzadera de levadura (p416) carente de promotor y con la ORF del gen *yEGFP3*. Usando esta construcción se pretendió limitar a uno el número de copias del plásmido presente en cada célula. La cepa utilizada para la transformación fue la estirpe silvestre de *S. cerevisiae* (W3031-a), siendo utilizada también como control negativo de los experimentos. Se utilizaron dos cepas distintas de W3031-a como controles positivos: una transformada con el mismo plásmido p416 portando el promotor del gen de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa *TDH3* (GPD-P), un promotor de expresión constitutiva en levadura, y otra transformada con el plásmido p416 portando el promotor del gen *MET25* (MET25-P).

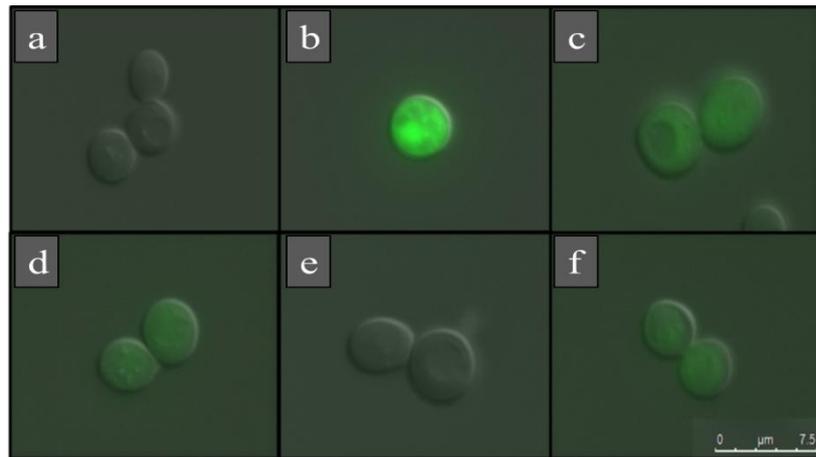
Para analizar la expresión del gen reportero *yEGFP3*, lo primero que se hizo fue observar las células con el microscopio de fluorescencia. Después se obtuvieron extractos celulares totales de las cepas transformantes y se determinaron los niveles de fluorescencia que presentaba cada uno de ellos mediante un espectrofotómetro de fluorescencia VARIAN CARY Eclipse®

(Agilent Technologies). También se cargaron la misma cantidad de proteína de los extractos celulares de cada una de las cepas en geles de poliacrilamida y, tras separación electroforética, se analizaron las bandas de yEGFP mediante detección directa de fluorescencia en los geles utilizando un escáner de fluorescencia Ettan DIGE Imager[®] (GE Healthcare).

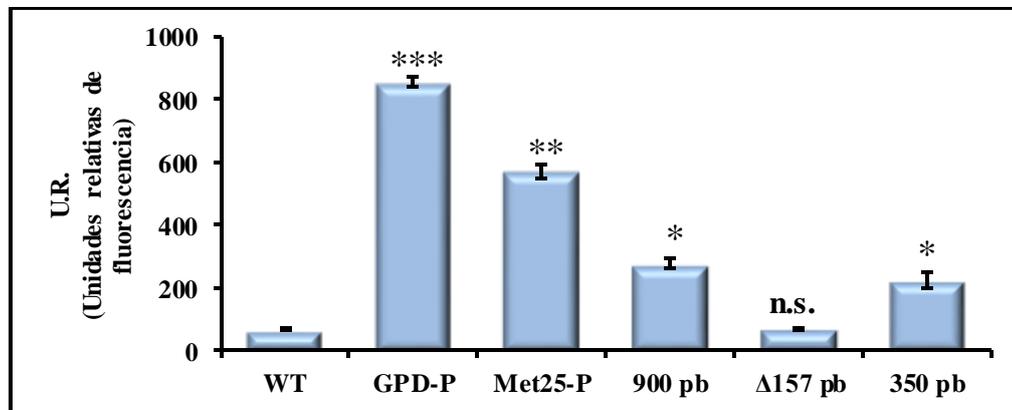
Mediante las imágenes de microscopia de fluorescencia se pudo comprobar que la cepa con mayor nivel de expresión de yEGFP es la que contiene el gen reportero bajo el dominio del promotor GPD, siendo esto lo esperado al tratarse de un promotor de expresión constitutiva fuerte (Figura 3.2.3A). Las cepas que expresaban yEGFP bajo el control de las secuencias promotoras pIpp1 900 pb y pIpp1 350 pb, presentaron unos niveles de emisión de fluorescencia verde similares y algo inferiores a los que presentaba la cepa expresora de yEGFP bajo el control del promotor del gen *MET25*. La cepa que expresaba yEGFP bajo el control de la secuencia promotora pIpp1 Δ 157 pb no presentaba niveles detectables de fluorescencia, al igual que la cepa control W3031-a sin transformar.

En los correspondientes extractos celulares, al determinar los niveles de fluorescencia verde de cada cepa comprobamos que los resultados eran similares a los obtenidos por imágenes de microscopia, siendo las cepas con más nivel de fluorescencia las que expresaban yEGFP bajo el control de los promotores GPD-P y MET25-P. Las cepas con las secuencias promotoras pIpp1 900 pb y pIpp1 350 pb presentaron niveles similares de fluorescencia y sustancialmente inferiores a las dos cepas anteriores, mientras que la cepa con la secuencia promotora pIpp1 Δ 157 pb presentaba una fluorescencia residual similar a la del control negativo (Figura 3.2.3B).

A



B



C

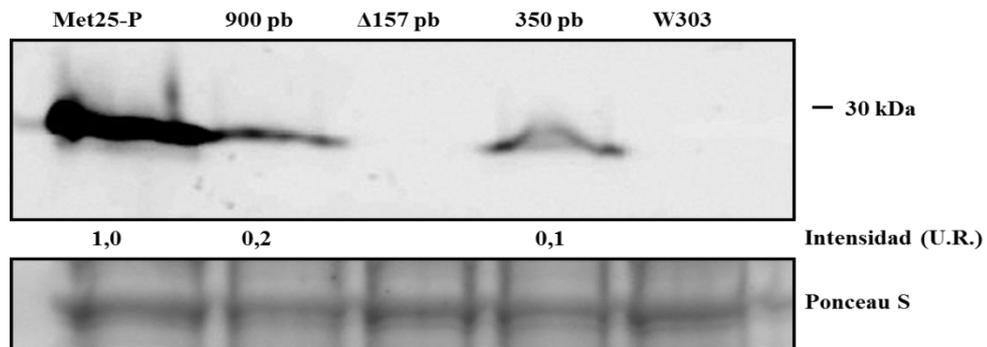


Figura 3.2.3 Análisis de la expresión del gen reportero *yEGFP* bajo el control de secuencias promotoras de *IPPI*. A) Expresión de la proteína *yEGFP* determinada por microscopía de fluorescencia de las diferentes construcciones con secuencias de *pIpp1* expresadas en la cepa W303-1a de *S. cerevisiae*. a) W303-1a; b) GPD-P; c) MET25-P; d) *pIpp1* 900 pb; e) *pIpp1* Δ157 pb; f) *pIpp1* 350 pb. B) Niveles de emisión de fluorescencia verde (510 nm) determinados en extractos celulares totales de las cepas expresoras de las distintas construcciones de *pIpp1-yEGFP*. C) Localización y cuantificación de la banda de proteína *yEGFP* en gel SDS-PAGE mediante detección directa de emisión de fluorescencia verde. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 25 μg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de la calle correspondiente usada como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; n.s., no significativo).

En el ensayo de identificación directa de la proteína yEGFP en gel de SDS-PAGE (Figura 3.2.3C) se descartó el uso de la cepa GPD, ya que presentaba unos niveles saturantes para el aparato de detección con lo que enmascaraba la detección de la proteína fluorescente en las cepas restantes. Se pudo observar una banda de proteína de aproximadamente 23 kDa, correspondiente al tamaño de la proteína fluorescente verde yEGFP, en todas las cepas excepto en el control negativo y en la cepa con la secuencia promotora pIpp1 Δ 157 pb. Las cepas con las secuencias promotoras pIpp1 900 pb y pIpp1 350 pb presentaron una banda de una intensidad similar, siendo esta intensidad un 90% inferior a la apreciada para la banda de la cepa MET25-P.

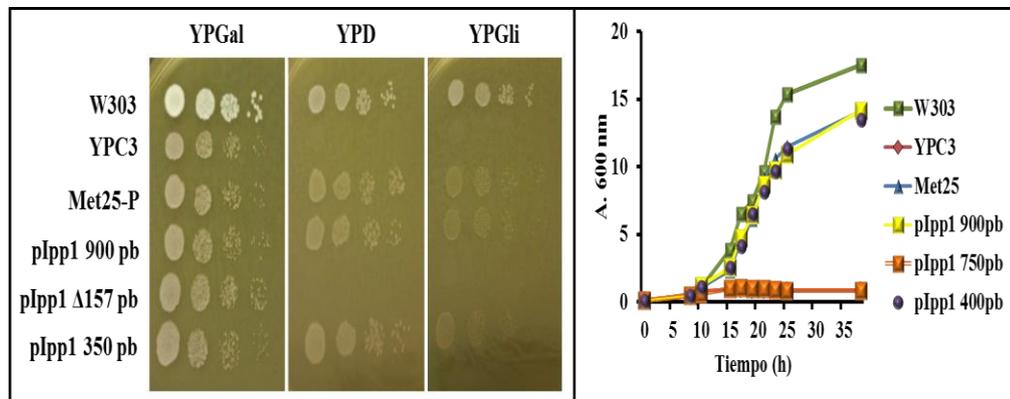
3.2.2 Análisis de la expresión del gen *IPP1* bajo el control de las secuencias promotoras analizadas en este trabajo

Para estudiar la expresión del gen *IPP1* bajo el control de las secuencias de su propia región promotora analizadas en esta Tesis, las distintas secuencias se introdujeron en el plásmido centromérico p416 carente de promotor y portando la ORF del gen *IPP1*. Usando estas construcciones se ha pretendido que no hubiera más de una copia de la construcción a estudiar por célula. La estirpe utilizada para la transformación fue la cepa mutante de *S. cerevisiae* YPC3, la cual tiene la copia cromosómica del gen *IPP1* bajo el control del promotor inducible por galactosa (pGAL1). De esta forma se eliminaba la expresión endógena del gen *IPP1* pasando las células a medio con glucosa y se aseguraba determinar únicamente la expresión producida por las construcciones introducidas. Como control negativo se utilizó la propia estirpe YPC3 sin transformar, y como controles positivos la cepa silvestre W303-1a sin transformar y la misma cepa transformada con el plásmido p416 conteniendo *IPP1* bajo el control del promotor del gen *MET25*.

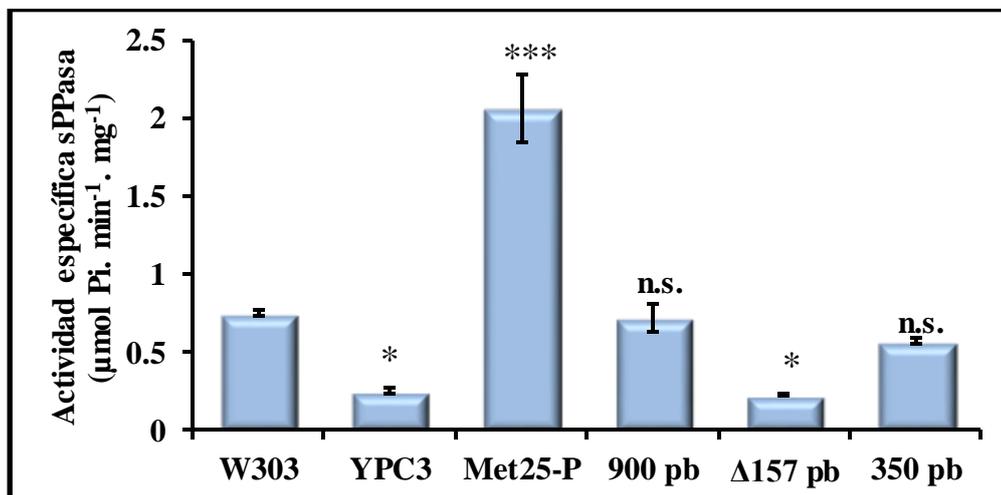
Se realizó un ensayo de crecimiento en gota, en medios con galactosa, glucosa y glicerol, para comprobar si las distintas cepas eran capaces de complementar funcionalmente la deficiencia en Ipp1p del mutante YPC3. También se obtuvieron extractos celulares totales de cada cepa y se midió su actividad específica sPPasa, además de analizar por *Western blotting* los niveles

de la proteína Ipp1p en dichos extractos mediante la utilización de un anticuerpo comercial específico para ella.

A



B



C

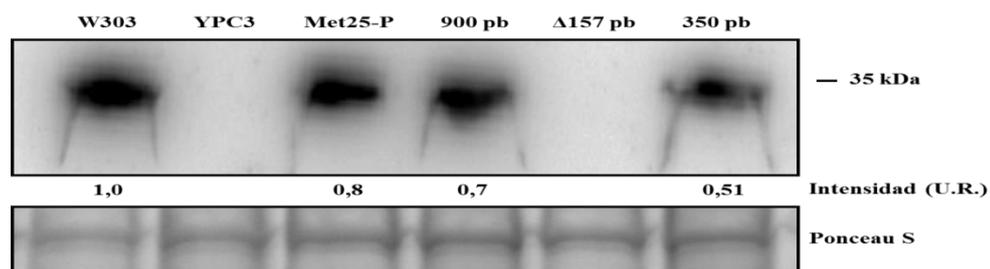


Figura 3.2.4: Análisis de la expresión del gen *IPP1* bajo el control de las secuencias promotoras analizadas en este trabajo. A) Panel izquierdo. Complementación funcional de la deficiencia en sPPasa Ipp1p cromosómica de la cepa YPC3 por distintas construcciones quiméricas de pIpp1+*IPP1*. Crecimiento comparativo en galactosa, glucosa y glicerol de las distintas cepas transformantes. Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en agua estéril y, posteriormente, se sembraron 2,5 μl de cada una de ellas en placas con galactosa, glucosa o glicerol, correspondientes aproximadamente (de izquierda a derecha) a 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10 células, respectivamente. **Panel derecho.** Curvas de crecimiento en medio líquido con glucosa (YPD) de *S. cerevisiae* W303-1a y las cepas transformantes de su derivada YPC3

Resultados

expresoras de *IPP1* bajo el control de diversas secuencias promotoras. El crecimiento se determinó por la densidad óptica del cultivo a 600 nm. **B)** Niveles de actividad específica sPPasa de la estirpe de *S. cerevisiae* W303-1a y una serie de transformantes de su derivada YPC3 expresoras de *Ipp1p* bajo el control de diversas secuencias promotoras. (*): $p \leq 0,05$; (**): $p \leq 0,001$; $n=9$. **C)** Detección y cuantificación de la proteína *Ipp1p* en extractos totales de cada una de las cepas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo comercial específico anti-*Ipp1p*. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 50 μg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de la calle correspondiente usada como control de carga. U.R., unidades relativas. Las barras de error representan error estándar ($n = 3$; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; n.s., no significativo).

Como se puede apreciar en la Figura 3.2.4A, solo la cepa expresora del gen *IPP1* bajo el control de la secuencia promotora *pIpp1* $\Delta 157$ pb no presentó crecimiento, lo cual indica que dicha construcción es incapaz de complementar funcionalmente la deficiencia de *Ipp1p* en la estirpe mutante YPC3 cultivada en glucosa o glicerol. Esto indica, además, que no se produce la expresión del gen *IPP1* en esta cepa o que, al menos, sus niveles de expresión no son suficientemente altos para cubrir las necesidades de *Ipp1p* de la célula. Mediante medidas del crecimiento en medio líquido se comprobó que todas las cepas transformantes, excepto la que contiene la secuencia promotora *pIpp1* $\Delta 157$ pb, presentaban las tasas de crecimiento similares cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, siendo algo menores que el crecimiento de la cepa silvestre. Por otra parte, la cepa que expresaba el gen *IPP1* bajo el control del promotor del gen *MET25* presentaba unos niveles de actividad específica sPPasa significativamente superiores al resto, aunque su tasa de crecimiento en medio líquido con glucosa era similar al del resto de cepas (Figura 3.2.4A y B). Este dato sugiere que no existe una relación directa entre los niveles de expresión del gen *IPP1* y la tasa de crecimiento de los cultivos de levadura, mientras que sí es necesario que se dé un nivel mínimo de expresión para que el crecimiento se produzca. Los niveles de proteína *Ipp1p* detectados en *Western blot* muestran una buena correlación con los niveles de actividad específica sPPasa medidos en cada una de las cepas transformantes, siendo muy elevados en la que expresa el gen *IPP1* bajo el control del promotor del gen *MET25* e inexistente tanto en la cepa control YPC3 como en la cepa transformante *pIpp1* $\Delta 157$ pb (Figura 3.2.3C). No se observaron diferencias significativas ni en los niveles de proteína *Ipp1p*, ni en los de actividad específica sPPasa de las cepas transformantes *pIpp1* 900 pb y *pIpp1* 350 pb con respecto a la cepa control

W303-1a, siendo esto lo esperado al estar la expresión del gen *IPPI* controlada en estas cepas por secuenciaa del mismo promotor que en la cepa silvestre.

A la vista de los resultados de este trabajo en su conjunto, podemos deducir que no existen diferencias apreciables en la expresión del gen *IPPI* bajo el control de secuencias promotoras homologas de 900 pb o de 350 pb de longitud, y que los componentes esemciales para la expresión del gen se encuentran localizados en las 157 pb inmediateamente adyacentes aguas arriba del propio gen *IPPI*.

3.3 Implicaciones funcionales de variaciones inducidas en la distribución núcleo-citoplásmica de la sPPasa Ipp1p de *Saccharomyces cerevisiae*

La regulación del transporte bidireccional entre el citoplasma y el núcleo es crucial para la supervivencia de los organismos eucariotas. El transporte de proteínas de más de 40 kDa se produce de forma activa a través de los complejos de poro nuclear (NPCs) en un proceso mediado por proteínas importadoras (importinas) o exportadoras (exportinas). Las importinas reconocen secuencias de importación específicas (*nuclear localization signal*, NLS) en las proteínas que van a ingresar al núcleo y median la unión entre ellas y los NPCs, permitiendo que accedan al lumen nuclear (Kalderon, Richardson et al. 1984).

Gracias a trabajos previos del grupo (Serrano-Bueno, 2012), sabemos que la sPPasa mayoritaria de *S. cerevisiae* (Ipp1p) presenta una distribución núcleo-citoplásmica, aunque los niveles tanto de proteína como de actividad catalítica son menores en el núcleo debido a una estricta regulación de los niveles de Ipp1p nuclear por degradación proteica. Además se demostró que la presencia de secuencias NES (*nuclear exclusion signal*) o NLS heterólogas en la secuencia de la sPPasa alteraban drásticamente su distribución subcelular. En este trabajo se profundiza en el mecanismo que permite la adecuada distribución núcleo-citoplásmica de esta proteína e intentamos desvelar el efecto que tiene la alteración de su distribución en la fisiología del microorganismo. Mediante alineamientos de secuencias con sPPasas de otros organismos, tanto eucariotas como procariotas, hemos identificado una región rica en aminoácidos básicos (74-KKGKLR-79) en la secuencia de Ipp1p que podría ser una señal de localización nuclear NLS endógena (NLSe) de esta proteína. Esta secuencia se encuentra altamente conservada entre las sPPasas de los organismos eucariotas (Figura 3.3.1A), mientras que está ausente en las sPPasas de procariotas. Además, mediante análisis de la estructura tridimensional homodimérica de Ipp1p (Figura 3.3.1B) se puede observar que la posible secuencia NLSe se encuentra expuesta al medio en una zona superficial de la subunidad, lo cual permitiría su reconocimiento y unión a las importinas.

A

```

201  C C C A A T C A T C C A A G A C A C C A A G A A G G G C A A G T T G A G A T T T G T T A G A 247  IPP1
      |||||#####
201  C C C A A T C A T C C A A G A C A C C G C G C G G G C A A G T T G A G A T T T G T T A G A 247  ipp1-1
201  C C C A A T C A T C C A A G A C A C C A A G A A G G G C A A G T T G A G A T T T G T T A G A 247  IPP1
      |||||#####
201  C C C A A T C A T C C A A G A C A C T A G T -----A G A T T T G T T A G A 235  ipp1-ΔNLS
      SpeI
IPYR_YEAST      N P I I Q D T K K G K L R F V R N C F 85
IPYR_CANAL     N P I I Q D T K K G K L R F V R N C F 86
IPYR_EMENI     N P I K Q D T K K G K L R F V R N C F 85
IPYR_SCHPO     N P I K Q D T K K G K L R F V R N C F 86
IPYR_HUMAN     N P I K Q D V K K G K L R Y V A N L F 85
IPYR2_YEAST    N P I V Q D T K N G K L R F V N N I F 117
IPYR2_SCHPO    H P I K Q D L K N G K L R Y V A N S F 91
Q5BGD5_EMENI  N P I F H D E R D G S P R Y V E S V W 117
IPYR_ECOLI     G A L F V D -----R F M S T A M 50
Ipp1-1        N P I I Q D T A A G K L R F V R N C F 85
Ipp1ΔNLS      N P I I Q D T S -----R F V R N C F 81

```

B

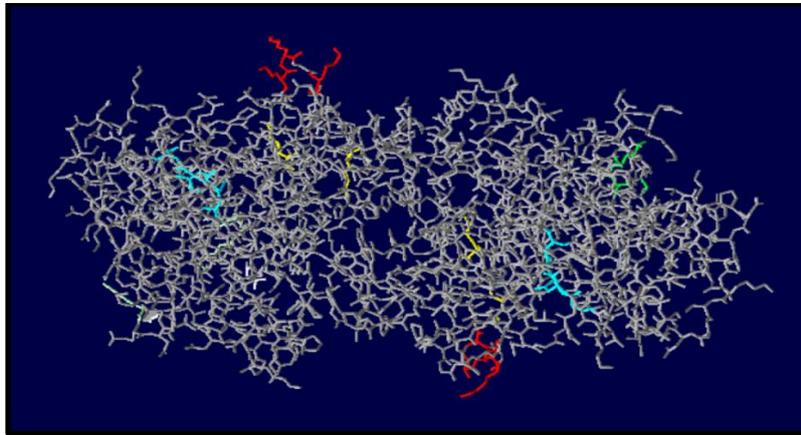


Figura 3.3.1: Alineamiento de las secuencias de distintas sPPasas de organismos procariontas y eucariotas en la región que contiene una secuencia consenso NLS y estructura del dímero de Ipp1p (estructura PDB 2IHP). **A)** Alineamiento de las secuencias de sPPasas. En amarillo se muestran residuos importantes para el funcionamiento catalítico de la sPPasa. En rojo se muestran las mutaciones de la NLS introducidas en los dos mutantes de Ipp1p generados en este trabajo. **B)** Localización de la posible región NLS 74-KKGKLR-79 en la estructura homodimérica de Ipp1p. En rojo se muestran los residuos de lisina de la posible señal NLS, otros residuos importantes para la actividad catalítica de la enzima se muestran en azul, verde y amarillo.

Para determinar el grado de incidencia de esta posible NLS endógena sobre la distribución subcelular de Ipp1p, se construyeron quimeras de Ipp1p con distintas mutaciones en esa región unidas a yEGFP por su extremo C-terminal (Figura 3.3.2). Todas estas quimeras tienen, al igual que la fusión con la sPPasa nativa Ipp1-GFP, una masa molecular de aprox. 60 kDa, por lo que no pueden pasar por difusión a través de los poros nucleares y necesitan ser transportadas por el sistema de importinas/exportinas, como se ha señalado anteriormente. En el mutante Ipp1-1 dos residuos contiguos de lisina (K74 y K75) se sustituyeron mediante mutagénesis dirigida por dos residuos de alanina,

mientras que en el Ipp1-3 se sustituyó además un tercer residuo de lisina (K77) por un residuo de alanina, y en el mutante por delección Ipp1- Δ NLSe se sustituyó casi toda la secuencia (6 residuos) de la señal NLSe endógena - excepto la última arginina- por un único residuo de serina (Figura 3.3.1A). Además se ha construido una quimera de Ipp1- Δ NLSe unida por su extremo C-terminal a una secuencia NES heteróloga de 11 residuos (LQLPPLERLTL; de la proteína Rev del virus HIV-1) y a la yEGFP; esta proteína Ipp1p quimérica debería tener una localización estrictamente citoplásmica. Para conseguir una distribución subcelular totalmente opuesta a esta, se ha construido una quimera de Ipp1p que contiene tres secuencias NLS heterólogas (7 residuos, PKKKRKV) consecutivas, del antígeno T del virus SV40, unidas a la yEGFP por su extremo C-terminal. Todas las construcciones quiméricas se introdujeron en el vector lanzadera de levadura pRS1024 y se utilizaron para transformar la cepa YPC3 de *S. cerevisiae*, la cual permite eliminar la expresión de la copia cromosómica del gen *IPP1* mediante el crecimiento de la levadura en medio con glucosa.

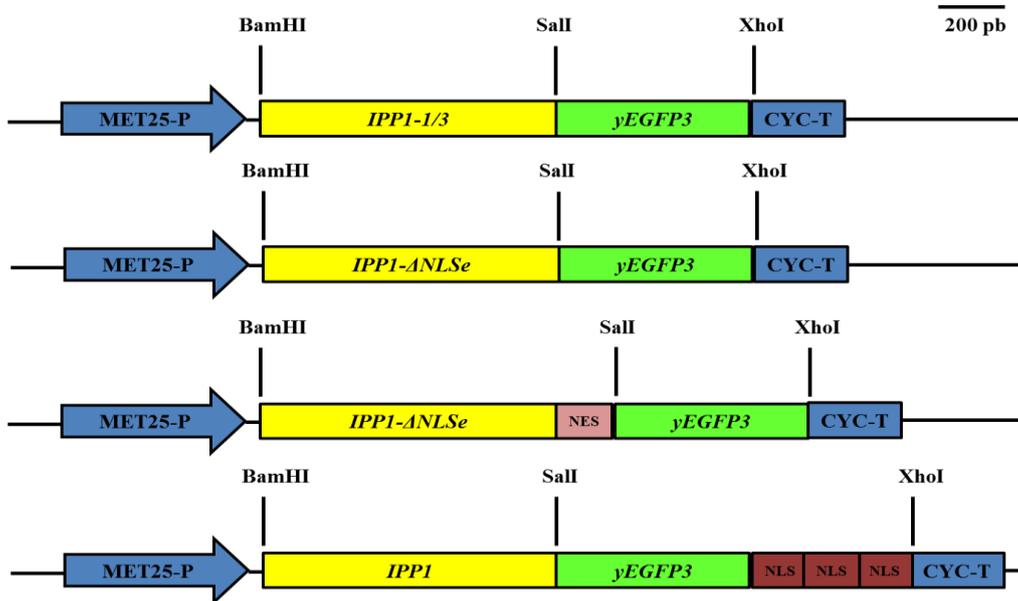


Figura 3.3.2: Construcciones quiméricas de Ipp1p con localización núcleo-citoplásmica modificada utilizadas en este trabajo. Leyenda; MET25-P: Promotor del gen *MET25*; *IPP1*: ORF del gen *IPP1* de *S. cerevisiae*; *IPP1-1/3*: ORF del gen *IPP1* de *S. cerevisiae* portando dos (Ipp1-1) o tres (Ipp1-3) mutaciones puntuales en la secuencia NLSe; *IPP1- Δ NLSe*: ORF del gen *IPP1* de *S. cerevisiae* en la que se ha eliminado por delección la secuencia NLSe; *yEGFP3*: ORF del gen *yEGFP3*; NES: Secuencia de exclusión nuclear heteróloga de la proteína Rev del virus HIV-1; NLS: Secuencia de localización nuclear heteróloga del antígeno T del virus SV-40; CYC-T: Terminador del gen *CYC1*. Se muestran los sitios de restricción utilizados en la construcción de las quimeras. Todas las construcciones quiméricas tienen un tamaño aproximado de 2 kb.

Resultados

Una vez obtenidas las cepas transformantes con estas construcciones, se procedió a observar las células al microscopio de fluorescencia para determinar la distribución subcelular de cada una de las variantes de Ipp1p. En la Figura 3.3.3 se puede observar la distribución núcleo-citoplásmica de la quimera de Ipp1-GFP nativa, y además se puede apreciar claramente la alteración de esta distribución en la cepa transformada que expresa la variante de Ipp1-GFP-3xNLS que contiene tres secuencias en tándem de la NLS del virus SV40, la cual se encuentra totalmente localizada en el interior del núcleo. Por el contrario, en la cepa que expresa la variante Ipp1- Δ NLSe-GFP carente de la señal endógena NLSe, se pueden observar unas zonas más oscuras en la fluorescencia verde que coinciden con el sitio que ocupa el núcleo celular, lo que sugiere una localización preferentemente citoplásmica. La técnica utilizada para la observación de las células no nos permitió obtener imágenes definitivas sobre la exclusión nuclear de esta versión de Ipp1p, por lo que fue necesario realizar otros experimentos que nos permitiesen confirmar este hecho.

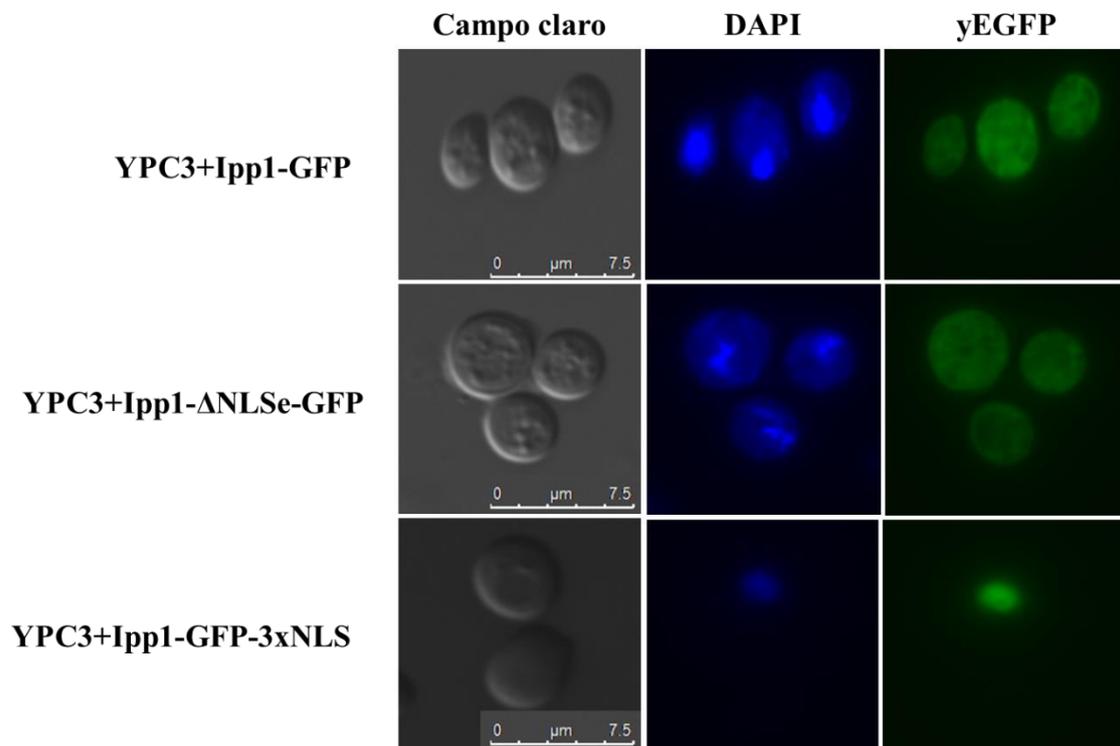


Figura 3.3.3: Imágenes de microscopía de fluorescencia de cepas de *S. cerevisiae* derivadas de YPC3 transformadas con construcciones quiméricas de Ipp1p que presentan diferentes distribuciones subcelulares.

Resultados

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento de todas las cepas en medio líquido selectivo con glucosa durante 25 h para comprobar si la distribución subcelular de la proteína Ipp1p afectaba al crecimiento de la levadura (Figura 3.3.4). La localización preferencial de Ipp1p en el citoplasma no produjo una alteración significativa de la tasa de crecimiento de los cultivos, muy similares al control W303-1a, ya que las cepas expresoras de versiones de Ipp1p que están excluidas del núcleo, ya sea por alteraciones en la señal NLSe (Ipp1-3-GFP, Ipp1- Δ NLSe-GFP), por exportación activa al contener una NES heteróloga (Ipp1-NES-GFP) o por ambos motivos (Ipp1- Δ NLSe-NES-GFP), crecieron a una tasa similar a la de la cepa control Ipp1-GFP e Ipp1-NES-GFP. Por el contrario, el confinamiento de la proteína Ipp1p en el núcleo celular produce una disminución significativa de las tasas de crecimiento de los cultivos (Ipp1-GFP-NLS, Ipp1-GFP-3xNLS). Esto podría ser debido a un aumento de los niveles de PPI en el citoplasma producido por la importante disminución de los niveles celulares de Ipp1p que se produce en estas cepas, lo cual altera el anabolismo celular (véase más adelante).

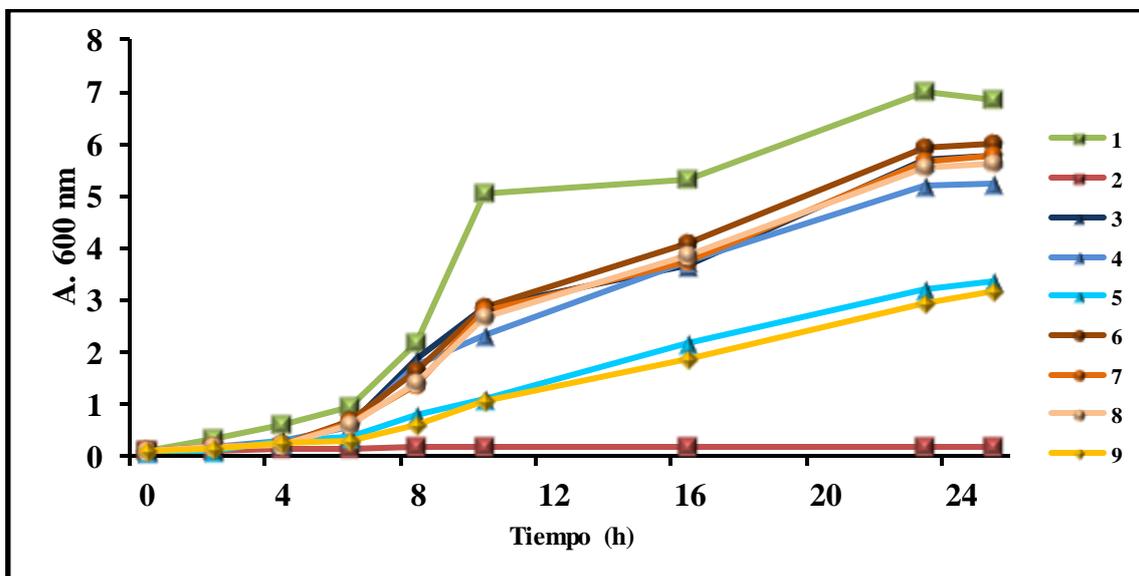


Figura 3.3.4: Curvas de crecimiento de cepas de *S. cerevisiae* derivadas de YPC3 transformadas con construcciones quiméricas de Ipp1p con diferentes distribuciones subcelulares. 1) W3031-a, usada como control; 2) YPC3, usada como control negativo; 3) Ipp1-GFP; 4) Ipp1-NES-GFP; 5) Ipp1-GFP-NLS; 6) Ipp1-3-GFP; 7) Ipp1- Δ NLSe-GFP; 8) Ipp1- Δ NLSe-NES-GFP; 9) Ipp1-GFP-3xNLS.

Gracias a trabajos previos del grupo (Serrano-Bueno, 2012), sabemos que la cepa de *S. cerevisiae* que expresa una construcción quimérica de Ipp1p que contiene una secuencia NLS heteróloga del virus SV40 (Ipp1-GFP-NLS) presenta unos valores de actividad sPPasa específica en extractos celulares totales claramente menores que la cepa transformada con la versión nativa de Ipp1p unida a GFP (Ipp1-GFP), debido a que se produce una mayor degradación de esta Ipp1p quimérica por el proteasoma nuclear. Por tanto, la localización nuclear preferencial inestabiliza a la sPPasa. En las cepas transformadas con la versión de Ipp1p-GFP unida a una secuencia NES (Ipp1p-NES-GFP) ocurre lo contrario, los niveles de actividad sPPasa específica en extractos celulares son mayores que en las otras cepas transformantes. Con estos datos en mente, procedimos a obtener extractos celulares totales de las distintas cepas YPC3 crecidas en medio con glucosa, y determinamos la actividad sPPasa específica en todos ellos.

Las cepas expresoras de las quimeras mutantes Ipp1-1 e Ipp1-3 mostraron unos niveles de actividad específica sPPasa en extractos celulares totales similares a los de la cepa expresora de la quimera nativa control Ipp1-GFP, lo cual indica que las mutaciones puntuales de residuos básicos de la región NLSe no es suficiente para conseguir la exclusión de Ipp1p del núcleo celular (Figura 3.3.5A). Sin embargo, tanto la cepa expresora de la quimera Ipp1- Δ NLSe-GFP como la de Ipp1- Δ NLSe-NES-GFP mostraron niveles de actividad específica sPPasa significativamente superiores al de la quimera control Ipp1-GFP y prácticamente iguales a los de la quimera Ipp1-NES-GFP; además la cepa Ipp1- Δ NLSe-NES-GFP muestra niveles de actividad sPPasa ligeramente superiores los de la cepa Ipp1- Δ NLSe-GFP. Todos estos datos nos indican que la eliminación de la secuencia NLSe produce una exclusión de la proteína Ipp1p del núcleo celular, aunque esta exclusión no llega a ser total, y sugieren que esta secuencia actúa como una auténtica *bona fide* NLS que debe participar en el transporte núcleo-citoplásmico de Ipp1p. La cepa expresora de la quimera Ipp1-GFP-3xNLS muestra unos niveles de actividad sPPasa significativamente inferiores a los que presenta la cepa expresora de la quimera Ipp1-GFP y ligeramente inferiores a los que muestra la expresora de la quimera

Ipp1-GFP-NLS, lo que indica que se ha conseguido un alto grado de confinamiento de la proteína Ipp1p en el interior del núcleo celular.

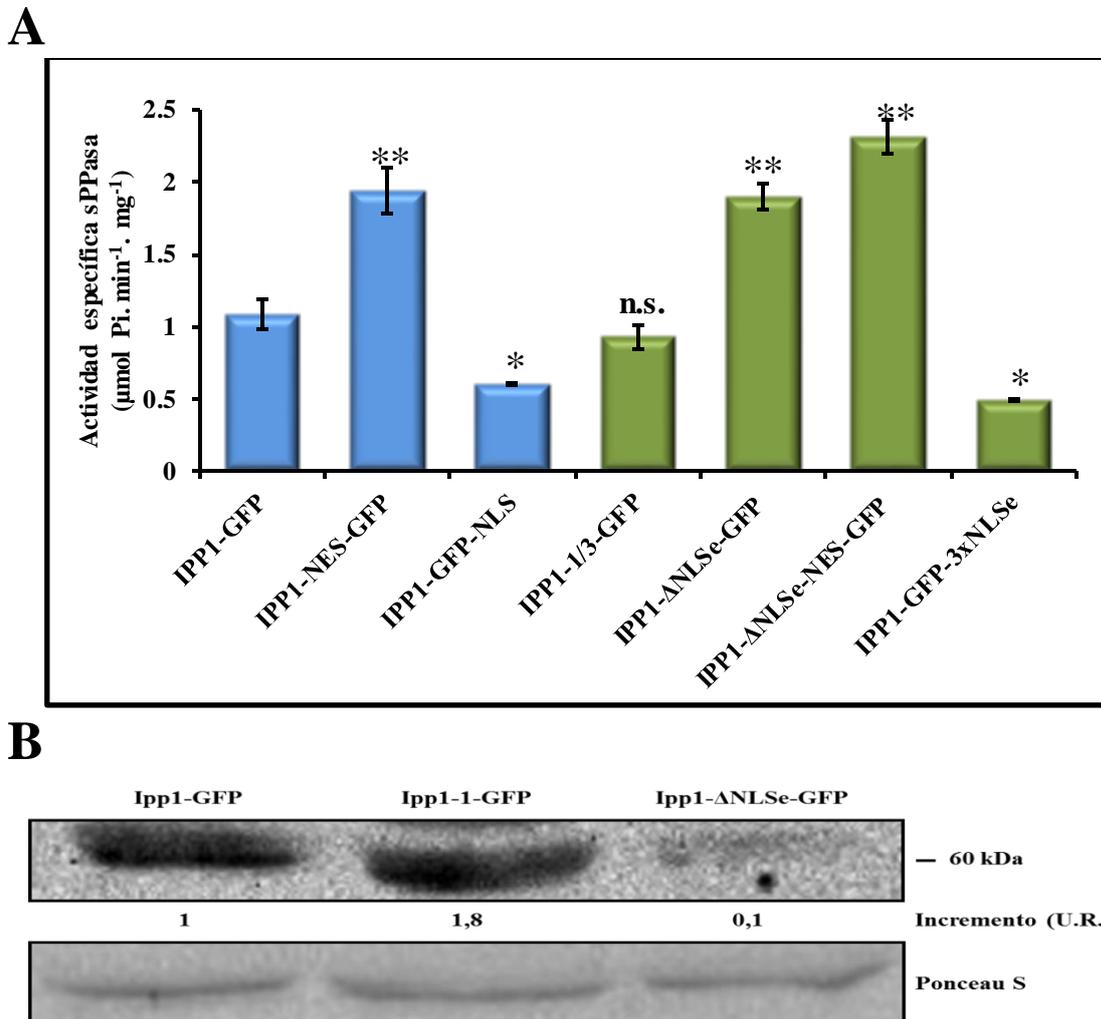


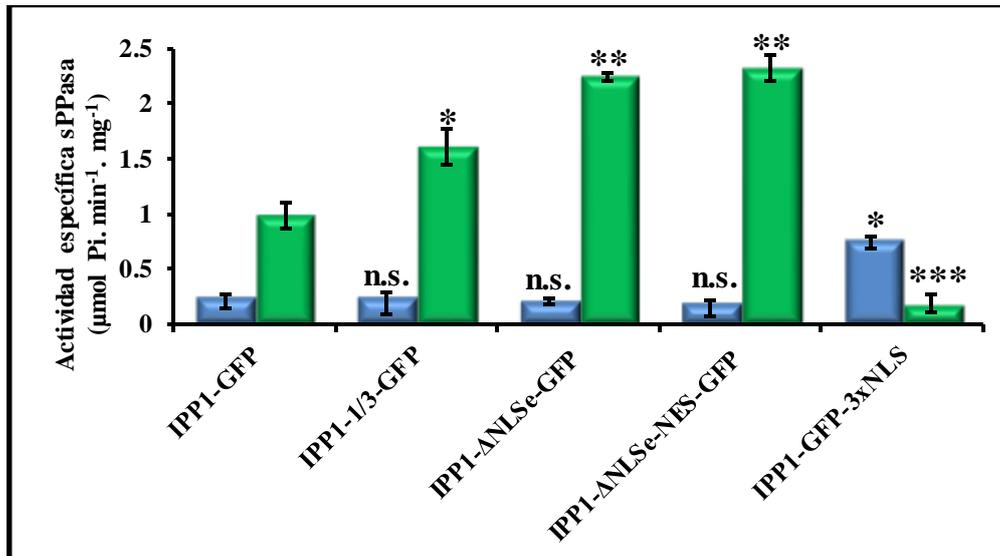
Figura 3.3.5: Niveles de proteína y de actividad específica sPPasa en los extractos celulares de las cepas YPC3 de *S. cerevisiae* transformadas con las distintas versiones de Ipp1p. A) Niveles de actividad específica sPPasa. En azul se muestran los valores de actividad sPPasas de las cepas control y en verde los de las cepas obtenidas en este trabajo. B) Niveles de polipéptidos de las quimeras Ipp1p en las cepas con la distribución núcleo-citoplásmica más extrema esperable de Ipp1p y de la cepa control expresora de la quimera nativa Ipp1-GFP, determinados por *Western-blot* con un anticuerpo comercial anti-GFP. Se aplicó aprox. 50 µg de proteína por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de la calle correspondiente usada como control de carga. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001; n.s., no significativo).

Se sometieron las diferentes cepas transformantes a fraccionamiento subcelular junto a la cepa control expresora de la quimera Ipp1-GFP, para separar la fracción citoplásmica de proteínas solubles de la correspondiente fracción nuclear. Una vez realizado el aislamiento, se procedió a medir los niveles de actividad específica y los niveles de polipéptido de Ipp1p en cada una de las fracciones. A pesar de que no se observaron mayores niveles de

actividad sPPasa en los extractos celulares totales de las cepas expresoras de las quimeras mutantes de NLSe Ipp1-1-GFP e Ipp1-3-GFP (Figura 3.3.6A), los resultados obtenidos tras el fraccionamiento subcelular muestran en los dos casos mayores niveles de actividad que en la fracción citosólica de la cepa control expresora de Ipp1-GFP. Sin embargo, presentaron niveles semejantes a la cepa control en las fracciones nucleares. Por otra parte, las cepas expresoras de las quimeras carentes de NLSe Ipp1- Δ NLSe-GFP e Ipp1- Δ NLSe-NES-GFP presentaron niveles de actividad específica sPPasa similares en sus fracciones citoplásmicas, los cuales fueron significativamente mayores que los determinados en las cepas expresoras de las quimeras Ipp1-1/3-GFP y la control Ipp1-GFP. Además, los niveles de actividad en las fracciones nucleares eran ligeramente inferiores en estas cepas que en la expresora de la quimera control, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa en ningún caso. Por último, los niveles de actividad sPPasa en la fracción citoplásmica de la cepa expresora de Ipp1-GFP-3xNLS eran mucho menores que los de la fracción citosólica de la cepa expresora de la quimera control, mientras que los niveles de actividad en la fracción nuclear fueron significativamente mayores que en el resto de las cepas. Como ya se ha dicho, los niveles de actividad sPPasa de ambas fracciones eran mucho menores en esta cepa -en la que se esperaría el máximo grado de confinamiento nuclear de Ipp1p- que los del resto de cepas. Tanto la cepa expresora de la quimera Ipp1-1-GFP como la de Ipp1- Δ NLSe-GFP presentaron mayores niveles de la Ipp1p quimérica en su fracción citoplásmica que la cepa control expresora de Ipp1-GFP. En cuanto a la fracción nuclear, la cepa control presentó los niveles más altos de los polipéptidos de las sPPasas quiméricas, mientras que estos fueron prácticamente indetectables en la cepa expresora de Ipp1- Δ NLSe-GFP (Figura 3.3.6B).

En conjunto, todos estos resultados indican que la estabilidad de la proteína Ipp1p depende en gran medida de su distribución núcleo-citoplásmica, y que una localización nuclear la desestabiliza mientras que una localización citoplásmica la estabiliza.

A



B

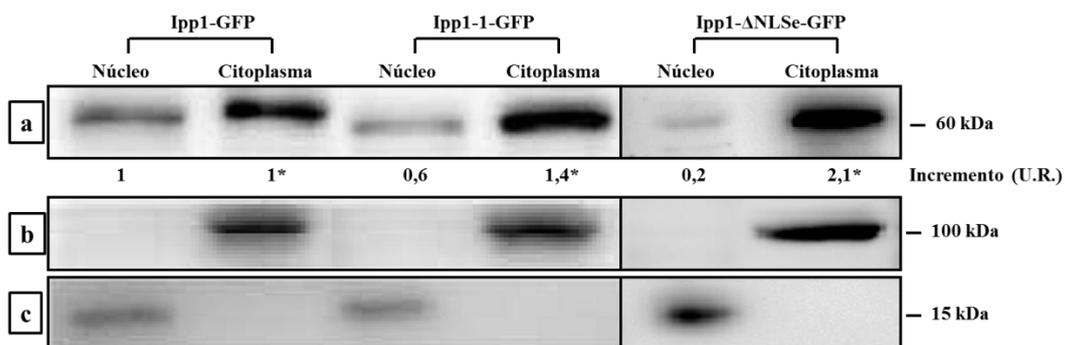
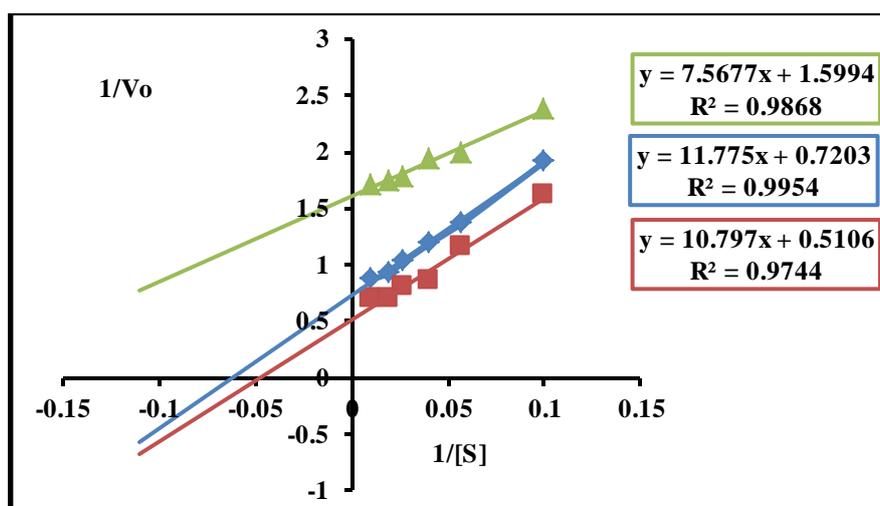


Figura 3.3.6: Medidas de actividad específica sPPasa y niveles de polipéptidos de las distintas quimeras Ipp1p en las fracciones nucleares y citoplásmicas de cepas YPC3 de *S. cerevisiae* transformadas con las construcciones génicas generadas en este trabajo. A) Niveles de actividad específica sPPasa en los extractos de proteínas solubles de las diferentes fracciones subcelulares. Barras azules: fracción nuclear; Barras verdes: fracción citoplásmica. **B)** Niveles de polipéptidos de las quimeras Ipp1p en las mismas fracciones subcelulares determinados por *Western-blot* con un anticuerpo comercial anti-GFP. Se aplicó aprox. 50 µg de proteína por calle. También se muestran los niveles de los polipéptidos de la hexoquinasa HK1 y de la histona H3, determinados por *Western blot* y usados como control del grado de purificación de las fracciones y como control de carga. a) Anti-GFP; b) Anti-Hexoquinasa HK1; c) Anti-Histona H3. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; n.s., no significativo).

Se seleccionaron las quimeras Ipp1-ΔNLSe-GFP e Ipp1-GFP-3xNLS para analizar las constantes catalíticas y parámetros cinéticos de estas variantes quiméricas de Ipp1p, en comparación con las de la quimera control Ipp1-GFP. Para ello se realizaron medidas de actividad de cada una de ellas variando la concentración de sustrato en el ensayo, considerando como sustrato real de la enzima el complejo molecular Mg₂PPi.

A



B

Quimera	K_m (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol P. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	E.C.
Ipp1-GFP	16,35	1,39	85
Ipp1- ΔNLSe -GFP	21,15	1,96	93
Ipp1-GFP-3xNLS	4,73	0,625	132

Figura 3.3.7: Análisis de los parámetros cinéticos de las quimeras de Ipp1 con distinta localización subcelular. A) Representación de dobles de inversión de la velocidad catalítica de la enzima frente a la concentración de sustrato. Línea verde: Ipp1-GFP-3xNLS; Línea azul: Ipp1-GFP; Línea roja: Ipp1- ΔNLSe -GFP B) Tabla con los parámetros cinéticos de las distintas quimeras de Ipp1p. E.C.: eficiencia catalítica, V_{\max}/K_m .

La quimera Ipp1- ΔNLSe -GFP aumentó tanto su K_m como V_{\max} con respecto a la quimera nativa Ipp1-GFP usada como control, mientras que la quimera Ipp1-GFP-3xNLS disminuyó ambos parámetros con respecto a la quimera control. Sin embargo la modificación de estos parámetros fue proporcional y no afectó significativamente a la eficiencia catalítica (E.C., V_{\max}/K_m) de las quimeras, por lo que se puede decir que las modificaciones estructurales introducidas en las quimeras de Ipp1p no afectan significativamente a la actividad catalítica de las mismas, y los cambios observados se deben esencialmente a la diferente localización subcelular y consiguiente desigual degradación de las quimeras (Figura 3.3.7).

Los bajos niveles de Ipp1p observados en las fracciones nucleares de todas las cepas de levadura estudiadas nos llevaron a pensar que debe existir

una estricta regulación de los niveles de esta proteína en el compartimento nuclear. Estos resultados sugieren que la exclusión o el confinamiento nuclear alteran la estabilidad de Ipp1p, por lo cual pensamos que esta proteína puede estar regulada a nivel celular principalmente mediante degradación por el proteasoma nuclear. La degradación proteica en los eucariotas depende de la ubiquitinación de los polipéptidos (Ravid and Hochstrasser 2008), por lo que Ipp1p debería ser ubiquitinada como paso previo a su degradación. Para analizar si la distribución subcelular de Ipp1p afecta a su ubiquitinización, se purificaron quimeras de Ipp1p con distinta distribución subcelular mediante inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-GFP a partir de extractos celulares de las correspondientes cepas YPC3 transformantes y se estudió su grado de ubiquitinización mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-ubiquitina. Todas las quimeras de Ipp1p mostraron ubiquitinización (Figura 3.3.9A), sin embargo, la quimera Ipp1-GFP-NLS, con distribución preferentemente nuclear, e Ipp1-NES-GFP, con distribución preferentemente citosólica, mostraron mayores y menores niveles de ubiquitinización que la quimera control, respectivamente.

Se analizó el efecto del tratamiento de los cultivos con el inhibidor del proteasoma MG132, un tripeptidil-aldehído que se une al sitio activo del proteasoma 26S (Gaczynska and Osmulski 2005), sobre los niveles de actividad específica y polipéptidos Ipp1p-GFP en extractos celulares totales de cepas YPC3 transformantes expresoras de las quimeras de Ipp1p con distinta distribución núcleo-citoplásmica. Mientras que se observaron incrementos evidentes tanto en los niveles de actividad sPPasa como de polipéptido en la cepa expresora de la quimera Ipp1-GFP-NLS localizada en el núcleo celular, solo se observaron incrementos moderados en el caso de la expresora de la quimera Ipp1p nativa y en el control W303-1a, mientras que la que expresaba la quimera Ipp1-NES-GFP localizada en el citosol no mostró cambios significativos por el tratamiento (Figura 3.3.8). Estos datos indican que las quimeras Ipp1p de localización nuclear deben sufrir degradación por el proteasoma, en mayor grado la confinada en el núcleo, la cual no ocurre en el caso de la quimera localizada preferentemente en el citosol.

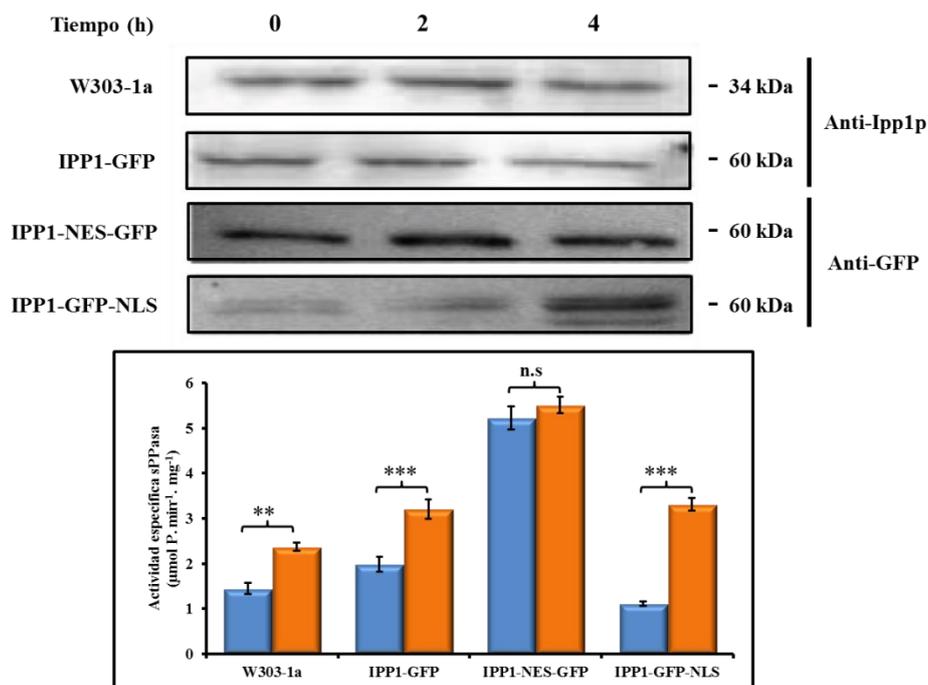


Figura 3.3.8: Efecto diferencial del inhibidor del proteasoma MG132 sobre las quimeras de Ipp1p con distinta distribución núcleo-citoplasmática, en función de su localización subcelular. Los niveles de polipéptido se determinaron por *Western blot* tras separación en geles SDS-PAGE de los extractos solubles totales de cepas YPC3 transformantes, cultivadas en YPD y tratadas con 20 μM MG132 durante 0, 2 y 4 h. Se aplicaron aprox. 50 μg de proteína por calle, y se usaron anticuerpos anti-GFP o anti-Ipp1p como se indica. También se analizó la actividad específica sPPasa de los extractos a tiempo cero (barras azules) y tras 4 h de tratamiento de los cultivos con MG132 (barras naranjas). Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; n.s., no significativo).

La deubiquitinasa Ubp3p es una proteasa de levadura que interacciona con las proteínas ubiquitinizadas para dirigirlas al proteasoma 26S y promueve la deubiquitinización de las mismas, facilitando su degradación proteasomal (Mao and Smerdon 2010). Para analizar si existe interacción física entre esta proteasa y la Ipp1p ubiquitinizada, se llevó a cabo un estudio de co-inmunoprecipitación usando una quimera de Ubp3p fusionada con la secuencia marcadora HA y las quimeras de Ipp1p con distinta localización subcelular, Ipp1-NES-GFP e Ipp1-GFP-NLS. Se comprobó que Ubp3p co-inmunoprecipitaba con la quimera control núcleo-citosólica Ipp1-GFP y con la quimera Ipp1-GFP-NLS localizada preferentemente en el núcleo, mientras que no se observó co-inmunoprecipitación con la quimera Ipp1-NES-GFP que es excluida del núcleo (Figura 3.3.9B). Este resultado sugiere una interacción física directa entre Ipp1p y la ubiquitin-proteasa Ubp3p, un componente del proteasoma.

En conjunto, estos resultados indican que existe una regulación de los niveles de Ipp1p en el núcleo celular mediada por la degradación específica de esta proteína a través del sistema ubiquitina-proteasoma nuclear.

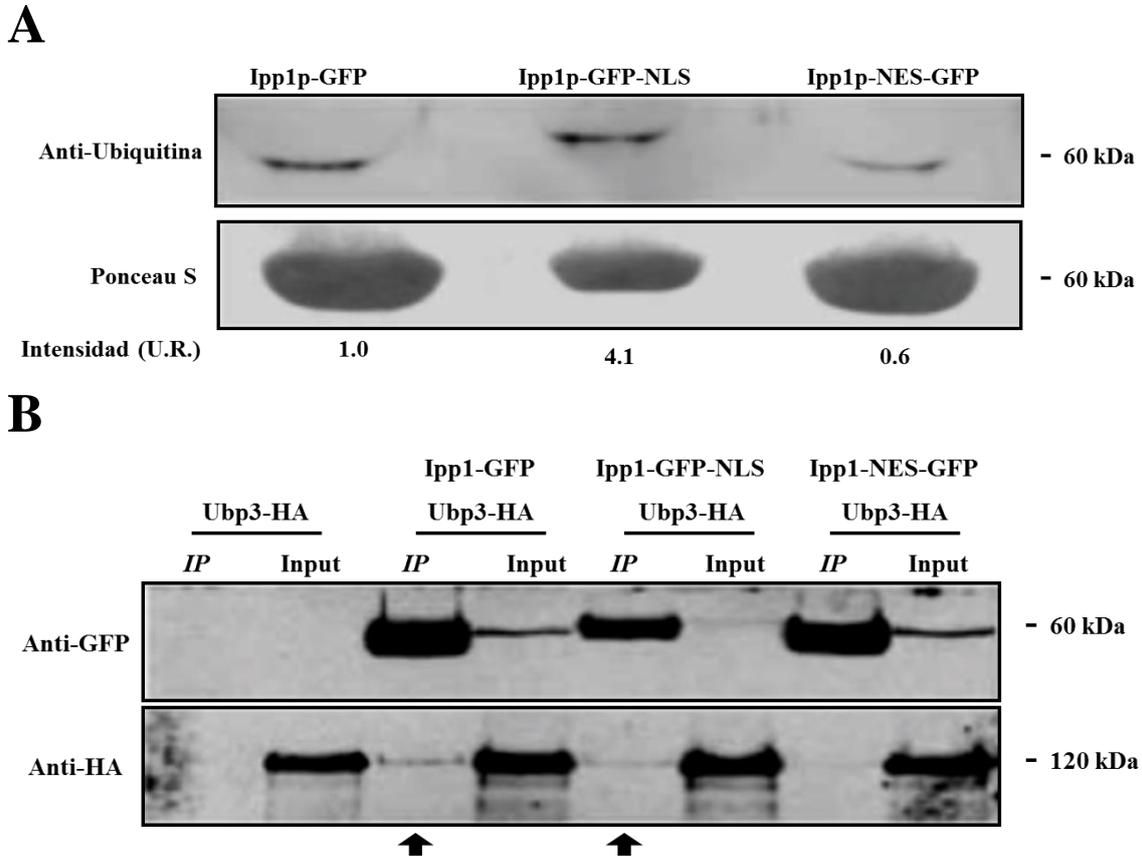


Figura 3.3.9: Interacción entre Ipp1p y los componentes del sistema de degradación proteasomal Ubiquitina y Ubp3p. **A)** Análisis mediante *Western blot* de preparaciones inmunopurificadas de quimeras de Ipp1p, que muestra diferentes grados de ubiquitinización de Ipp1p en función de su localización núcleo-citoplásmica. Se usaron las bandas de Ipp1p teñidas con Ponceau S como control de carga para la cuantificación de la señal de ubiquitina. **B)** Co-inmunoprecipitación de las quimeras de Ipp1p y Ubp3p mediante un anticuerpo anti-GFP y análisis por *Western blot* de los inmunoprecipitados con los anticuerpos indicados. Input: Extractos solubles totales; IP: Inmunoprecipitados. Las flechas indican las bandas de Ubp3p asociada a las quimeras de Ipp1p de localización nuclear.

3.4 Reproducción del escenario metabólico del PPi de células vegetales utilizando *S. cerevisiae* como sistema modelo eucariótico

Las pirofosfatasas de membrana translocadoras de iones son un tipo de transportadores primarios que constituyen una diferencia clave entre plantas y hongos. En estos últimos, al igual que en células animales, el PPi se hidroliza muy eficientemente a ortofosfato mediante la acción de las sPPasas y la energía del enlace fosfoanhídrido es liberada en forma de calor. Por otra parte, en células vegetales y otros organismos, las pirofosfatasas translocadoras de iones (H^+ , Na^+) acoplan la hidrólisis del PPi al transporte de iones a través de membranas biológicas.

En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres genes que codifican H^+ -PPasas: *AVP1*, que codifica una H^+ -PPasa dependiente de K^+ , *AVP2* y *AVP3*, los cuales codifican dos H^+ -PPasas independientes de K^+ . La expresión de cada uno de estos genes es variable en los distintos tejidos y estadios de desarrollo de la planta, por lo que su importancia para la viabilidad del organismo es diferente, siendo *AVP1* la mPPasa más abundante. Además de las mPPasas mencionadas, este organismo cuenta con hasta 6 genes (*AtPPA1-6*) que codifican sPPasas de Familia I, siendo el mejor caracterizado *AtPP6* que codifica una sPPasa cloroplástica mayoritaria muy similar a la proteína *Ipp1p* de *S. cerevisiae* (Weiner, Stitt et al. 1987). La presencia de todas estas enzimas con actividad catalítica redundante es un claro signo de que el metabolismo del PPi en estos organismos es muy complejo y, por lo tanto, debe estar altamente regulado.

En todos los eucariotas existe un amplio grupo de transportadores de iones capaces de generar un gradiente de protones a través de las membranas biológicas utilizando la energía de hidrólisis del ATP (ATPasas). En las células vegetales estos transportadores comparten localización subcelular con las H^+ -PPasas, apareciendo en vacuolas, lisosomas, ER, aparato de Golgi y endosomas (Segami, Nakanishi et al. 2010; Segami, Makino et al. 2014). El papel que juega la presencia de estas dos categorías de transportadores de iones aparentemente redundantes en las células vegetales no está claro y está siendo

objeto de numerosos estudios, aunque se ha propuesto que está relacionado con la resistencia a estrés ambiental (Atwell, Greenway et al. 2015).

3.4.1 Estudio funcional de la mPPasa AVP1 en levaduras con la distribución subcelular de Ipp1p alterada

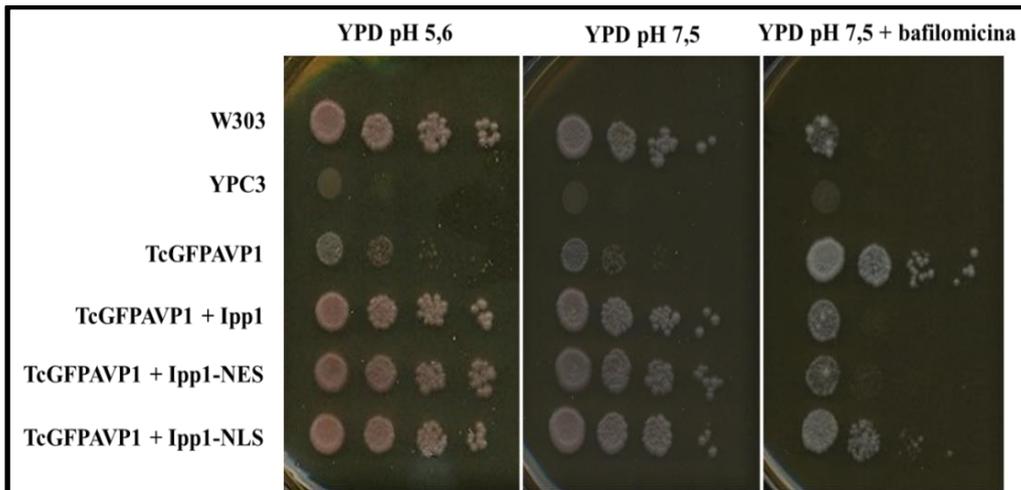
En el año 2002, nuestro grupo demostró la competencia de AVP1 para complementar funcionalmente la deficiencia en Ipp1p del mutante YPC3 de levaduras (Pérez-Castiñeira, López-Marqués et al. 2002). En trabajos posteriores de nuestro grupo se analizó el efecto de la manipulación de la secuencia N-terminal de AVP1 sobre su localización subcelular y su eficiencia funcional, empleando secuencias N-terminales de distintos organismos (Drake, Serrano et al. 2010). El N-terminal de AVP1 se sustituyó por el N-terminal de la H⁺-PPasa de *Trypanosoma cruzi*, que actúa como un péptido señal (SCOTT, Shuhong et al. 2000), capaz de alterar la localización subcelular de AVP1 haciendo que se localice preferentemente en las membranas internas de la levadura. De esta forma disponemos de una herramienta para reproducir el escenario metabólico del PPI de los vegetales en un eucariota no fotosintético, un hongo en este caso, que se puede usar como modelo para posteriores estudios. En uno de ellos, se utilizó la construcción descrita anteriormente, a la que se añadió la ORF del gen *yEGFP3* entre el N-terminal de *T. cruzi* y la ORF de *AVP1* (TcGFP_{AVP1}), para lograr la complementación funcional de la V-ATPasa de levadura por una H⁺-PPasa vegetal, demostrándose así por primera vez de forma directa la equivalencia funcional de ambas bombas de protones (Pérez-Castiñeira, Hernández et al. 2011). Sin embargo, esta complementación no era posible si se expresaban simultáneamente Ipp1p y TcGFP_{AVP1}, debido a las diferencias en su afinidad por el sustrato (PPI). Mientras que Ipp1p presenta una K_M de 1,3 μ M (Salminen, Parfenyev et al. 2002), la mPPasa AVP1 tiene una K_M considerablemente mayor, de 130 μ M (Maeshima and Yoshida 1989). A la vista de estos datos, se puede conjeturar que la coexistencia de ambas actividades es incompatible debido a que el alto consumo de PPI por parte de Ipp1p no dejaría sustrato disponible para AVP1, impidiendo así que produzca acidificación vacuolar y, por tanto, la complementación funcional de la V-

ATPasa. Sin embargo, esta complementación sería posible en caso de estar la sPPasa confinada en el interior de algún orgánulo celular (núcleo, vacuola, Golgi...)

En este trabajo, se ha querido confirmar este último supuesto mediante el confinamiento subcelular de Ipp1p en el núcleo celular. Para ello, se co-transformó YPC3 con la construcción TcGFP AVP1 (o más brevemente TGA) y con distintas versiones quiméricas de Ipp1p presentaban una distribución núcleo-citosólica alterada (Serrano-Bueno 2012 Tesis Doctoral). De esta forma se obtuvieron cepas transformantes que expresaban AVP1 en la membrana vacuolar y variantes de Ipp1p con distribución núcleo-citoplásmica nativa (Ipp1p-GFP), o bien confinados en el citoplasma (Ipp1p-GFP-NES) o en el núcleo celular (Ipp1p-GFP-NLS). Las cepas transformantes se cultivaron en medio complejo con glucosa (YPD) y se realizó un ensayo de goteo en placa para estudiar su crecimiento en condiciones control (YPD pH 5,6; y pH 7,5, medio selectivo) y en condiciones de inhibición química de la V-ATPasa (YPD pH 7,5 + bafilomicina A1 2 μ M). También se llevaron a cabo curvas de crecimiento de cada transformante en medio líquido, tanto en condiciones control como en condiciones de inhibición química de la V-ATPasa.

Como se puede observar en la figura 3.4.1, la construcción TcGFP AVP1 sólo pudo complementar eficientemente la deficiencia de V-ATPasa cuando se expresó sola o cuando se co-expresó con la quimera de localización nuclear Ipp1-NLS, pero fue incapaz de hacerlo cuando se co-expresó con cualquiera de las quimeras de Ipp1p que están presentes en el citosol en niveles significativos.

A



B

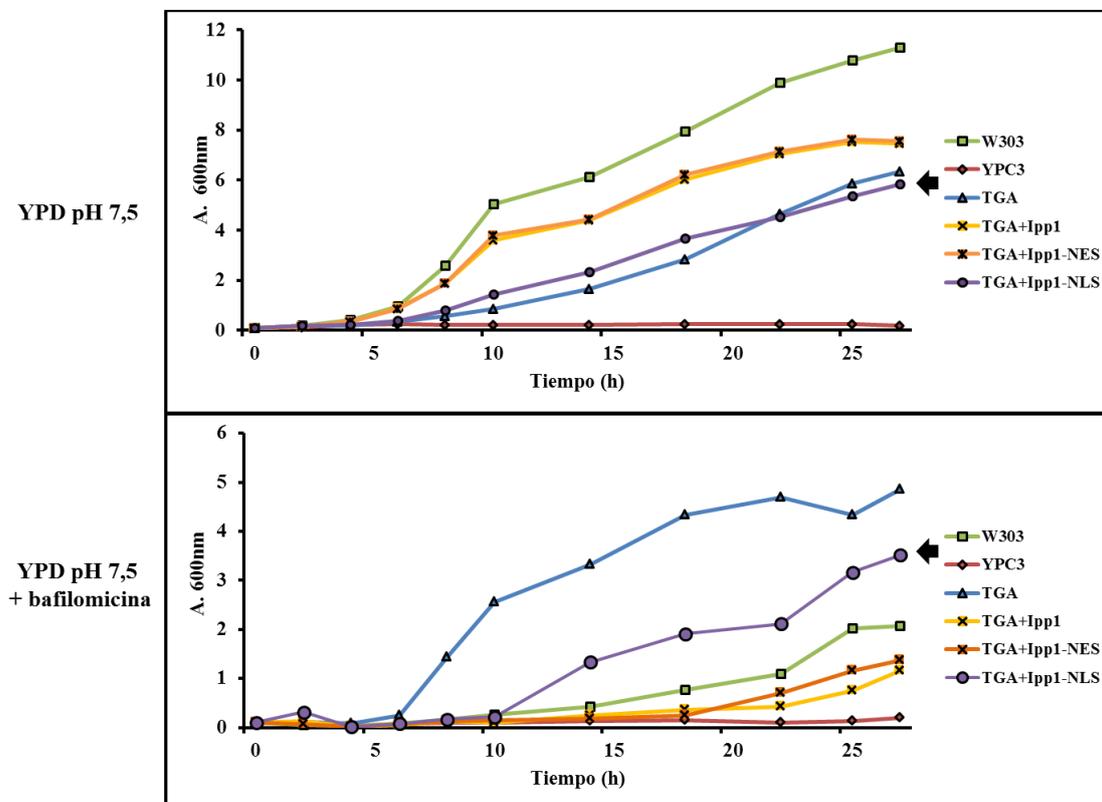


Figura 3.4.1: Complementación funcional en levadura de la deficiencia en V-ATPasa por una H^+ -PPasa quimérica vegetal (TcGFPAVP1) co-expresada con variantes quiméricas de Ipp1p con diferente localización núcleo-citoplásmica. A) Crecimiento de las cepas transformantes en los medios control (pH 5,6; pH 7,5) y selectivo (pH 7,5 + Bafilomicina). Se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en agua estéril y, posteriormente, se sembraron 2,5 μ l de cada una de ellas sobre placas con glucosa o galactosa, correspondientes (de izquierda a derecha) a 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 células respectivamente. B) Curvas de crecimiento en medio líquido de la estirpe de *S. cerevisiae* W303-1a y una serie de transformantes de su derivada YPC3 co-expresoras de TcGFPAVP1 y diversas quimeras de Ipp1p con su localización subcelular alterada. El crecimiento se determinó por la densidad óptica del cultivo a 600 nm.

Se obtuvieron las fracciones de proteínas solubles y de membrana de las diferentes cepas transformantes cultivadas en medio selectivo con glucosa y se determinó la actividad específica PPasa, tanto soluble como asociada a membranas, respectivamente. También se llevaron a cabo medidas de actividad de bombeo de protones con las preparaciones de membranas de todas las cepas, utilizando ACMA como marcador fluorescente. El nivel de actividad específica sPPasa en la fracción soluble aumentó en el caso de la cepa TGA+IPP1-NES y disminuyó en la cepa TGA+IPP1-NLS, en comparación con la cepa control TGA+IPP1, lo cual concuerda con la distribución nucleo-citoplásmica esperable de Ipp1p en cada una de ellas (Figura 3.4.2A). La cepa control TGA solo mostró valores residuales de actividad PPasa en su fracción soluble. Esto indica que la presencia de una H⁺-PPasa no afecta a los niveles de expresión de la sPPasa Ipp1p, sea cual sea su localización subcelular. Para la actividad PPasa de membrana, se analizó por separado la actividad dependiente de K⁺, producida por la H⁺-PPasa específicamente, y la actividad independiente de K⁺ (Figura 3.4.2B). Lo primero que se apreció es que las fracciones de membrana de las cepas que presentan altos niveles de Ipp1p en el citoplasma tenían asimismo niveles de actividad PPasa independiente de K⁺ significativamente mayores que el resto de cepas, no presentando además inducción de la actividad PPasa en presencia de K⁺. Esto puede deberse a la actividad de una parte de las moléculas de Ipp1p que habrían quedado adheridas a las membranas, o retenidas en microvesículas. Tanto la cepa control TGA, como la cepa TGA+IPP1-NLS presentaron una actividad PPasa en sus fracciones de membrana claramente inducibles por la presencia de K⁺, siendo la actividad independiente de K⁺ mayor en la segunda cepa. Esto sugiere que existe una cantidad residual de Ipp1p que no se ha compartimentalizado en el núcleo y ha quedado adherida a las membranas durante el procesamiento de las mismas. Por último, las medidas de actividad de bombeo de protones muestran que esta sólo se produce en la cepa control TGA y en la cepa TGA+IPP1-NLS, demostrando así que son capaces de transportar protones de manera eficiente a través de membranas biológicas y, en consecuencia, de acidificar los espacios luminales de los orgánulos subcelulares (Figura 3.4.2C).

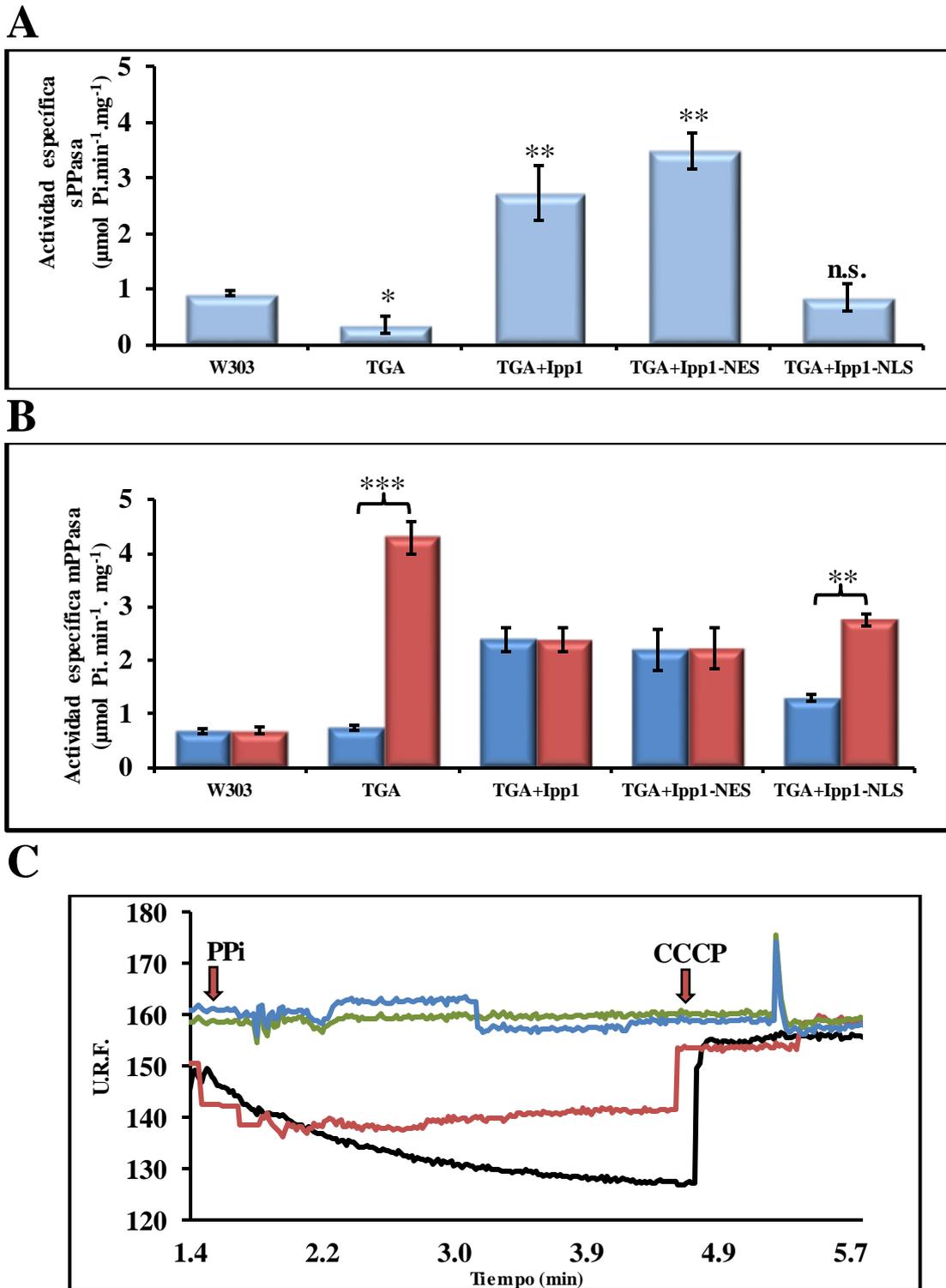


Figura 3.4.2: Niveles de actividad PPasa y de bombeo de protones en las cepas transformantes que co-expresan una H⁺-PPasa quimérica vegetal (TGA=TcGFPAVP1) y variantes quiméricas de Ipp1p con diferente localización núcleo-citoplásmica. **A)** Niveles de actividad sPPasa determinada en extractos de proteínas solubles. **B)** Niveles de actividad mPPasa determinada en fracciones particuladas de membrana. Barras azules: 0 mM KCl; barras rojas: 100 mM KCl en el ensayo **C)** Actividad de bombeo de protones determinada en fracciones particuladas de membrana de las cepas transformantes. Línea negra: TGA; Línea roja: TGA+Ipp1-NLS; Línea verde: TGA+Ipp1-NES; Línea azul: TGA+Ipp1. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; n.s., no significativo).

Para confirmar que efectivamente existe alguna fracción residual de moléculas de Ipp1p adheridas a las membranas durante el procesamiento de las células, se realizó un ensayo de *Western blot* de las fracciones de membranas de las distintas cepas, utilizando un anticuerpo comercial específico anti-Ipp1p. Como se aprecia en la Figura 3.4.3, aparecen cantidades detectables de Ipp1p en el caso de todas las cepas co-expresoras y sus niveles están correlacionados con la mayor o menor abundancia de la misma en el citoplasma de las diferentes cepas.

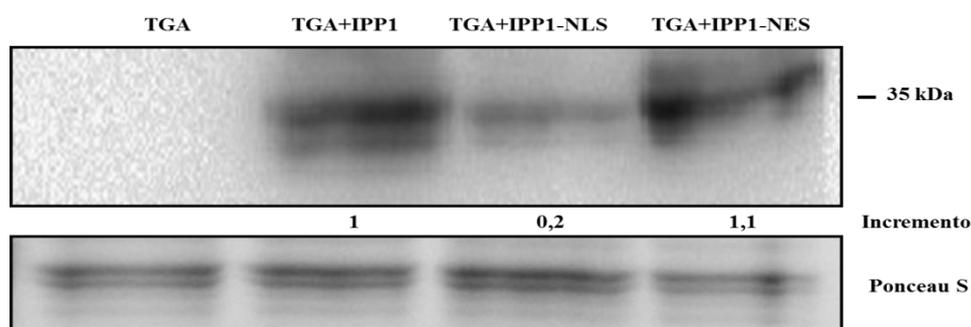


Figura 3.4.3: Detección de proteína Ipp1p en preparaciones de membranas totales de cada una de las cepas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo comercial específico anti-Ipp1p. Se muestra la tinción con Ponceau S de la calle correspondiente usada como control de carga.

3.4.2 Papel de AVP1 en la tolerancia de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* a los fungicidas de tipo amino

Los amino-fungicidas o morfolinos (Dodemorf, Fenpropimorf, Tridemorph) son un tipo de inhibidores de la síntesis de ergosterol utilizados como fungicidas, que actúan contra los productos de los genes *ERG24* y *ERG2*. La alteración que producen en la composición lipídica del organismo conduce a la inhibición de la V-ATPasa vacuolar en levaduras como *S. cerevisiae* o *Candida albicans* (Zhang, Gamarra et al. 2010; Zhang and Rao 2010). Uno de los aminofungicidas más importantes desde el punto de vista agrotecnológico y biomédico es el Tridemorph, que tiene una acción específica contra Erg2p en levadura, impidiendo la acidificación de los orgánulos mediante la inhibición subsiguiente de la V-ATPasa vacuolar. En trabajos previos del grupo se ha establecido que cepas de *S. cerevisiae* con mutaciones en el gen *ERG2* presentan defectos de acidificación intraorganelar dependientes de la V-ATPasa, que pueden ser revertidos mediante una H⁺-PPasa vegetal (Hernández,

Serrano-Bueno et al. 2015). Las plantas, al contrario que los hongos, presentan una alta resistencia a la acción de fungicidas como el Tridemorph. Esto puede ser debido a la presencia en sus membranas intracelulares de una bomba de iones alternativa a la V-ATPasa: la H⁺-PPasa.

En un trabajo reciente publicado por nuestro grupo (Hernández, Herrera-Palau et al. 2016), hemos demostrado que la expresión la H⁺-PPasa de *A. thaliana* (AVP1) en un mutante *erg2Δ* de levadura alivia los efectos inhibitorios sobre la acidificación vacuolar, que la expresión de AVP1 en el mutante condicional YPC3 de *S. cerevisiae* le confiere una marcada tolerancia a Tridemorph y, además, que mutantes de *A. thaliana* deficientes en AVP1 (p.e. *fugu5-3*) presentan mayor sensibilidad a la acción del Tridemorph. Aquí presentamos algunos de los resultados obtenidos en el citado trabajo.

Se quiso comprobar primeramente si la cepa YPC3 de *S. cerevisiae* expresora de la quimera TcGFPAVP1 direccionada a endomembranas (Drake, Serrano et al. 2010) era capaz de llevar a cabo la acidificación de sus orgánulos intracelulares en presencia de Tridemorph. Para ello se transformó esta cepa con la quimera TcRedAVP1 (igual que TcGFPAVP1 pero fusionada con la ORF de una proteína de fluorescencia roja) o con *Ipp1p*, y las cepas transformantes se sometieron a condiciones de inhibición de la V-ATPasa, cultivándolas en glucosa para inhibir la expresión del gen *IPP1* endógeno, y en presencia de 3 μM de Tridemorph durante 5 h. Tanto las cepas tratadas como los controles no tratados se sometieron a un análisis microscópico de fluorescencia con Quinacrina, un fluoróforo que solo puede atravesar las membranas celulares y acumularse en la vacuola cuando el pH de los orgánulos internos es ácido, y se observaron las células al microscopio. Como se observa en la Figura 3.4.4, la fluorescencia verde de la quinacrina solo se acumulaba en las vacuolas de las cepas sin tratar o en la cepa tratada que expresa la quimera TcRedAVP1, demostrando de esta forma que la H⁺-PPasa es capaz de acidificar el lumen vacuolar en presencia del fungicida.

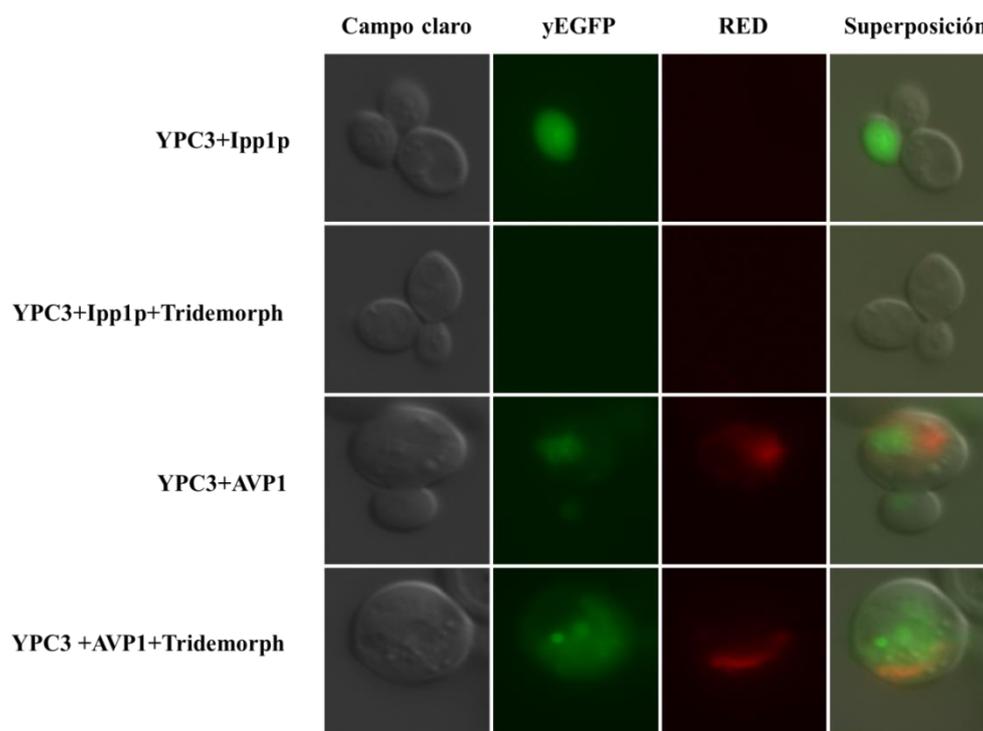


Figura 3.4.4: Análisis por microscopía de fluorescencia de la acumulación intracelular de quinacrina en cepas transformantes YPC3 de *S. cerevisiae* expresoras de Ipp1p y de la H⁺-PPasas quimérica TcRedAVP1 tratadas con Tridemorph.

Se transformó la cepa mutante YPC3 y su derivada deficiente en V-ATPasa denominada SAH6 con la construcción TcGFPAVP1, que es capaz de complementar la deficiencia de V-ATPasa de este mutante y confiere resistencia a Tridemorph a ambas cepas (datos no mostrados). Se obtuvieron extractos celulares de las cepas transformantes, tratadas o no con 3 μ M de Tridemorph durante 5 h, y finalmente las fracciones particuladas de membrana de todas ellas. En estas fracciones se determinó la actividad mPPasa asociada a membranas, la actividad ATPasa y la actividad de bombeo de protones producida tanto por la quimera TcGFPAVP1 como por la V-ATPasa. Todas las fracciones particuladas de membrana presentaron niveles similares de actividad mPPasa, la cual no se vio afectada significativamente por el tratamiento con Tridemorph. Por el contrario, este tratamiento produjo una caída de la actividad ATPasa de las fracciones de membrana de la cepa YPC3+TcGFPAVP1, pero no en la cepa de SAH6+TcGFPAVP1, al ser ésta un mutante deficiente en la V-ATPasa (Figura 3.4.5A). De la misma forma, la actividad de bombeo de H⁺ producida por la ATPasa solo se apreció en la cepa de YPC3+TcGFPAVP1 sin tratar. Todas las cepas transformantes presentaron actividad de bombeo de H⁺

dependiente de PPI y esta actividad no se vió en ningún caso afectada significativamente por el tratamiento (Figura 3.4.5B). Estos resultados nos permiten asegurar que existe una complementación funcional efectiva de la V-ATPasa por parte de AVP1 en estos mutantes.

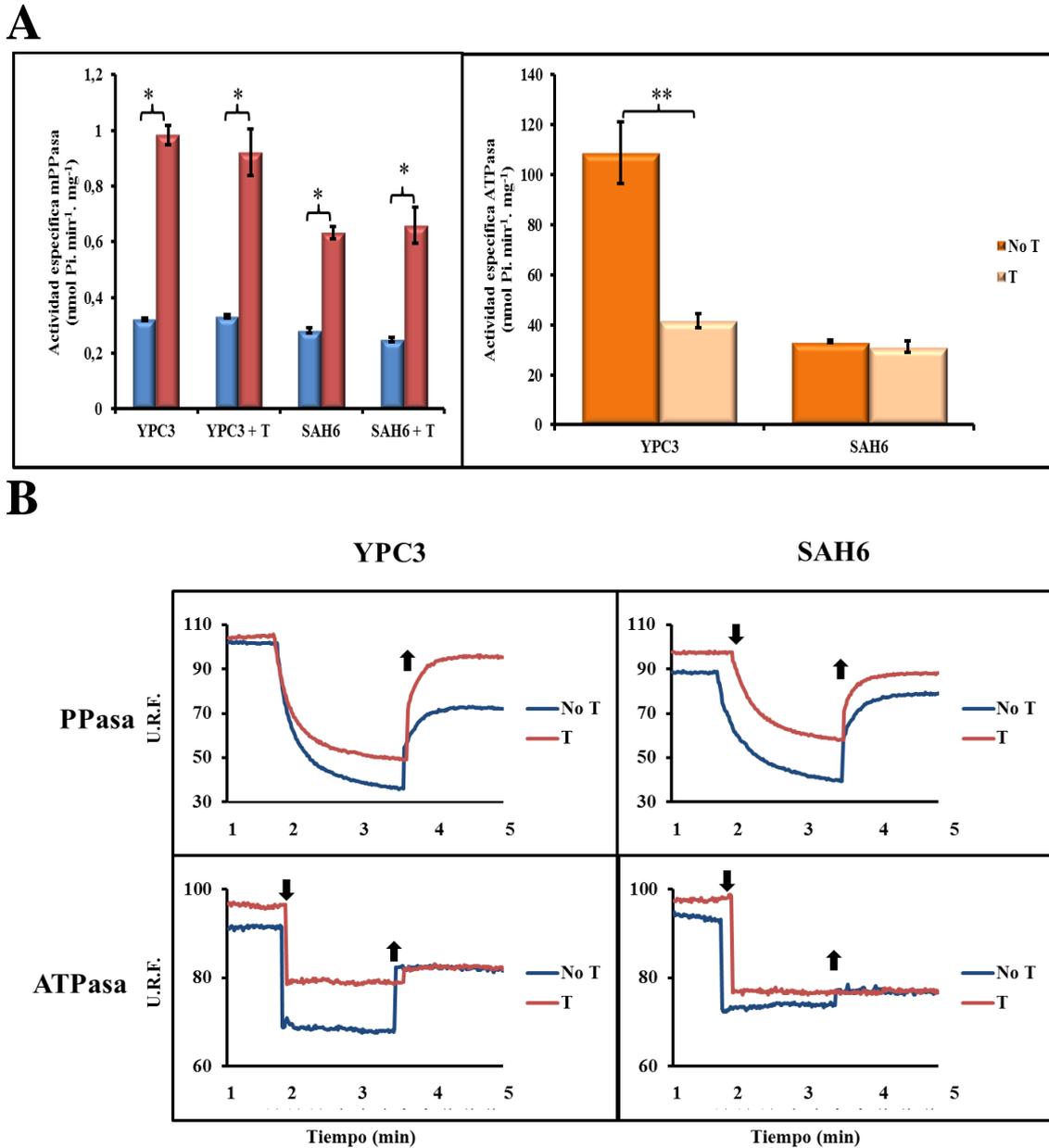
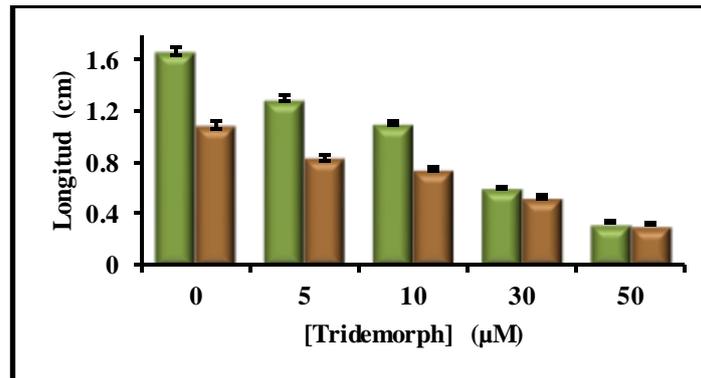


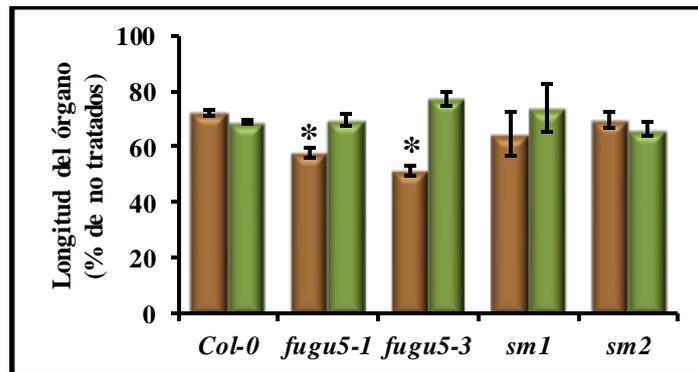
Figura 3.4.5: Medidas de actividad mPPasa, ATPasa y de bombeo de protones en fracciones particuladas de membrana de cepas transformantes YPC3 y SAH6 de *S. cerevisiae* expresoras de TcGFP_{AVP1} y tratadas con Tridemorph. A) Niveles de actividad de hidrólisis de PPI y ATP en fracciones particuladas de membrana de las cepas tratadas (T) y sin tratar (No T) con el fungicida (3 μ M; 5 h). Barras azules: 0 mM KCl; Barras rojas: 100 mM KCl en el ensayo. B) Ensayos de bombeo de protones dependiente de PPI o ATP en fracciones de membranas de cepas transformantes, tratadas y sin tratar con el fungicida, siguiendo el *quenching* de fluorescencia de ACMA producido por la adición de 2 mM Mg-PPi o Mg-ATP (↓). U.R.F., unidades relativas de fluorescencia. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; *, P<0,001; n.s., no significativo).**

Para analizar el efecto del tratamiento con Tridemorph sobre *A. thaliana* se utilizó su ecotipo silvestre Columbia (Col-0) y varias líneas mutantes deficientes en las H⁺-PPasas AVP1 y AVP2 derivadas del mismo. Las líneas *fugu5-1* y *fugu5-3* son mutantes insercionales obtenidos mediante transposón del gen At1g15690, que codifica la H⁺-PPasa vacuolar AVP1 (gentilmente donados por el Dr. A. Ferjani), mientras que las líneas *sm1* y *sm2* (de la colección del Instituto SALK, EE.UU.) son mutantes insercionales obtenidos mediante transposón del gen At1g78920 que codifica AVP2, una de las dos H⁺-PPasas independientes de K⁺ que son minoritarias en esta planta. Los mutantes *fugu5* precisan de sacarosa para germinar, por ello todas las plantas se germinaron en medio rico MS suplementado con sacarosa 1% (p/v), y para el tratamiento de las plántulas, durante 14 días en oscuridad, se utilizó Tridemorph a una concentración de 10 µM. En la Figura 3.4.6A se puede observar que el fungicida afecta negativamente a la elongación de raíz e hipocótilo de las plántulas del ecotipo silvestre, de una forma proporcional a la concentración utilizada. El efecto del Tridemorph es significativamente mayor sobre la elongación de plántulas de los mutantes *fugu5*, mientras que el efecto sobre los mutantes *sm1* y *sm2* es similar al producido sobre el ecotipo silvestre (Figura 3.4.6B). Este resultado demuestra la efectividad de la H⁺-PPasa AVP1 para contrarrestar los efectos del tratamiento del Tridemorph en *A. thaliana* y concuerda con otros resultados del trabajo que muestran mayores niveles de AVP1 que de las restantes isoformas de H⁺-PPasa en el meristemo de las raíces. Finalmente se realizó un análisis por *Western blot* de los niveles de las proteínas AVP1 y V-ATPasa utilizando anticuerpos específicos anti-H⁺-PPasa y anti-VHA-A (subunidad catalítica de la V-ATPasa) (Figura 3.4.6C). Los resultados obtenidos muestran que efectivamente AVP1 no aparece en los mutantes *fugu5*, pero no permitió apreciar la presencia de AVP2 debido a que sus niveles de expresión son mucho menores que los de AVP1. En presencia del fungicida, se aprecia un ligero incremento en los niveles de H⁺-PPasa en el ecotipo silvestre y en el mutante *sm2*, siendo el incremento mayor en este último. También se apreciaron ligeros incrementos de la subunidad A de la V-ATPasa en todas las cepas tras el tratamiento con Tridemorph.

A



B



C

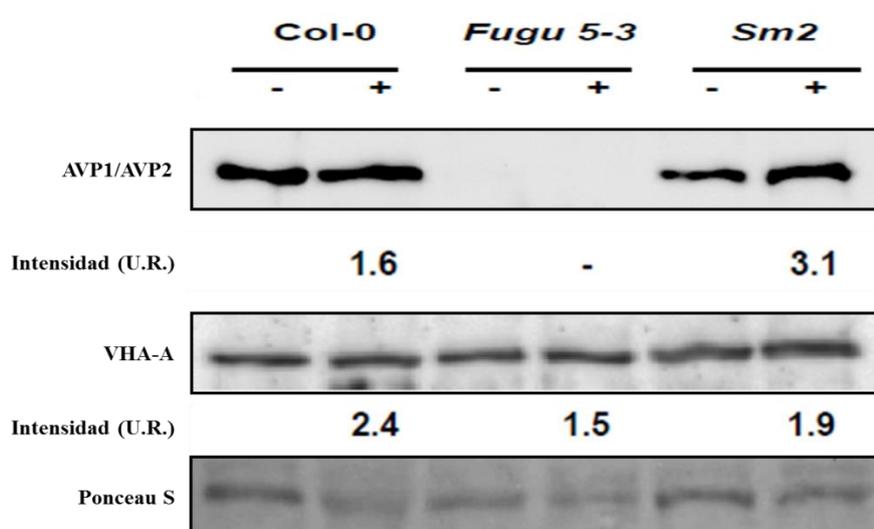


Figura 3.4.6: Efecto del tratamiento con Tridemorph sobre la longitud de la raíz e hipocótilo de plántulas de *A. thaliana*. A) Longitud de raíces e hipocótilos de plántulas del ecotipo silvestre en función de la concentración de fungicida. B) Longitud de raíces e hipocótilos de plántulas del ecotipo silvestre y mutantes *fugu5* de la H⁺-PPasa AVP1 de *A. thaliana*. Barras marrones: raíz; Barras verdes: hipocótilo. C) Niveles de polipéptidos de AVP1 y V-ATPasa determinados por *Western blotting* en extractos totales de plántulas del ecotipo silvestre y mutantes *fugu5* y *sm2* de las H⁺-PPasas AVP1 y AVP2, respectivamente, tratadas con Tridemorph. Se aplicó aprox. 50 μg de proteína por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de la banda de la Rubisco (subunidad L), usada como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001; n.s., no significativo).

3.5 Regulación de las mPPasas de microalgas eucarióticas por condiciones ambientales tróficas y de estrés

Las microalgas eucariotas son un buen modelo de estudio para la bioquímica y fisiología de los organismos fotosintéticos, ya que son organismos metabólicamente similares a las plantas superiores pero más simples estructuralmente. Al tratarse de organismos unicelulares, que crecen rápidamente en medios líquidos y presentan una gran versatilidad metabólica, facilitan enormemente el estudio de los efectos que tienen los factores ambientales en la regulación de su expresión génica y la modulación postraducciona de sus proteínas. Además, muchos de los resultados obtenidos con ellas son extrapolables a las plantas superiores, con las que comparten gran parte de su bioquímica celular.

Al inicio de esta tesis ya se disponía de alguna información sobre regulación de las mPPasas en microalgas eucariotas gracias a trabajos previos del grupo (López-Marques, 2004; Herrera-Palau, 2011). En estos trabajos se había estudiado el efecto que la salinidad y distintas condiciones tróficas tenían en la regulación de las mPPasas de microalgas dulceacuícolas, centrándose en la microalga modelo *C. reinhardtii*. En el presente trabajo hemos tratado de completar y ampliar esos resultados para obtener una visión más amplia de la fisiología molecular y los procesos de regulación de las mPPasas en microalgas eucariotas de distintos grupos taxonómicos, tanto marinas como dulceacuícolas.

3.5.1 Efecto de la salinidad en microalgas que proliferan en hábitats diversos y poseen distintos tipos de H⁺-PPasas

Las H⁺-PPasas son bombas de iones ancestrales muy sencillas estructuralmente capaces de acoplar la energía de hidrólisis del PPi con el transporte de protones a través de las membranas biológicas, y están presentes en todos los eucariotas fotosintéticos, desde las microalgas unicelulares más primitivas a las plantas superiores (Serrano, Pérez-Castiñeira et al. 2007). Esta particularidad les permite crear un gradiente de protones a partir de un sustrato rico en energía alternativo al ATP que puede ser utilizado por la célula en otros procesos, como por ejemplo la generación de energía mecánica o la movilidad de diversos iones. La presencia de sodio en altas concentraciones es perjudicial

debido a que tiene un papel inhibitorio en multitud de reacciones y a que altera el estado osmótico normal de la célula. Nuestro grupo considera que la existencia de un gradiente de protones generado por las H⁺-PPasas constituye una ventaja adaptativa en situaciones de deficiencia energética ya que no consume ATP, y puede ser utilizado por otros transportadores para, entre otros procesos, expulsar sodio activamente al exterior celular o almacenarlo en orgánulos como la vacuola, evitando así el efecto inhibitorio de este ión en procesos vitales para el organismo que se dan en el citosol.

Existen varios estudios que avalan esta propuesta, sin embargo la mayoría de ellos se han llevado a cabo con H⁺-PPasas dependientes de K⁺. En este trabajo se estudia el efecto de la salinidad en los dos tipos existentes de H⁺-PPasas (dependientes e independientes de K⁺) y si las consecuencias de la salinidad en el organismo tienen alguna relación con el tipo de H⁺-PPasa que presentan en sus membranas. Para ello se seleccionaron para un primer estudio comparativo cinco especies de microalgas, en su mayoría bien estudiadas a nivel celular y/o metabólico, que nos permitieran cubrir adaptaciones a un amplio rango de factores ambientales (salinidad, pH y temperaturas extremas), y cuyos genomas codificaran distintos tipos de H⁺-PPasas. Dos de las especies, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella* sp. N64A, son Clorofíceas dulceacuícolas cuyo crecimiento es óptimo en un medio totalmente exento de NaCl; en cambio, la especie *Chlamydomonas euryale* crece de forma similar en medio sin NaCl y en los moderadamente salinos; en contraste, la especie marina *Chlorella salina* tiene su óptimo de crecimiento en agua de mar (0,3 M NaCl) mientras que la Rodofita termoacidófila *Galdieria sulphuraria* es un extremófilo cosmopolita presente en regiones volcánicas de todo el planeta que tiene su óptimo de crecimiento a pH 2 y tolera un amplio rango de salinidad, incluso ligeramente superior a la del agua marina. Estas especies también presentan una notable variabilidad en cuanto a los tipos de H⁺-PPasas que codifican sus genomas: mientras que las dos especies de *Chlamydomonas* solo poseen una única H⁺-PPasa dependiente de K⁺, las dos especies de *Chlorella* presentan tanto una H⁺-PPasa dependiente de K⁺ como una independiente de K⁺ y la especie *G. sulphuraria* posee tres H⁺-PPasas, todas independientes de K⁺. Esta información se ha obtenido mediante análisis de secuencias en bases de

datos y de sus correspondientes proyectos genoma (NCBI, JGI), sin embargo faltan datos empíricos sobre el significado fisiológico y la bioquímica de estas proteínas.

Los medios de cultivo utilizados para cada una de ellas se especifican en el apartado 2.1.4.2. Los códigos de colección de las distintas especies, así como los números de acceso de los genes y de las proteínas H⁺-PPasas que codifican los genomas de cada una de ellas se muestran en la Tabla VII.

Tabla VII: Especies de microalgas eucarióticas utilizadas y sus genes de H⁺-PPasas

Organismo (hábitat)	mPPasas codificadas por el genoma correspondiente	Código UniProt o AlgoBlastDB*
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 21GR (Agua dulce)	1 H ⁺ -PPasa dependiente de K ⁺	Q93Y49_CHLRE
<i>C. euryale</i> SAG 25.89 (Marino)	1 H ⁺ -PPasa dependiente de K ⁺	CAMNT_0047850157 *
<i>Chlorella</i> sp. N64A CCAP 211/84 (Agua dulce)	1 H ⁺ -PPasa dependiente de K ⁺ ; 1 H ⁺ -PPasa independiente de K ⁺	E1ZMK4_CHLVA; E1ZB72_CHLVA
<i>Ch. salina</i> SAG 8.86 (marino)	1 H ⁺ -PPasa dependiente de K ⁺ ; 1 H ⁺ -PPasa independiente de K ⁺ (por analogía con otras especies de <i>Chlorella</i> con genoma secuenciado)	Q4A483_9CHLO (Secuencia parcial dependiente de K ⁺)
<i>Galdieria sulphuraria</i> 074W (lagunas ácidas de zonas volcánicas)	3 H ⁺ -PPasa independiente de K ⁺	M2Y519_GALSU (Gs 15740); M2W5M5_GALSU (Gs 15900); M2YIL8_GALSU (Gs 28180) <i>CONSTITUTIVO</i>

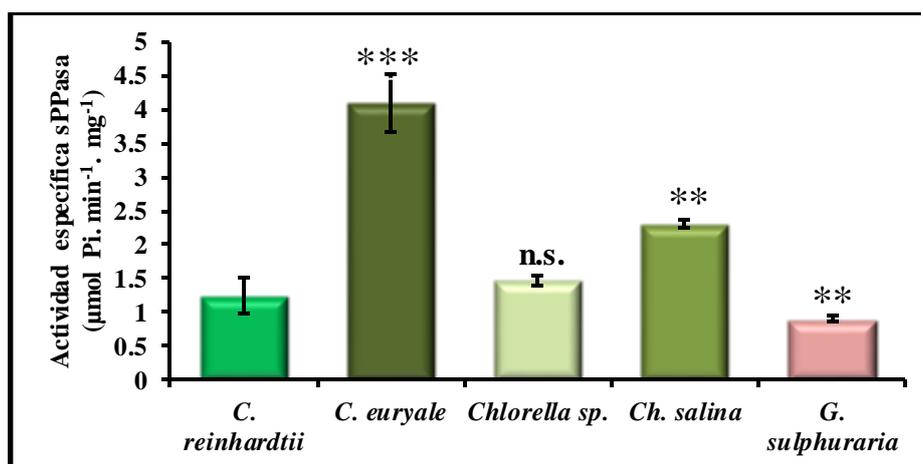
3.5.1.1 Caracterización de las actividades PPasa soluble y ligada a membranas de las especies de microalgas estudiadas

Primeramente se cultivaron los organismos en sus medios específicos y se desarrollaron fotoautotróficamente hasta alcanzar en todos los casos la fase estacionaria de crecimiento. Hay que aclarar que la especie *C. euryale* crece óptimamente en medio con o sin NaCl ya que es una especie eurihalina, de ahí su nombre, pero en este trabajo consideramos que su cultivo es óptimo en medio SUEOKA suplementado con 150 mM NaCl. Se obtuvieron extractos celulares de cada uno de los cultivos y por centrifugación se separaron las fracciones de proteínas solubles y particulada de membranas. Se realizaron

medidas de actividad específica PPasa soluble y asociada a membranas, en este caso en presencia de fluoruro.

Los extractos solubles de todas las especies estudiadas presentaron niveles apreciables de actividad sPPasa, en la mayoría de los casos en el rango de 1-2 U/mg de proteína, un valor similar al descrito para levadura y otros eucariotas (Serrano-Bueno, Hernández et al. 2013). Sin embargo, las especies *Ch. salina* y *C. euryhale* mostraron valores claramente mayores, esta última casi 4 veces más (Figura 3.5.1A). De la misma forma todas las microalgas presentaron actividad mPPasa asociada a las fracciones de membrana que además era estimulada por potasio en mayor o menor medida, excepto en el caso de *G. sulphuraria*. Por tanto, todas las algas estudiadas deben tener H⁺-PPasas dependientes de K⁺ funcionales, salvo *G. sulphuraria* que solo posee H⁺-PPasas independientes de K⁺ (Figura 3.5.1B). Sorprendentemente, el nivel de actividad mPPasa de membrana fue significativamente mayor en *C. euryale* que en el resto (aprox 850 mU/mg, cuando lo normal es 100-150 mU/mg), llegando a ser 4-5 veces mayor que la de la otra especie estudiada de su género, *C. reinhardtii*, que es dulceacuícola.

A



B

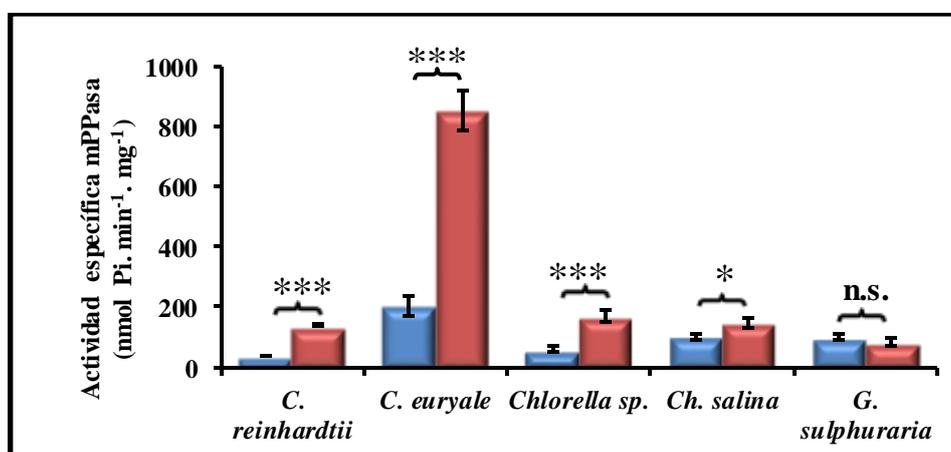


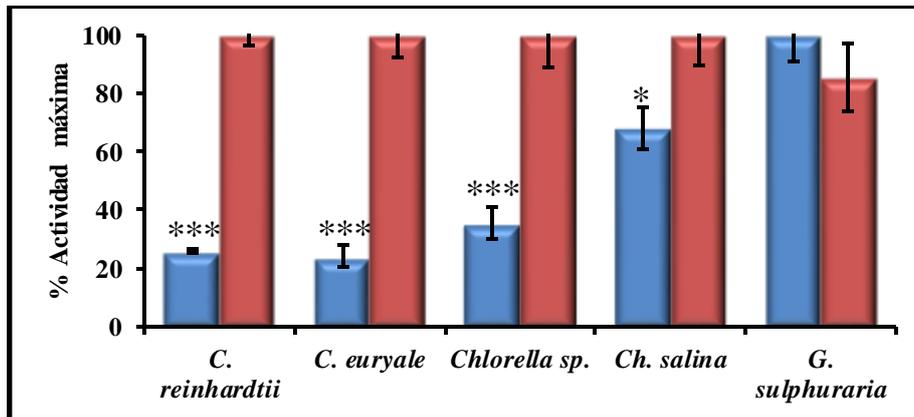
Figura 3.5.1: Niveles de actividad PPasa tanto soluble (sPPasa) como asociada a membrana (mPPasa) en extractos celulares de las diferentes especies indicadas cultivadas en sus condiciones óptimas específicas de cultivo. **A)** Actividad específica sPPasa en extractos solubles totales. **B)** Actividad específica mPPasa en fracciones particuladas de membranas. Barras azules: 0 mM KCl; barras rojas: 100 mM KCl en el ensayo. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001; n.s., no significativo).

3.5.1.2 Efecto del potasio sobre la actividad PPasa asociada a las fracciones de membranas de las diferentes microalgas estudiadas

Debido a que las especies de microalgas estudiadas presentan en sus genomas genes que codifican diferentes H⁺-PPasas dependientes de K⁺ e independientes de K⁺ (Tabla VII), cabía esperar que la actividad mPPasa asociada a sus fracciones de membranas presentase *in vitro* diferentes sensibilidades al potasio. Para verificar esta hipótesis, se calculó el porcentaje de activación de la actividad PPasa de membrana de cada una de las especies en

presencia de 100 mM KCl en el ensayo (condiciones estándar) con respecto a la actividad ensayada en ausencia de KCl (Figura 3.5.2A). También se realizaron medidas de actividad mPPasa en presencia de concentraciones crecientes de KCl en el ensayo, en el rango 0-400 mM (Figura 3.5.2B).

A



B

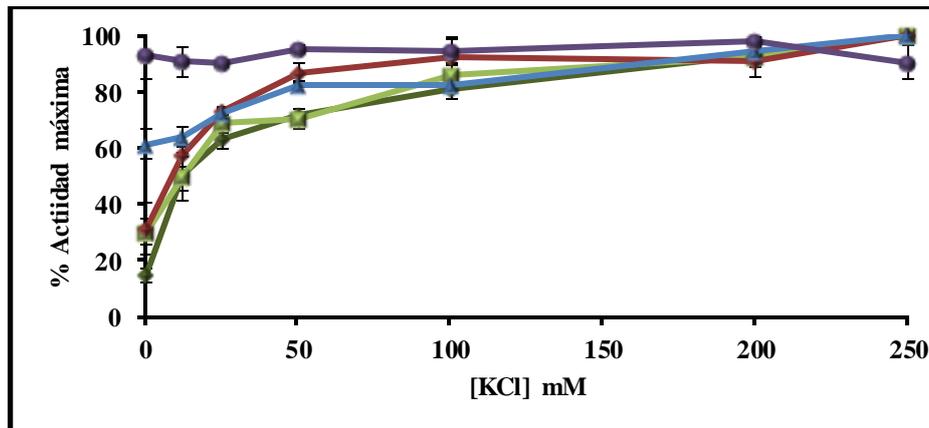


Figura 3.5.2: Estimulación por potasio de la actividad mPPasa asociada a membranas de cada una de las especies de microalgas estudiadas. A) Porcentajes de actividad mPPasa ensayada con (barras rojas) o sin (barras azules) 100 mM KCl respecto a la actividad máxima determinada para cada preparación. **B)** Titulación de la activación por KCl de la actividad mPPasa en preparaciones de membranas de de las especies estudiadas. Rombo verde: *C. euryale*; cuadrados verdes: *C. reinhardtii*; rombos rojos: *Chlorella sp. N64A*; triángulos azules: *Ch. salina*; círculos morados: *G. sulphuraria*. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; ***, P<0,001).

Se observó una activación por KCl muy importante (3-5 veces) de la actividad mPPasa en las fracciones de membranas de todas las especies estudiadas, excepto en *G. sulphuraria* (Figura 3.5.2A), lo que era esperable ya que esta microalga no presenta en su genoma ningún gen que codifica H⁺-PPasas dependientes de K⁺ (véase Tabla VII). Esta activación fue

significativamente mayor en las dos especies de *Chlamydomonas* y en la especie *Chlorella* sp. N64A que en la especie *Ch. salina*, un hecho que concuerda con que esta especie marina debe poseer una H⁺-PPasa independiente de K⁺ además de la isoforma dependiente de K⁺ que comparte con las otras especies citadas. Se observó asimismo una diferencia en el grado de activación por KCl de la actividad mPPasa entre las dos especies de *Chlorella*, presentando *Ch. salina* un mayor componente de actividad independiente de potasio (Figura 3.5.2A y B); esto sugiere que la H⁺-PPasa independiente de K⁺ está más presente o es más activa en esta especie marina que en las otras especies de Clorofitas estudiadas.

3.5.1.3 Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa asociada a las fracciones de membranas de las diferentes microalgas estudiadas

Para evaluar el efecto que tiene el sodio *in vitro* sobre la actividad mPPasa asociada a las fracciones de membranas de cada una de las especies analizadas se llevaron a cabo medidas de dicha actividad suplementando las mezclas de ensayo con diversas concentraciones de NaCl. Estas medidas se realizaron tanto en presencia como en ausencia de 100 mM KCl en el ensayo.

Como se puede observar en la Figura 3.5.3 la adición de NaCl en la mezcla de ensayo produce un efecto sobre la actividad mPPasa asociada a membrana que varía de unas especies a otras en función de las H⁺-PPasas que presumiblemente contienen sus preparaciones de membranas, aunque en general se observa un efecto inhibitorio fundamentalmente sobre el componente dependiente de K⁺ (Figura 3.5.3). El efecto sobre la actividad mPPasa asociada a membrana de las dos especies de *Chlamydomonas* fue similar, afectando exclusivamente al componente dependiente de K⁺, aunque parece más tolerante en *C. euryale* a concentraciones moderadas de NaCl. El efecto inhibitorio fue significativo a concentraciones de NaCl superiores o iguales a 50 mM en *C. reinhardtii* y a valores iguales o superiores a 150 mM en *C. euryale*. En *Chlorella* sp. N64A sólo se observó un efecto inhibitorio significativo sobre el componente de actividad dependiente de K⁺ a concentraciones de NaCl de 300 mM, mientras que la actividad mPPasa asociada a la fracción de membranas de

la especie *Ch. salina*, que es en su mayor parte insensible a K^+ , se vio afectada solo muy ligeramente. En contraste con todo lo anterior, en la rodofita *G. sulphuraria*, que carece de actividad dependiente de K^+ , se observó incluso un ligero incremento de actividad mPPasa asociada a membranas a concentraciones moderadas de NaCl, hasta 50 mM, y un efecto significativo de inhibición sólo a 300 mM de NaCl.

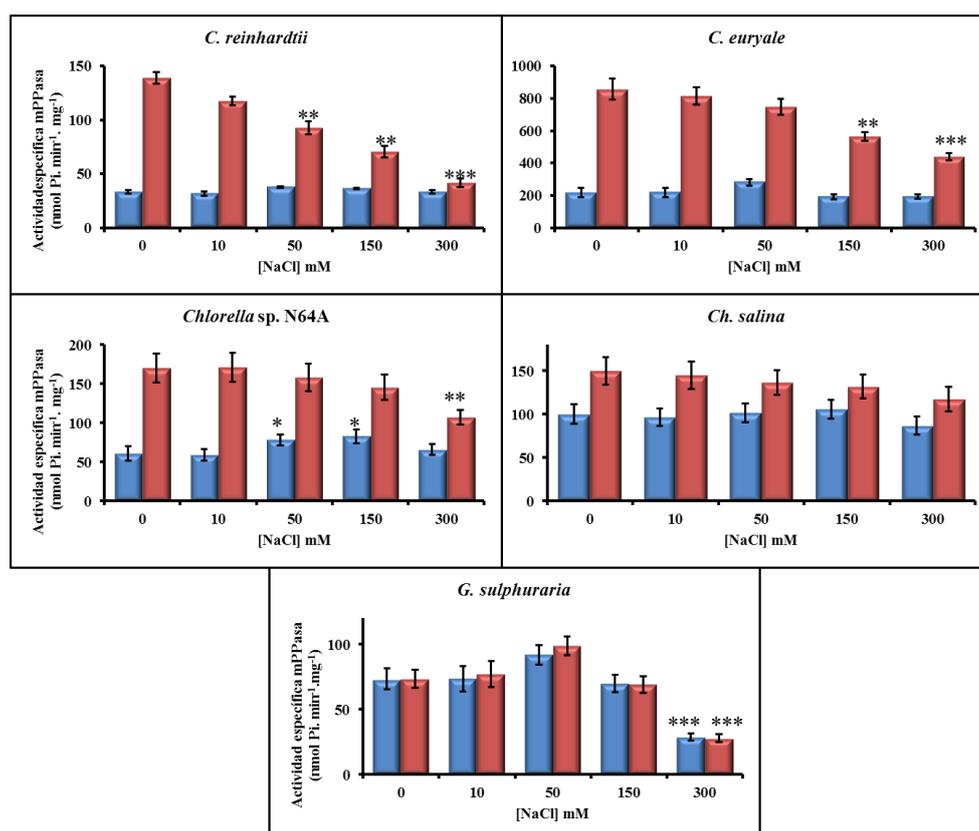
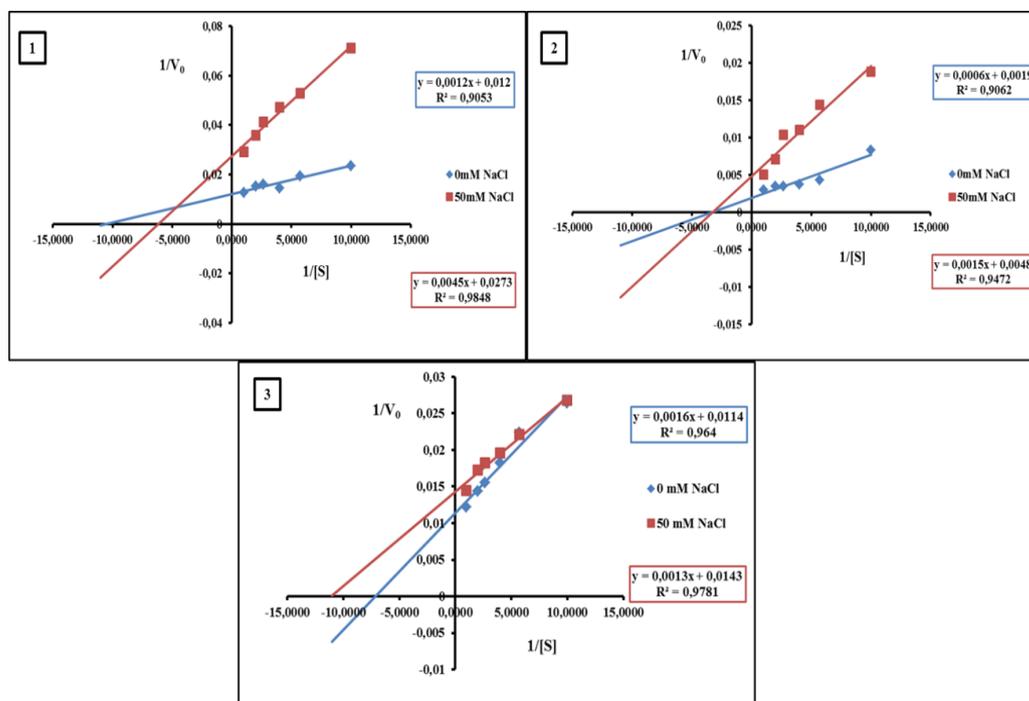


Figura 3.5.3: Efecto de la adición de NaCl en la mezcla de ensayo sobre los niveles de actividad mPPasa de las preparaciones de membranas de las distintas especies analizadas en este trabajo. Barras azules: Actividad específica determinada en ausencia de KCl; barras rojas: actividad específica determinada en presencia de 100 mM KCl en el ensayo. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001).

Para comprender mejor el efecto del sodio sobre la actividad mPPasa asociada a las fracciones de membranas se realizó un estudio de los parámetros cinéticos en aquellas microalgas que deben poseer un solo tipo de H^+ -PPasa, bien sea dependiente de K^+ (*C. reinhardtii*, *C. euryale*) o independiente de K^+ (*G. sulphuraria*). A pesar de que la especie *G. sulphuraria* posee tres H^+ -PPasas independientes de K^+ , sabemos por estudios anteriores de nuestro grupo (Herrera Palau 2011) que sólo uno de los genes que las codifican se expresa de manera constitutiva (*Gs15900*). El estudio de los parámetros cinéticos se llevó a cabo tanto en presencia como en ausencia de 50 mM NaCl, lo cual nos permitió

determinar el tipo de inhibición que produce este compuesto, uno de cuyos productos de disociación, el ión Na^+ , es el verdadero agente inhibidor. El sustrato catalíticamente competente para las mPPasas es el complejo Mg_2PPi .

A



B

Organismo	K_m (μM) (control)	K_m (μM) (50 mM NaCl)	V_{max} (nmoles P. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) (control)	V_{max} (nmoles P. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) (50 mM NaCl)
<i>C. reinhardtii</i>	100	165	83,33	36,63
<i>C. euryale</i>	317	313	526,32	286,3
<i>G. sulphuraria</i>	140	91	87,72	69,93

C

Organismo	V_{max}/K_m (control)	V_{max}/K_m (50 mM NaCl)
<i>C. reinhardtii</i>	833	222
<i>C. euryale</i>	1660	915
<i>G. sulphuraria</i>	627	769

Figura 3.5.4: Parámetros cinéticos de la actividad mPPasa y efecto sobre ellos de la presencia en el ensayo de 50 mM NaCl. A) Gráficas de Lineweaver-Burk generadas para obtener los parámetros cinéticos de la actividad mPPasa asociada a las fracciones de membranas de las tres especies indicadas. 1) *C. reinhardtii*; 2) *C. euryale*; 3) *G. sulphuraria*. **B)** Parámetros cinéticos de la actividad mPPasa de cada especie en las dos condiciones de ensayo analizadas. **C)** Tabla con las razones V_{max}/K_m , tomadas como medidas comparativas de la eficiencia catalítica de las distintas mPPasas en las condiciones analizadas.

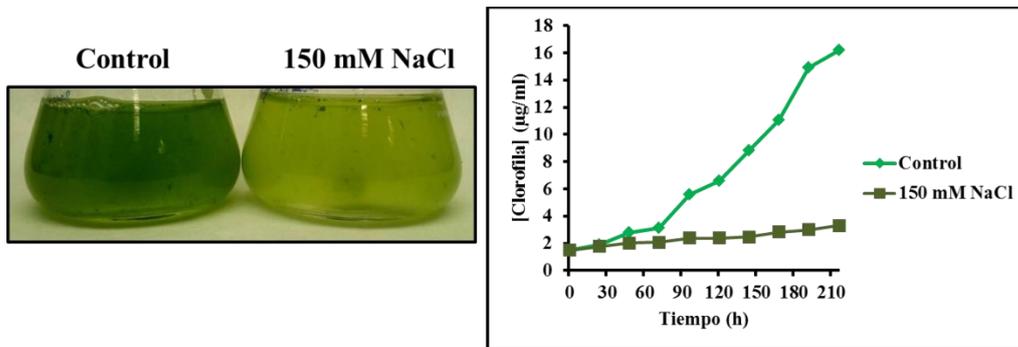
Lo primero que muestran las gráficas de Lineweaver-Burk son los diferentes mecanismos de inhibición por Na^+ de las mPPasas estudiadas (Figura 3.5.4A): mientras que las H^+ -PPasas dependientes de K^+ de *C. reinhardtii* y *C. euryale* muestran claros mecanismos de inhibición no competitiva, la H^+ -PPasa independiente de K^+ de *G. sulphuraria* no presenta un mecanismo de inhibición bien definido, lo cual concuerda con que esta mPPasa tolera bien el sodio, siendo incluso ligeramente estimulada por esa concentración salina (véase Figura 3.5.3). De hecho, la presencia de 50 mM de NaCl tuvo un efecto inhibitorio modesto sobre la V_{max} de la mPPasa de *G. sulphuraria* que se compensó con una reducción significativa de su K_m , resultando en el incremento de eficiencia catalítica observado en este caso (Figura 3.5.4B y C). Por otra parte, en las dos especies de *Chlamydomonas* se apreció un efecto negativo evidente del sodio sobre la V_{max} , que bajó prácticamente a la mitad en ambos casos, mientras que la K_m permaneció invariable (*C. euryale*) o sufrió una clara disminución (*C. reinhardtii*), resultando en una clara reducción de la eficiencia catalítica (más del 50%) en ambos casos, la cual fue aún más potente en la especie dulceacuícola (aprox. 75% de reducción). Este efecto es consecuencia de la potente inhibición no competitiva que el sodio ejerce específicamente sobre la actividad H^+ -PPasa dependiente de K^+ , ya que el este ión no actúa directamente sobre el sitio catalítico de unión del PPi, sino sobre el sitio de unión del potasio, el cual está ausente en las H^+ -PPasas independientes de K^+ .

3.5.1.4 Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de mPPasa de las distintas especies de microalgas analizadas

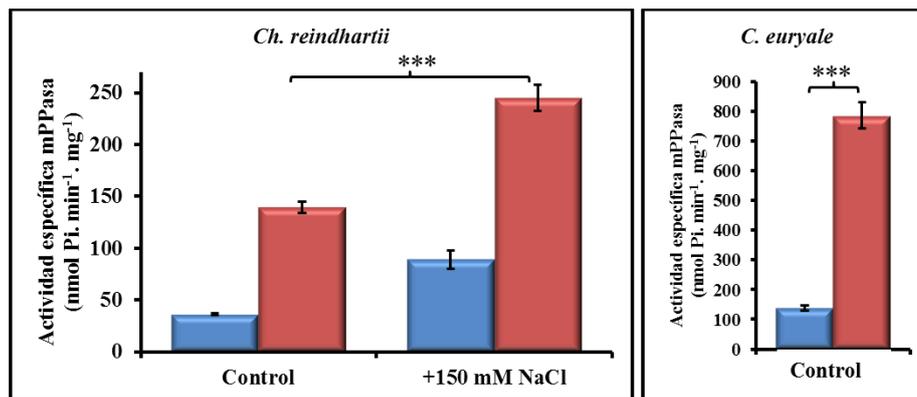
Para evaluar el efecto de la salinidad del medio de cultivo sobre el crecimiento de las distintas especies de microalgas utilizadas en este apartado, se registraron las curvas de crecimiento de todas ellas en condiciones normales de cultivo y en los mismos medios suplementados con la concentración de NaCl adecuada en cada caso. Para completar este estudio se determinaron los valores de actividad PPasa tanto soluble como asociada a la fracción de membranas de cultivos de cada especie sometidos a estrés salino durante 16-18 h y se compararon con las actividades PPasas de cultivos sin tratar. Además se realizaron ensayos de *Western blot* con un anticuerpo anti- H^+ -PPasa tras

separación electroforética en geles de poliacrilamida-SDS de las proteínas de membranas, tanto tratadas como sin tratar, para detectar posibles cambios en los niveles del polipéptido de la H⁺-PPasa, y así establecer si el choque salino tiene algún efecto sobre la expresión de estas proteínas.

A



B



C

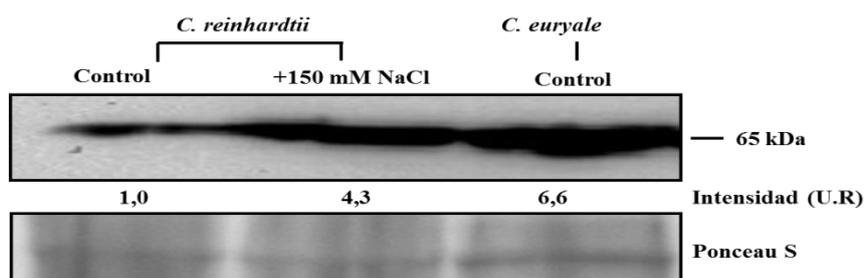


Figura 3.5.5: Efecto de la salinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad y proteína H⁺-PPasa de la clorofita dulceacuícola *C. reinhardtii*. **A)** Aspecto final de los cultivos tras 9 días de desarrollo y curvas de crecimiento de los mismos en condiciones estándar (control) y con 150 mM NaCl añadido. **B)** Niveles de actividad específica mPPasa en fracciones de membranas de cultivos sometidos o no al choque salino durante 18 h. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. **C)** Niveles del polipéptido de H⁺-PPasa determinados por *Western blot* en fracciones de membranas de cultivos sometidos o no al choque salino durante 18 h. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga. En los paneles B y C se han incluido los datos equivalentes de la clorofita marina *C. euryale* cultivada en sus condiciones estándar (150 mM NaCl) para comparación. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; ***, P<0,001).

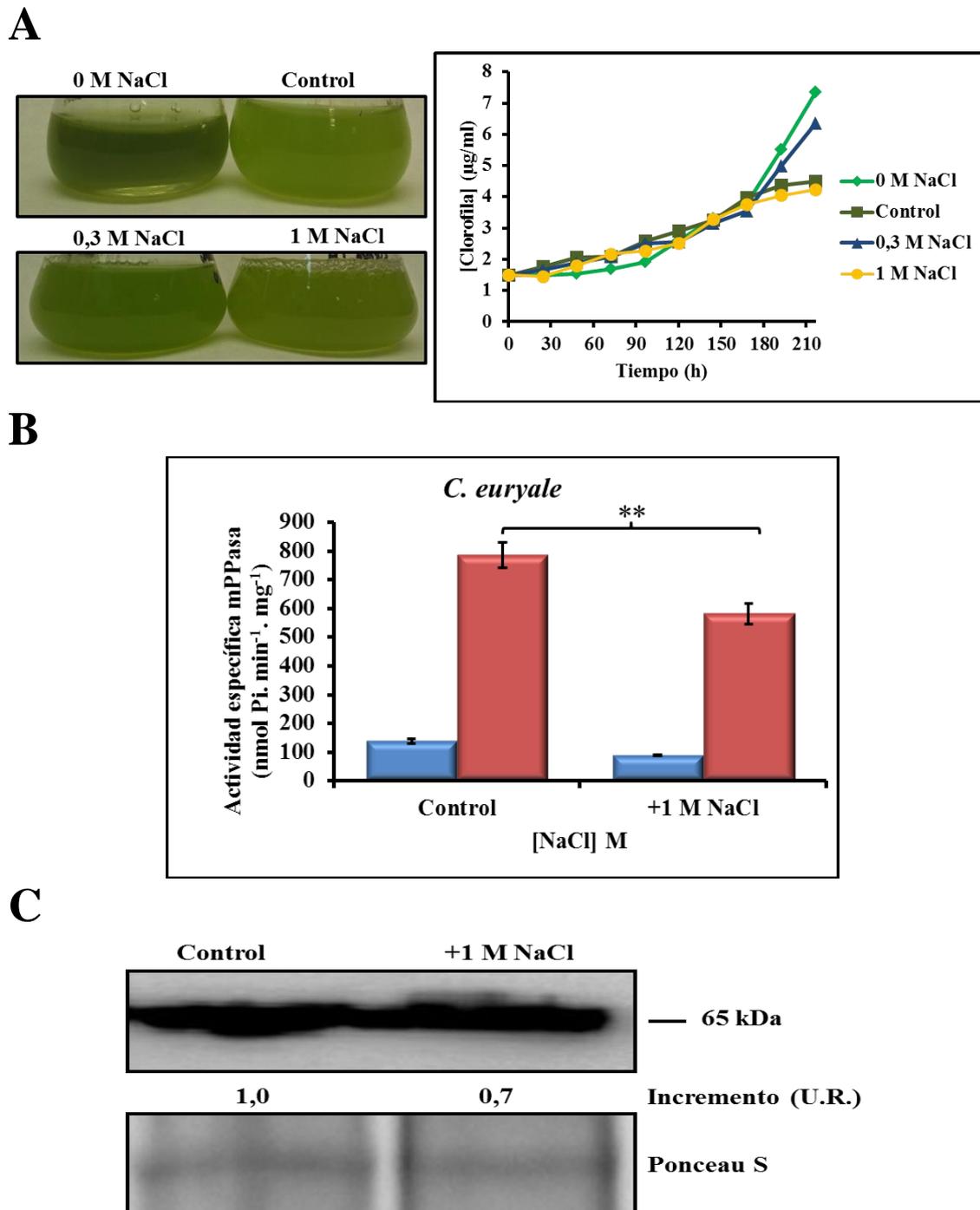
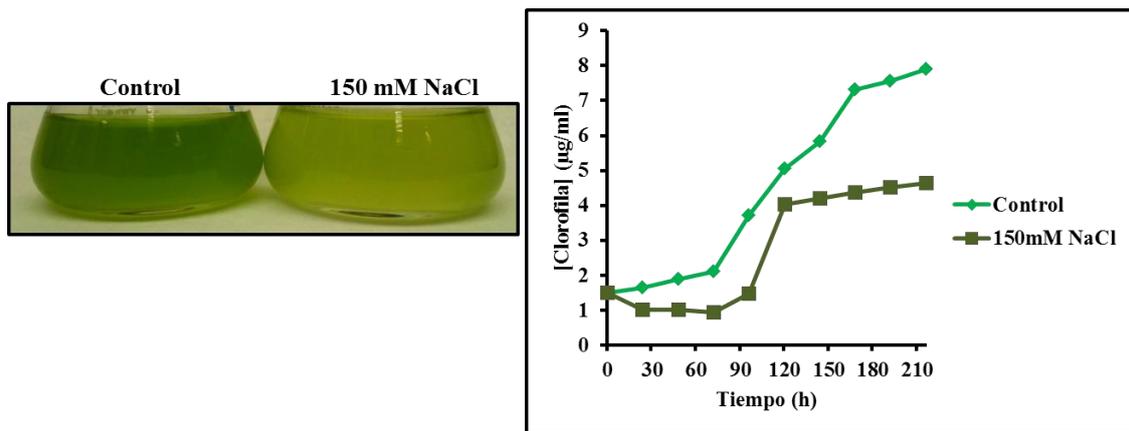


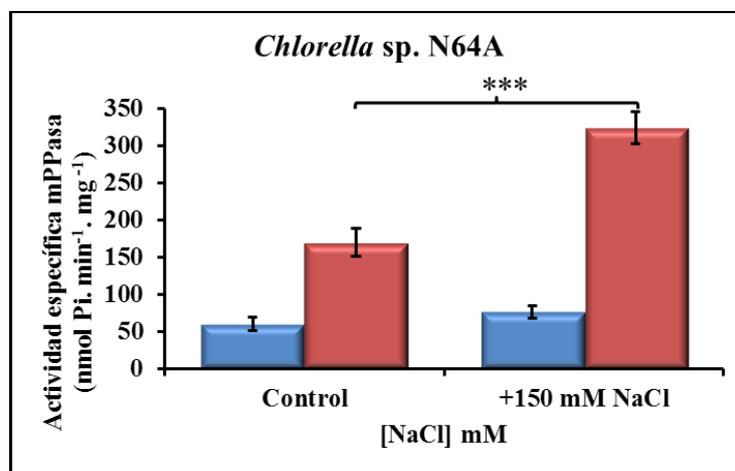
Figura 3.5.6: Efecto de las condiciones de hipersalinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad y proteína H^+ -PPasa de la clorofita marina *C. euryale*. **A)** Aspecto final de los cultivos tras 9 días de desarrollo y curvas de crecimiento de los mismos en condiciones estándar (control) y con concentraciones crecientes de NaCl añadido. **B)** Niveles de actividad específica mPPasa en fracciones de membranas de cultivos sometidos a las concentraciones salinas indicadas durante 18 h. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. **C)** Niveles del polipéptido de H^+ -PPasa determinados por *Western blot* en fracciones de membranas de cultivos sometidos a las concentraciones salinas indicadas durante 18 h. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; **, P<0,01).

La salinidad tuvo un efecto muy fuerte sobre la especie dulceacuícola *C. reinhardtii*, inhibiendo prácticamente el crecimiento del cultivo a una concentración de 150 mM NaCl (Figura 3.5.5A). Por el contrario, el crecimiento de la especie marina *C. euryale* no se vio gravemente afectado por ninguna de las condiciones de salinidad empleadas, observándose únicamente un ligero efecto negativo sobre el crecimiento final en los cultivos con 150 mM y 1 M NaCl, mientras que con 0.3M NaCl, concentración salina equivalente al agua de mar, el comportamiento del cultivo fue similar al control sin sal añadida (Figura 3.5.6A). Por otra parte, en *C. reinhardtii* se apreciaron incrementos notables (2-4 veces) tanto en los niveles de actividad específica como en los de proteína H⁺-PPasa detectados por *Western blot*, tras un tratamiento con 150 mM NaCl durante 18 h (Figura 3.5.5B y C). Además, la H⁺-PPasa de la especie dulceacuícola alcanzó tras esta inducción niveles similares a los que presenta su homóloga marina *C. euryale* en su medio estándar de crecimiento (150 mM NaCl) (Figura 3.5.5C). Sin embargo, esta inducción no se apreció en la especie marina *C. euryale* en condiciones de hipersalinidad, observándose incluso una cierta disminución de los niveles de actividad y proteína mPPasa por el tratamiento con 1M NaCl durante 18 horas (Figura 3.5.6B yC). En ningún caso se observaron efectos significativos de los tratamientos salinos sobre los niveles de actividad sPPasa de la fracción de proteínas solubles de ninguna de las dos especies de *Chlamydomonas* estudiadas (datos no mostrados).

A



B



C

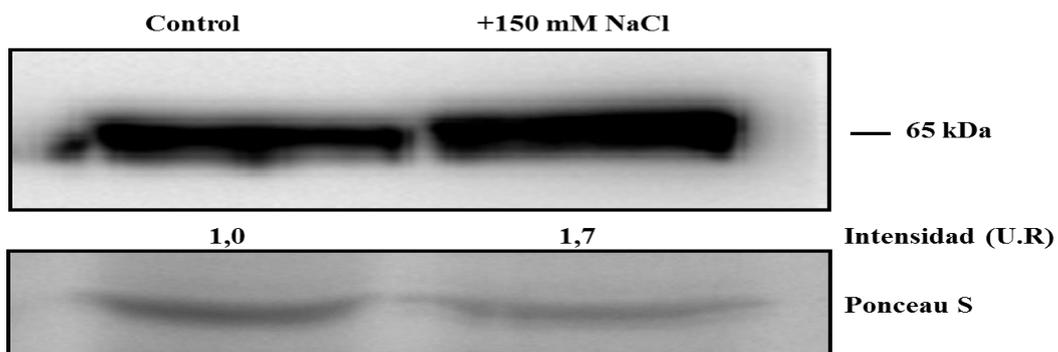
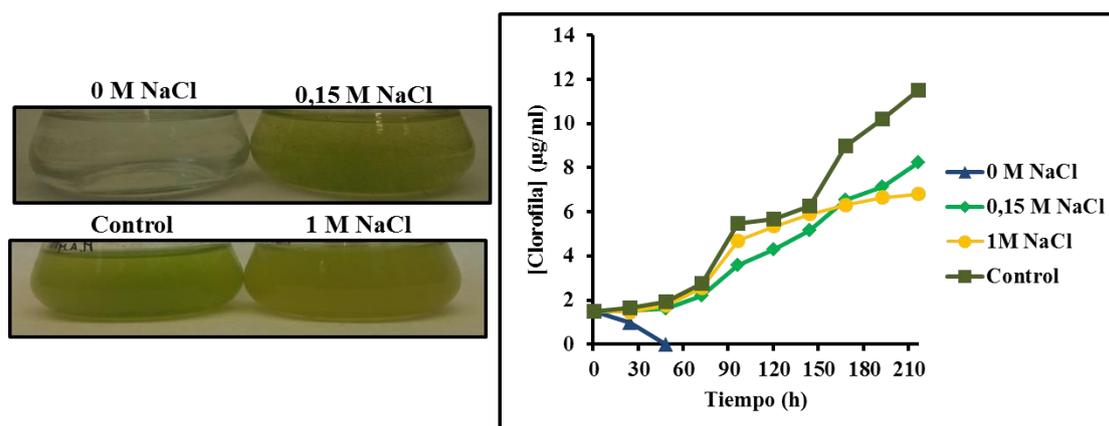


Figura 3.5.7: Efecto de la salinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad y proteína H⁺-PPasa de la clorofita dulceacuícola *Chlorella* sp. N64A. A) Aspecto final de los cultivos tras 9 días de desarrollo y curvas de crecimiento de los mismos en condiciones estándar (control) y con 150 mM NaCl añadido. B) Niveles de actividad específica mPPasa en fracciones de membranas de cultivos sometidos o no al choque salino durante 18 h. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. C) Niveles del polipéptido de H⁺-PPasa determinados por *Western blot* en fracciones de membranas de cultivos sometidos o no al choque salino durante 18 h. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; ***, P<0.001).

A



B

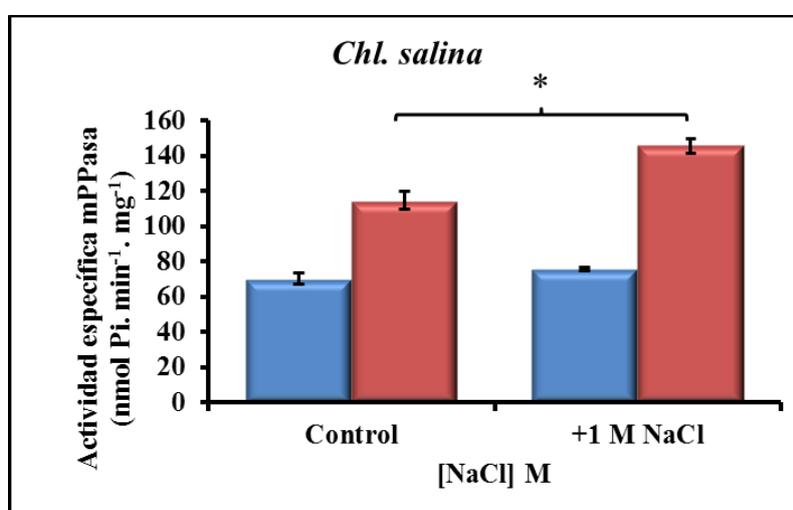
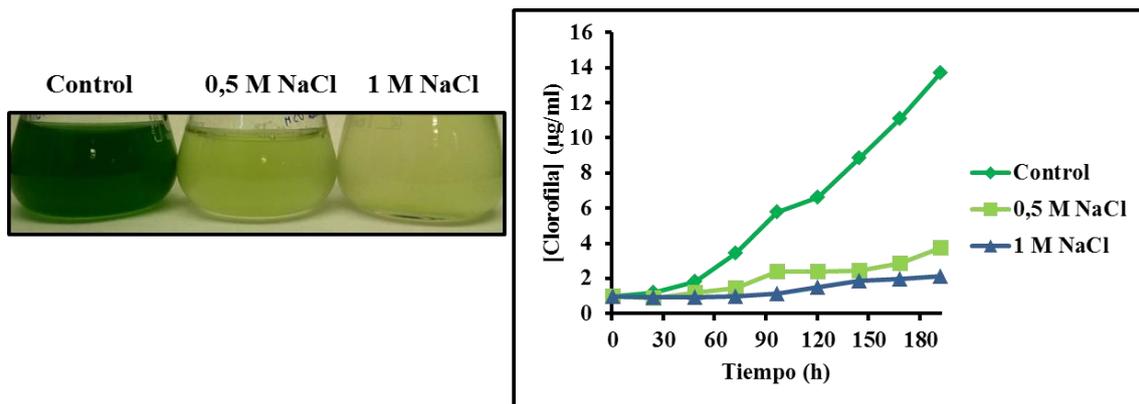


Figura 3.5.8: Efecto de las condiciones de hipersalinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad H⁺-PPasa de la clorofita marina *Ch. salina*. A) Aspecto final de los cultivos tras 9 días de desarrollo y curvas de crecimiento de los mismos en condiciones estándar (control) y con concentraciones crecientes de NaCl añadido. **B)** Niveles de actividad específica mPPasa en fracciones de membranas de cultivos sometidos a las concentraciones salinas indicadas durante 18 h. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05).

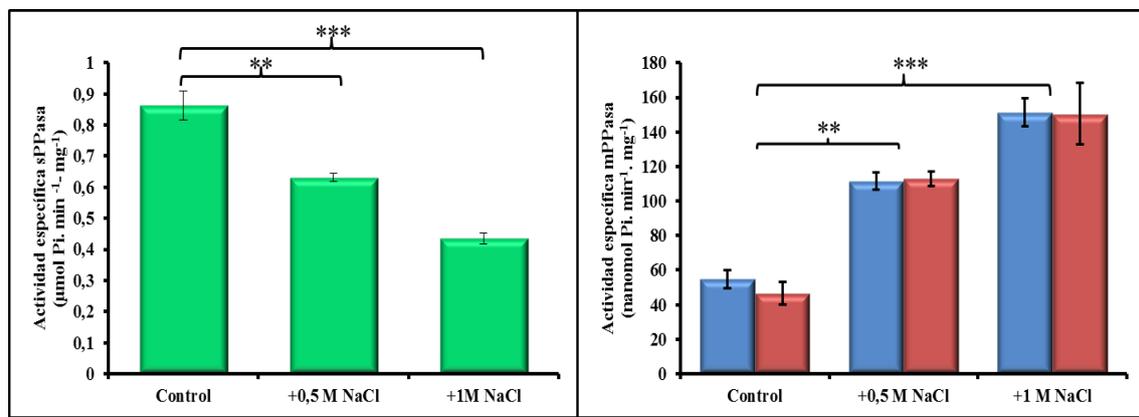
Se realizó también un estudio comparativo sobre el efecto de la salinidad sobre una especie dulceacuícola (*Chlorella* sp. N64A) y otra marina (*Ch. salina*) del género *Chlorella*, el cual se encuentra bastante alejado filogenéticamente de *Chlamydomonas* en la división de microalgas verdes Clorofitas. El crecimiento de la especie *Chlorella* sp. N64A se vio afectado muy significativamente por la presencia de 150 mM NaCl en el medio, llegando a alcanzar tras 9 días únicamente la mitad del valor de densidad celular alcanzado por el cultivo control, sin NaCl añadido (Figura 3.5.7A). Este efecto inhibitorio de crecimiento fue sin embargo menos acusado que el observado en la

especie también dulceacuícola *C. reinhardtii* y pensamos que puede deberse a la presencia en las membranas de *Chlorella* de una segunda H⁺-PPasa independiente de K⁺, según la información de su genoma secuenciado. Por el contrario, la especie *Ch. salina* está totalmente adaptada a los hábitats marinos ya que fue incapaz de crecer en medio sin NaCl, y solo alcanzó su óptimo de crecimiento en el medio con la concentración de NaCl equivalente a la salinidad del agua de mar (0,3 M NaCl) (Figura 3.5.8A). El tratamiento con NaCl durante 18 h provocó incrementos significativos de los niveles de actividad mPPasa dependiente de K⁺ en los cultivos de ambas especies, aunque fue significativamente mayor en la *Chlorella* dulceacuífera (casi dos veces respecto al control sin sal) que en su homóloga marina *Ch. salina* tratada con 1 M NaCl (tan sólo un 20% más respecto al cultivo con 0,3M NaCl) (Figuras 3.5.7B y 3.5.8B). Es importante señalar los elevados niveles del componente independiente de K⁺ de la actividad mPPasa observados en todas las condiciones de salinidad en las membranas de *Ch. salina*, lo que sugiere la presencia de cantidades significativas de una segunda H⁺-PPasa independiente de K⁺ en esta microalga marina. Los niveles de polipéptido de H⁺-PPasa de *Chlorella* sp. N64A aumentaron de forma paralela a la actividad por el tratamiento con 150 mM NaCl (Figura 3.5.7C). Desafortunadamente, no fue posible detectar los niveles de polipéptido de H⁺-PPasas en la especie *Ch. salina*, posiblemente debido a que se ha utilizado un anticuerpo heterólogo contra la mPPasa de la bacteria *Thermotoga maritima* que no reconoce a la proteína mPPasa en algunas de las especies estudiadas. En ningún caso los tratamientos salinos produjeron efectos significativos sobre los niveles de actividad sPPasa de la fracción de proteínas solubles de ninguna de las dos especies de *Chlorella* estudiadas (datos no mostrados).

A



B



C

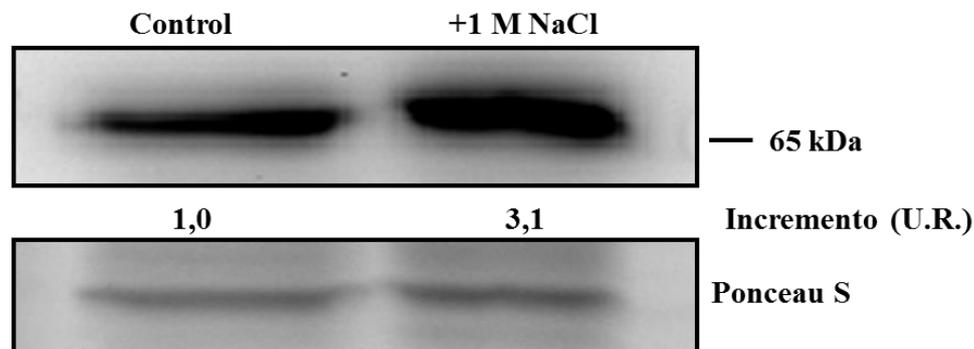


Figura 3.5.9: Efecto de las condiciones de hipersalinidad en el medio de cultivo sobre el crecimiento y los niveles de actividad y proteína H⁺-PPasa de la rodofita termoacidófila *G. sulphuraria*. A) Aspecto final de los cultivos tras 9 días de desarrollo y curvas de crecimiento de los mismos en condiciones estándar (control) y con concentraciones crecientes de NaCl añadido. B) Niveles de actividad específica sPPasa en la fracción soluble (izquierda) y mPPasa en fracciones de membranas (derecha) de cultivos sometidos a las concentraciones salinas indicadas durante 18 h. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. C) Niveles del polipéptido de H⁺-PPasa determinados por *Western blot* en fracciones de membranas de cultivos sometidos a las concentraciones salinas indicadas durante 18 h. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; **, P<0,01; ***, P<0,001).

La rodofita termoacidófila *Galdieria sulphuraria* es una microalga cosmopolita que prolifera en lagunas ácidas y superficie de rocas de zonas volcánicas de todo el planeta. Habitualmente se encuentra en hábitats no especialmente ricos en sodio, pero con altos niveles de metales pesados y azufre. En esta microalga se observó un drástico efecto inhibitor del crecimiento de los cultivos con 0,5 y 1 M NaCl (Figura 3.5.9A). Curiosamente, y en claro contraste con las otras especies estudiadas, se observó una disminución progresiva de los niveles de actividad específica sPPasa en la fracción de proteínas solubles al aumentar la concentración de NaCl empleada en el tratamiento salino, hasta alcanzar a 1M NaCl un 50% de inhibición respecto al control (Figura 3.5.9B). Por el contrario, las concentraciones crecientes de NaCl produjeron un efecto inverso, es decir, un claro incremento de los niveles de actividad y proteína mPPasa en las correspondientes preparaciones de membranas (Figura 3.5.9B y C), en lo que podría ser un mecanismo de respuesta a estrés en este microorganismo: la disminución de la actividad sPPasa dejaría disponible más PPI disponible para el funcionamiento de la H⁺-PPasa, posiblemente porque el gradiente de H⁺ producido por esta proteína puede ser beneficioso para el organismo en situación de estrés. Hay que señalar que *G. sulphuraria* posee tres genes que codifican H⁺-PPasas independientes de K⁺, y estudios previos de nuestro grupo han mostrado que uno de ellos es de expresión constitutiva (Gs15900) y los otros dos se inducen en presencia de fuentes de C orgánicas (Herrera-Palau 2011).

A la vista de estos resultados obtenidos con microalgas podemos concluir que el NaCl posee un efecto inhibitorio sobre las H⁺-PPasas que es más acusado en aquellas que son activadas por K⁺ (tipo I), que son las funcionales en plantas superiores. Esto puede deberse a que el Na⁺ compite con el K⁺ por el mismo sitio de unión, desplazando a este ión y produciendo así una bajada en los niveles de actividad. También se ha observado una inducción tanto a nivel de actividad mPPasa como de los niveles de polipéptido de las H⁺-PPasas en las especies más sensibles al efecto inhibitor sobre el crecimiento del NaCl y en aquellas cuyas H⁺-PPasas muestran mayor sensibilidad a este compuesto.

3.5.2 Efecto de la salinidad en microalgas eucarióticas marinas que poseen posibles Na⁺-PPasas

Existe un tipo especial de mPPasa dependiente de K⁺ capaz de bombear iones de sodio en lugar de protones, conocido como Na⁺-PPasa, inicialmente descrito por el grupo de Prof. Reijo Lahti (Univ. de Turku, Finlandia) en bacterias y arqueas de hábitats ricos en sodio. En un principio se pensaba que las mPPasas sólo podían transportar protones, o iones de potasio aunque esto es aún objeto de controversia, hasta que se descubrieron una serie de mPPasas que podían transportar iones sodio a través de las membranas biológicas de procariotas utilizando para ello la energía de hidrólisis del PPI. Varios estudios filogenéticos sugieren que estas bombas de iones son las mPPasas más ancestrales, predecesoras de las H⁺-PPasas y habrían dado lugar a estas por cambios estructurales en el sitio de unión del canal iónico (Kellosalo, Kajander et al. 2012). La diferencia principal entre Na⁺-PPasas y H⁺-PPasas reside en un residuo de ácido glutámico (E242, según la numeración de la Na⁺-PPasa de la bacteria *Chlorobium limicola*), indispensable para el mecanismo de transporte del ión, que se encuentra en la α -hélice 6 en las Na⁺-PPasas y es sustituido por un residuo glicina en la α -hélice 6 de las H⁺-PPasas (Luoto, Nordbo et al. 2013). Hasta la fecha solo se conocía la presencia de este tipo de mPPasas en las membranas de algunas bacterias y arqueas que desarrollan una bioenergética basada en el sodio, como *Methanosarcina mazei* o *Morella thermoacetica* (Malinen, Belogurov et al. 2007). Gracias a búsquedas y análisis informáticos de secuencias disponibles en bases de datos y en proyectos genoma y transcriptomas, hemos conseguido identificar genes que codifican posibles Na⁺-PPasas similares a sus ortólogos procarióticos en numerosas especies de microalgas marinas de filogenia muy diversa (Prasinofíceas, Estramenópilos, Criptofitas, Haptofitas, Clorarracniofitas, Rodófitas...). Hemos elegido tres especies de microalgas marinas cuyos genomas codifican posibles Na⁺-PPasas y se pueden cultivar en laboratorio para caracterizar inicialmente las mPPasas presentes en sus membranas, concretamente una especie de clorofita de la clase Prasinofíceas (*Ostreococcus tauri*), una rodofita unicelular (*Porphyridium purpureum*) y un estramenópilo de la clase Bacillariofíceas (Diatomeas) (*Phaeodactylum tricorutum*) (Tabla VIII). Hay que señalar que según datos

obtenidos de colecciones de ESTs, las posibles Na⁺-PPasas de estas microalgas presentan altos niveles de expresión en condiciones estándar de cultivo, siendo las mPPasas con mayores niveles de expresión en relación a sus parálogos transportadores de H⁺ (A. Serrano, comunicación personal).

Tabla VIII: Genes que codifican mPPasas en los genomas de las microalgas marinas estudiadas.

<i>O. tauri</i>	Códigos UniProtKB (genes/proteínas)
H ⁺ -PPasa	ostta01g00980/A0A090M1W8_OSTTA
Na ⁺ -PPasa	ostta01g03420/A0A090M3V7_OSTTA
H ⁺ -PPasa K ⁺ -indep.	ostta04g03800/A0A090M4R4_OSTTA
<i>Ph. tricornutum</i>	Códigos UniProtKB (genes/proteínas)
H ⁺ -PPasa	PHATR_21183/B5Y460_PHATC
Na ⁺ -PPasa	PHATRDRAFT_15815/B7G9Z6_PHATC
H ⁺ -PPasa K ⁺ -indep.	PHATRDRAFT_26190/B7FUG0_PHATC
<i>P. purpureum</i>	Códigos del genoma (draft)
Na ⁺ -PPasa1	contig_2255.10, AROW01001170.1; 1075 aa
Na ⁺ -PPasa2	contig_2623.1, AROW01001538.1; 1080aa
H ⁺ -PPasa K ⁺ -indep.	contig_704.2, AROW01000398.1; 761 aa

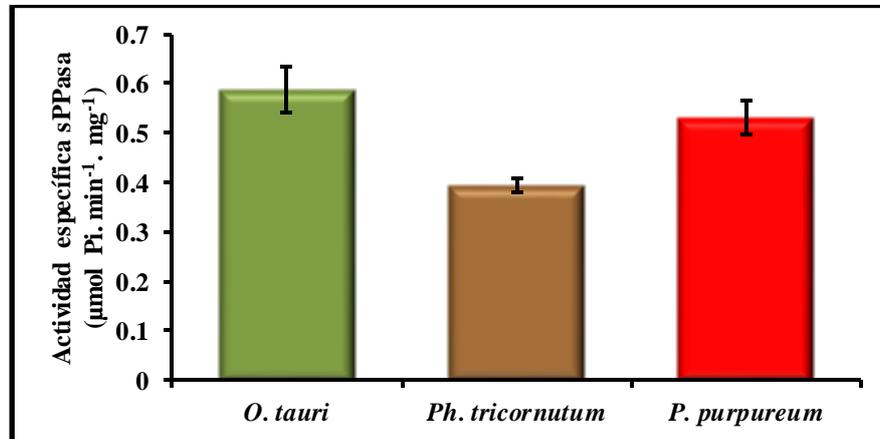
3.5.2.1 Evidencias de que la actividad mPPasa de las tres microalgas marinas (prasinofícea, bacillariofícea, rodofita) estudiadas es debida a Na⁺-PPasas

Se cultivaron los organismos en sus respectivos medios en condiciones estándar de crecimiento, todos ellos con agua marina natural, y los cultivos se dejaron crecer hasta saturación. Se recogieron las células por centrifugación y se obtuvieron extractos celulares de todos ellos, separando por ultracentrifugación la fracción de proteínas solubles y la fracción particulada de membranas totales. Una vez obtenidos estos extractos se procedió a determinar los niveles de actividad PPasa presente en cada uno de ellos, diferenciando en las fracciones particuladas de membrana la actividad mPPasa en presencia o ausencia de 100 mM KCl en el ensayo.

Se apreciaron niveles similares de actividad sPPasa, aprox. 0,5 U/mg, en la fracción de proteínas solubles de *O. tauri* y *P. purpureum*, y ligeramente menores en la diatomea *Ph. tricornutum* (Figura 3.5.10A), aunque en las tres especies eran claramente inferiores (aprox. un 50%) a los niveles descritos en apartados anteriores para microalgas Clorofitas. Cabe destacar la presencia en los genomas de las tres especies de genes que codifican sPPasas de la Familia

II, habiendo sido caracterizada por nuestro grupo la de *O. tauri* (Albi T. Tesis Doctoral 2008), aunque en este estudio no se ha llevado a cabo la determinación de los niveles de actividad de estas enzimas.

A



B

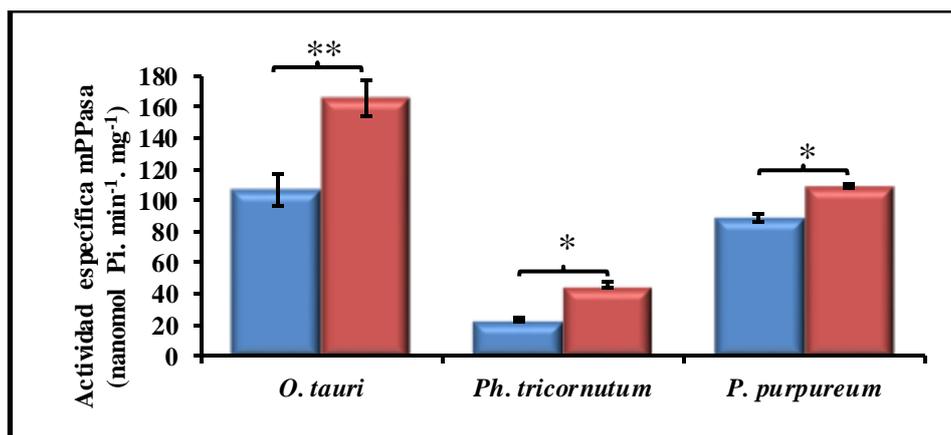


Figura 3.5.10: Niveles de actividades sPPasa y mPPasa en las especies de microalgas marinas utilizadas en este estudio. A) Actividad específica sPPasa en la fracción de proteínas solubles. B) Actividad específica mPPasa en las fracciones particuladas de membranas. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01).

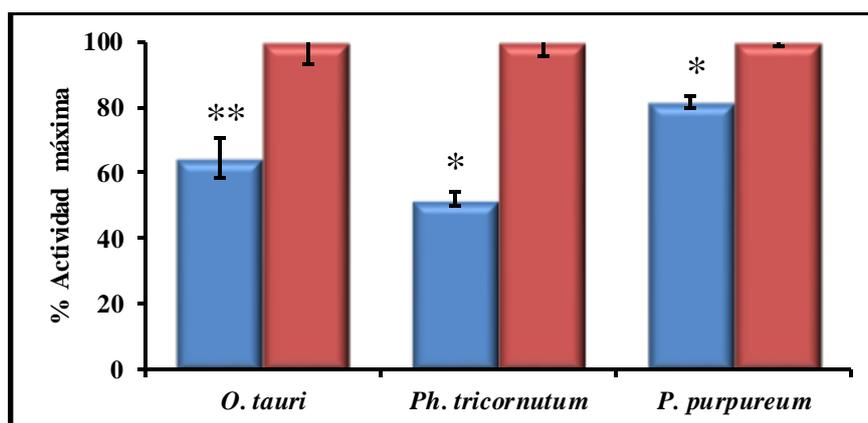
Se pudo apreciar asimismo actividad mPPasa estimulada por potasio asociada a las fracciones de membranas en las tres microalgas marinas estudiadas (Figura 3.5.10B). Aunque los niveles de actividad específica ensayada en presencia de KCl presentaron variaciones significativas entre ellas, oscilando desde 150 mU/mg en *O. tauri* -similar a los descritos en apartados anteriores para otras Clorofitas- hasta 50 mU/mg en la diatomea *Ph. tricornutum*; la estimulación por potasio de la actividad mPPasa fue bastante reducida en las tres especies, especialmente en el caso de la rodofta *P.*

purpureum, por lo que la mayor parte de la actividad mPPasa observada era atribuible al componente de actividad insensible a potasio (Figura 3.5.10B). Hay que señalar a este respecto la existencia de genes que codifica una H⁺-PPasa independiente de K⁺ en los genomas de estas microalgas, aunque los datos de transcriptomas disponibles en bases de datos indican que estos genes o no se transcriben o lo hacen a niveles muy bajos, al igual que ocurre con sus ortólogos de plantas.

Para conocer mejor el efecto del potasio en la actividad mPPasa asociada a membranas de estas especies se calculó el porcentaje de activación que en cada caso ocurría en presencia de 100 mM KCl en la mezcla de ensayo, y se realizó una titulación de la estimulación producida en la actividad mPPasa por concentraciones crecientes de potasio en el ensayo (en el rango 0-400 mM KCl).

Mientras que en *O. tauri* y *Ph. tricornutum* se producía una estimulación significativa por potasio de los niveles de actividad mPPasa asociada a membranas (60% aproximadamente), en la rodofita *P. purpureum* sólo se produjo un 20% de activación (Figura 3.5.11A). Esta diferencia podría deberse a que las membranas de esta última especie contengan niveles comparativamente altos de una H⁺-PPasa independiente de K⁺, o a la presencia de un tipo de mPPasa diferente a las descritas hasta ahora en microalgas, como por ejemplo una Na⁺-PPasa. Esta propuesta no es de fácil comprobación por *Western blotting* ya que el anticuerpo anti-mPPasa utilizado no discrimina entre los diferentes tipos de mPPasas, los cuales tienen un alto grado de conservación estructural (Tsai, Kellosalo et al. 2014). En las curvas de activación por concentraciones crecientes de KCl (hasta 400 mM) se aprecia que la actividad mPPasa de *O. tauri* fue la más activada por la presencia de KCl mientras que *Ph. tricornutum* presentó la menor activación, aunque en ningún caso se alcanzó una activación máxima significativamente superior al doble de la actividad determinada en ausencia de potasio en el ensayo (Figura 3.5.11B).

A



B

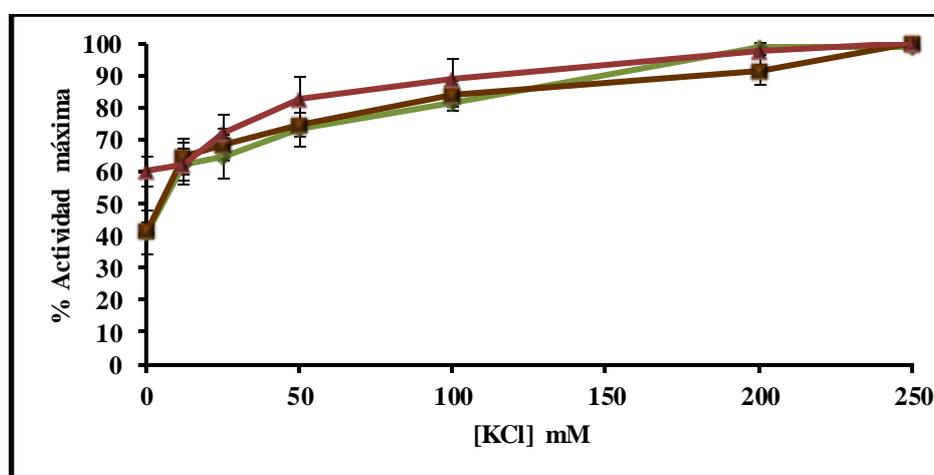


Figura 3.5.11: Caracterización de la dependencia de potasio de la actividad mPPasa de las especies de microalgas marinas estudiadas. A) Estimulación por potasio de la actividad mPPasa en preparaciones de membranas, expresada como porcentaje con respecto a la actividad máxima. Barras rojas: sin; barras azules, +100 mM KCl. B) Curvas de titulación de la estimulación por potasio de la actividad mPPasa en cada una de las especies. Rombo verdes: *O. tauri*; cuadrado marrones: *Ph. tricornutum*; triángulos rojos: *P. purpureum*. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01).

3.5.2.2 Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa de preparaciones de membranas de las microalgas marinas estudiadas

Dado que los análisis informáticos mostraron que las tres especies de microalgas marinas seleccionadas para este estudio -la prasinofícea *O. tauri*, la diatomea *Ph. tricornutum* y la rodofita *P. purpureum*- poseen en sus genomas genes de Na⁺-PPasas que se transcriben activamente bajo diversas condiciones ambientales, normales y de estrés (A. Serrano, comunicación personal), era de especial interés realizar una caracterización funcional de la actividad mPPasa asociada a sus preparaciones de membranas, especialmente en lo referente a la

inhibición por sodio en el ensayo, así como sobre la toxicidad de este catión a nivel celular.

Para evaluar el efecto del sodio *in vitro* sobre la actividad mPPasa de preparaciones de membranas de cada una de las especies se llevaron a cabo medidas de dicha actividad suplementando las mezclas de ensayo con concentraciones crecientes de NaCl, en el rango 0-300 mM. Estas medidas se realizaron tanto en presencia como en ausencia de 100 mM KCl en el ensayo. (Figura 3.5.12). Las membranas de la prasinofícea *O. tauri* no mostraron una inhibición significativa de la actividad mPPasa por concentraciones “fisiológicas” de sodio (inferiores a 50 mM), siendo este efecto significativo únicamente a concentraciones superiores a 150 mM NaCl. En cambio, la actividad mPPasa de *Ph. tricornutum* mostró una ligera activación a concentraciones fisiológicas de sodio (10 mM) y no se observó ningún efecto inhibitorio significativo por concentraciones de NaCl superiores. Finalmente, la presencia de NaCl causó un efecto estimulador sobre la actividad mPPasa de la rodofita *P. purpureum* a todas las concentraciones empleadas, aunque presentaba un máximo a 10 mM, una concentración cercana al nivel fisiológico de sodio intracelular. Este requerimiento de Na⁺ es una característica de las Na⁺-PPasas procarióticas estudiadas hasta la fecha, y sugiere que la totalidad o la mayor parte de la actividad mPPasa de las preparaciones de membranas de esta microalga es debida a la presencia de una Na⁺-PPasa funcional. El efecto inhibitorio del sodio fue en las tres microalgas marinas claramente menor que el observado con las preparaciones de membranas de las otras microalgas analizadas en apartados anteriores, las cuales carecen de este tipo de mPPasas.

El hecho de que las microalgas marinas con genes de posibles Na⁺-PPasas en sus genomas presenten, en contraste con otras microalgas, una actividad mPPasa con una gran tolerancia o incluso activación por sodio es una evidencia indiscutible de que sus membranas contienen un tipo de mPPasa no descrito hasta ahora en sus membranas (las Na⁺-PPasas) o que aun siendo del mismo tipo, presentan características catalíticas diferentes que mejoren su funcionalidad en entornos salinos.

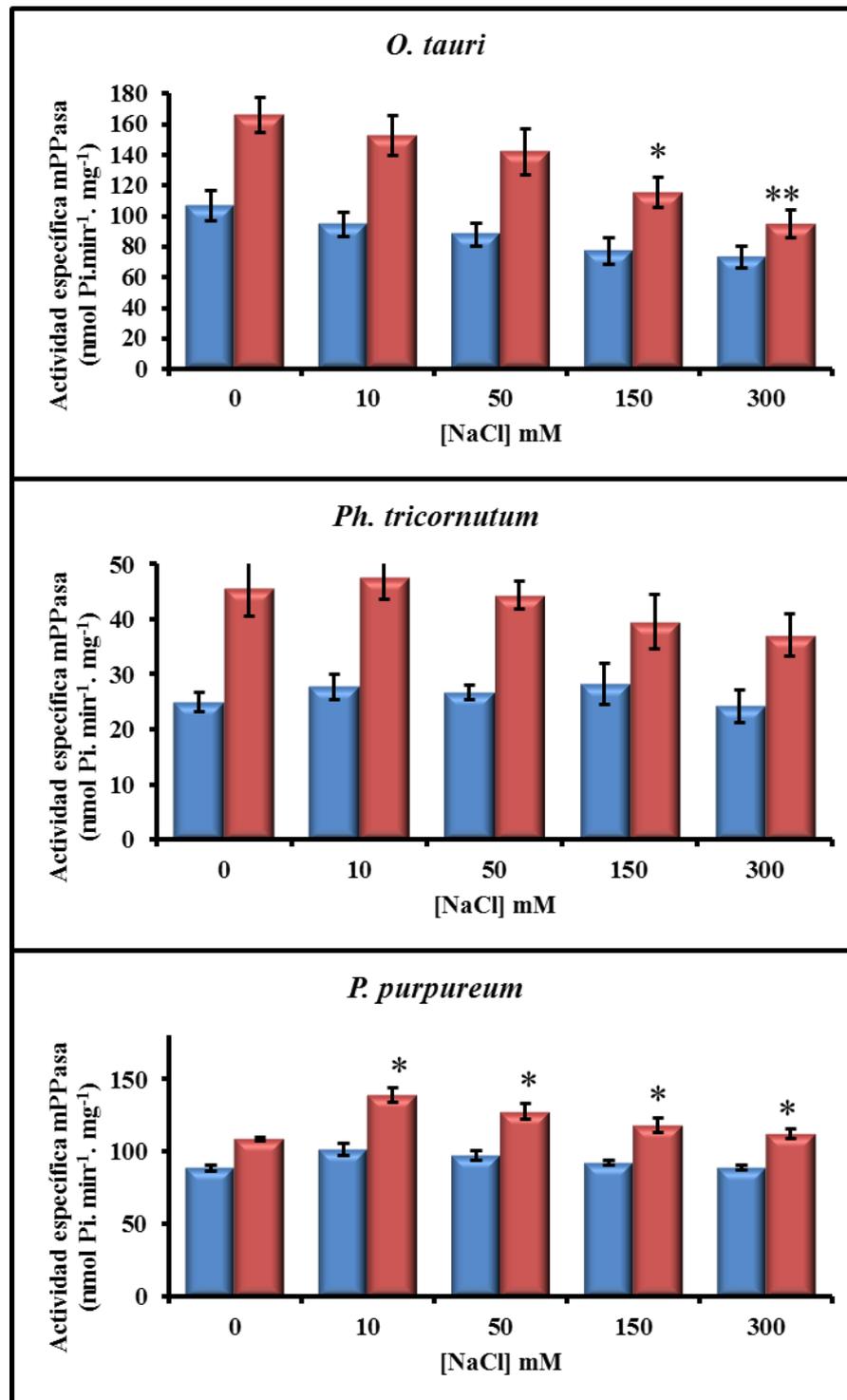


Figura 3.5.12: Efecto de la presencia de NaCl en el ensayo de actividad mPPasa de preparaciones de membranas de tres microalgas marinas con genes de Na⁺-PPasas en sus genomas. La actividad se determinó en presencia de las concentraciones indicadas de NaCl en el ensayo. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01).

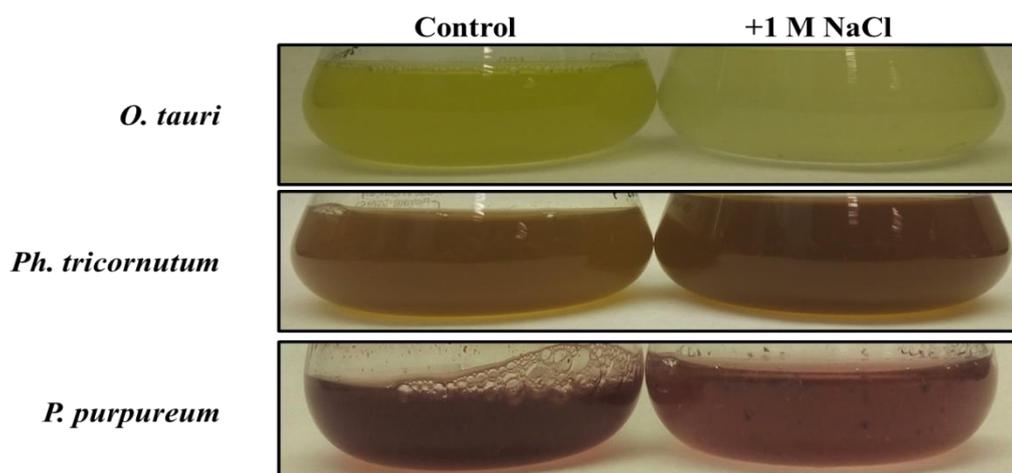
3.5.2.3 Efecto del sodio en el medio de cultivo sobre la actividad mPPasa asociada a membranas de las microalgas marinas estudiadas

Para completar este estudio se sometieron las tres microalgas marinas a un choque salino con 1 M NaCl durante 18 h. Para ello todas las especies se cultivaron fotoautotróficamente en medios basados en agua de mar suplementados o no con la citada concentración de NaCl. Las células tratadas se recogieron por centrifugación y se obtuvieron extractos celulares, separando la fracción de proteínas solubles de la fracción particulada de membranas, y se determinaron en todas ellas los niveles de actividad específica sPPasa y mPPasa. Los valores de actividad PPasa obtenidos se compararon con los obtenidos de células sin tratar.

Se observó una disminución del crecimiento de los cultivos suplementados con 1 M NaCl de *O. tauri* y *P. purpureum*, siendo más acusado en el caso de la primera especie. Por el contrario, se observó un crecimiento ligeramente mayor del cultivo con 1 M NaCl en el caso de la diatomea *Ph. tricornutum*. (Figura 3.5.13A). En cuanto a la actividad mPPasa asociada a membranas, no se observó ningún efecto significativo del choque hipersalino sobre los niveles de actividad específica de las especies *Ph. tricornutum* y *P. purpureum*, mientras que sí se observó un aumento significativo en *O. tauri*, concretamente de la actividad determinada en presencia de KCl en la mezcla de ensayo (Figura 3.5.13B).

De forma análoga a lo que ocurría en el apartado anterior, el incremento de actividad mPPasa asociada a membrana fue mayor en *O. tauri*, la especie que presentaba una mayor dependencia de KCl en su actividad.

A



B

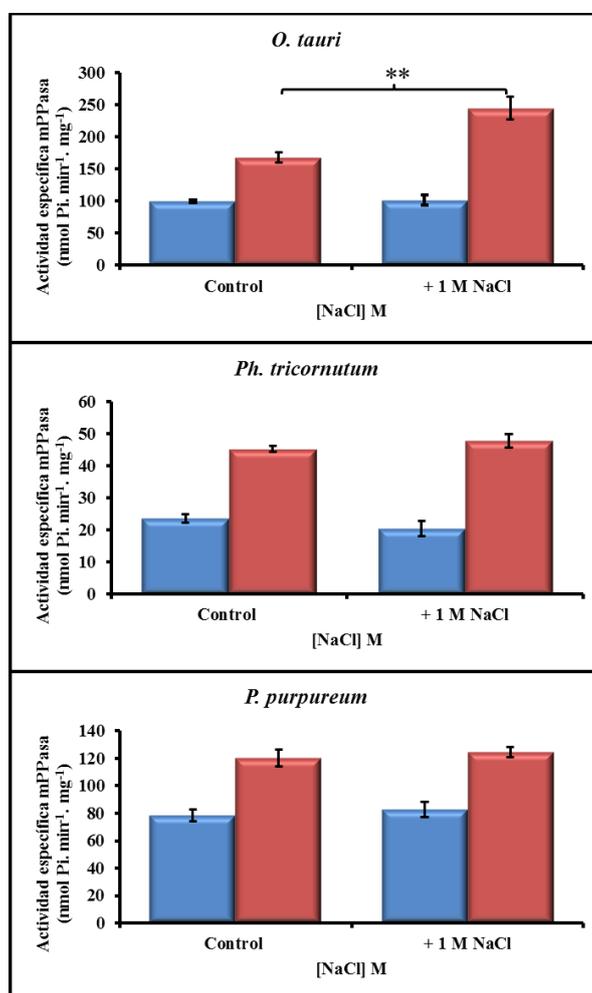


Figura 3.5.13: Efecto de un choque hipersalino en el medio sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de actividad mPPasa de *O. tauri*, *Ph. tricornutum* y *P. purpureum*. A) Aspecto de los cultivos desarrollados con 1 M NaCl o sin sal suplementaria durante 9 días. **B)** Niveles de actividad mPPasa de preparaciones de membranas de cultivos sometidos o no a choque hipersalino durante 18 h. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05).

Solo pudo detectarse el polipéptido de mPPasa por *Western blot* en las preparaciones de membranas de *O. tauri*, aunque en este caso no se observó un aumento significativo de los niveles de la proteína en las membranas obtenidas de células sometidas a choque hipersalino (Figura 3.5.14), lo que sugiere una regulación de la actividad enzimática más que cambios en los niveles de la proteína por activación génica tras el tratamiento salino.

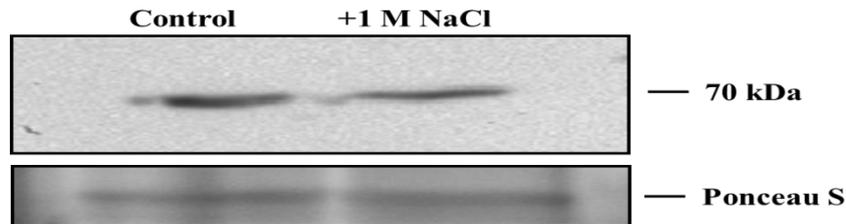


Figura 3.5.14: Niveles del polipéptido de mPPasa en preparaciones de membranas de células de *O. tauri* sometidas o no a un choque hipersalino. Se determinaron por *Western blot* de fracciones de membranas de cultivos sometidos a las concentraciones salinas indicadas durante 18 h. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga.

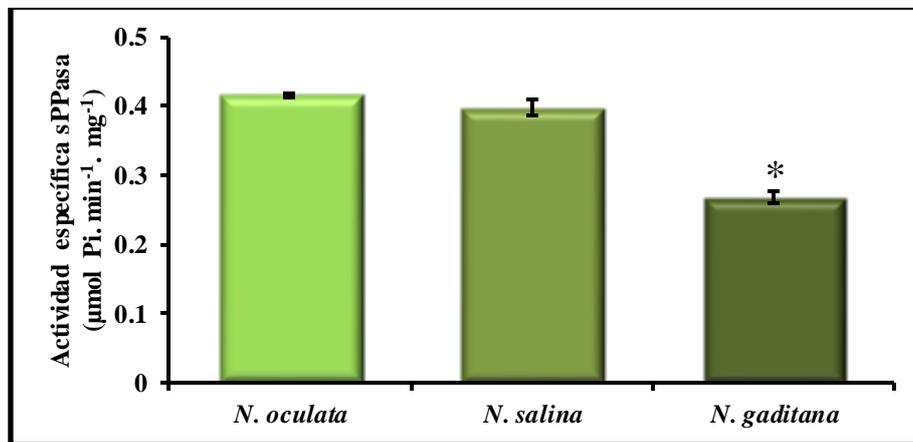
3.5.3 Las microalgas Eustigmatofíceas marinas poseen una actividad mPPasa independiente de K⁺ asociada a membranas con alta tolerancia a sodio que es inducida por choque salino

Hasta la fecha se tenía constancia de una única especie de microalga cuya actividad mPPasa asociada a membranas no fuese estimulada por la presencia de potasio en el ensayo: la rodofita termoacidófila *G. sulphuraria*. Durante el desarrollo del presente estudio, hemos podido identificar otras tres especies que presentaban esta inusual característica en cuanto a su actividad mPPasa. Todas ellas son especies marinas pertenecientes al género *Nannochloropsis*, un grupo perteneciente a la clase Eustigmatofíceas, dentro del supergrupo de los Estramenópilos (Hererocontofitas). Este género se diferencia de otros grupos de algas por carecer completamente de clorofila b y c (Andersen, Brett et al. 1998), además son capaces de acumular cantidades muy elevadas de ácidos grasos poliinsaturados (Lubián, Montero et al. 2000). Concretamente, las tres especies que se han analizado en este trabajo son *N. oculata*, *N. salina* y *N. gaditana*, siendo todas ellas microorganismos que proliferan en hábitats marinos costeros. En concreto, la última de las especies citadas, cuyo genoma ha sido secuenciado recientemente, fue aislada en el año

1982 de la Bahía de Cádiz, ahí su nombre de especie (Lubián 1982). *N. gaditana* posee dos genes que codifican H⁺-PPasas (Naga_100065g14 y Naga_100030g25): una dependiente de K⁺ (W7TN19_9STRA) y otra independiente de K⁺ (W7T9J2_9STRA).

Las tres microalgas eustigmatofíceas se cultivaron en medio marino F/2 hasta alcanzar la fase estacionaria, y se recogieron mediante centrifugación para proceder a su rotura celular y la obtención de las fracciones de proteínas solubles y de membrana de cada una de ellas. Una vez obtenidas las diferentes fracciones, se determinó las actividades sPPasa y mPPasa de las mismas. La actividad mPPasa de las fracciones de membranas se determinó tanto en presencia como en ausencia de 100 mM de KCl en el ensayo.

A



B

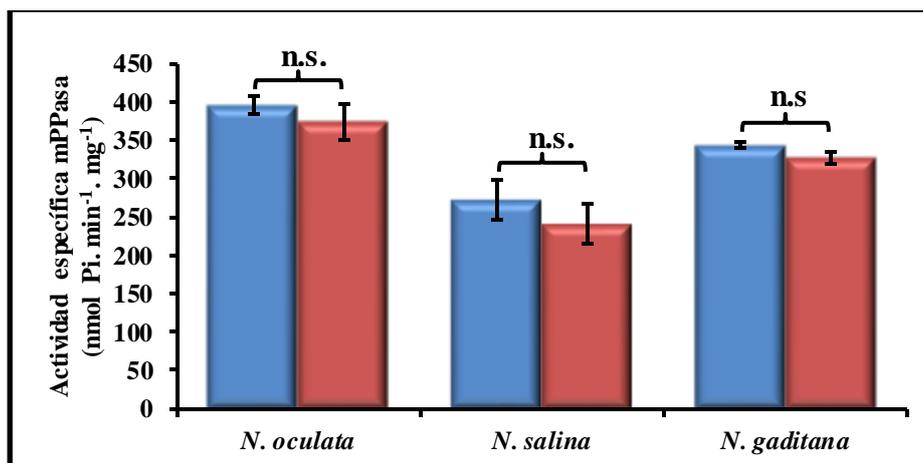


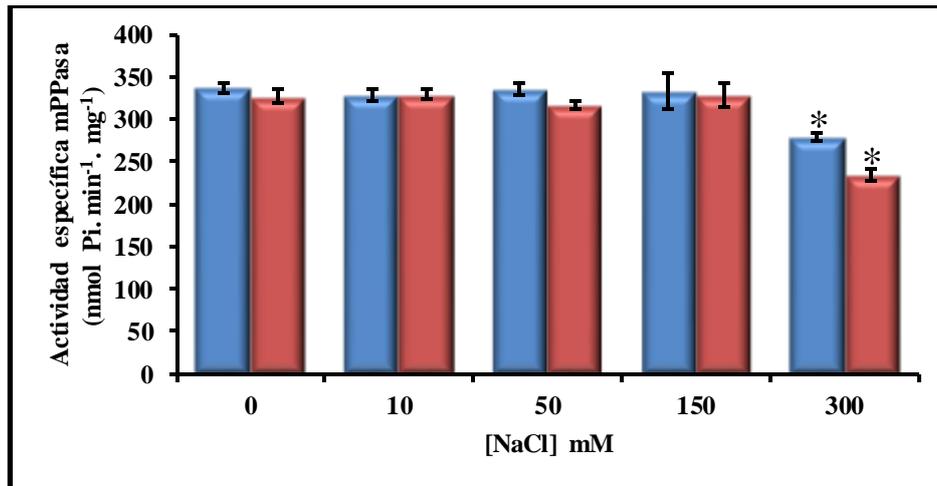
Figura 3.5.15: Niveles de actividades sPPasa y mPPasa en extractos celulares de las especies de microalgas Eustigmatofíceas marinas utilizadas en este estudio. A) Actividad específica sPPasa en la fracción de proteínas solubles. B) Actividad específica mPPasa en las fracciones particuladas de membranas. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; n.s., no significativo).

Todas las especies presentaron niveles de actividad específica sPPasa comparables a los de las otras especies marinas estudiadas (aprox. 0,5 U/mg), siendo ligeramente inferior en la especie *N. gaditana* (Figura 3.5.15A). Como ya se ha comentado, las preparaciones de membranas de las tres eustigmatofíceas marinas presentaron niveles elevados (300-400 mU/mg) de una actividad mPPasa que no se estimulaba por la presencia de potasio en el ensayo, incluso se apreció una cierta inhibición por este ión (Figura 3.5.15B), y eran superiores a los observados en la mayoría de microalgas marinas y dulceacuícolas estudiadas en esta Tesis. Por tanto, las membranas de estas eustigmatofíceas marinas únicamente contienen H⁺-PPasas independientes de K⁺, un escenario hasta ahora solo hallado en la rodofita thermoacidófila *G. sulphuraria*, lo cual sugiere que los casos de protistas que utilizan únicamente este tipo de mPPasas pueden ser más comunes de lo que se hasta ahora se pensaba, especialmente entre organismos sometidos a condiciones crónicas de estrés, como la salinidad. La significación fisiológica para la microalga de este cambio funcional de la mPPasa está aún por clarificar, pero podría ser una ventaja adaptativa si se tiene en cuenta que, como se ha demostrado anteriormente en esta Tesis, las H⁺-PPasas independientes de K⁺ son más tolerantes a la inhibición por sodio que sus homólogas dependientes de K⁺.

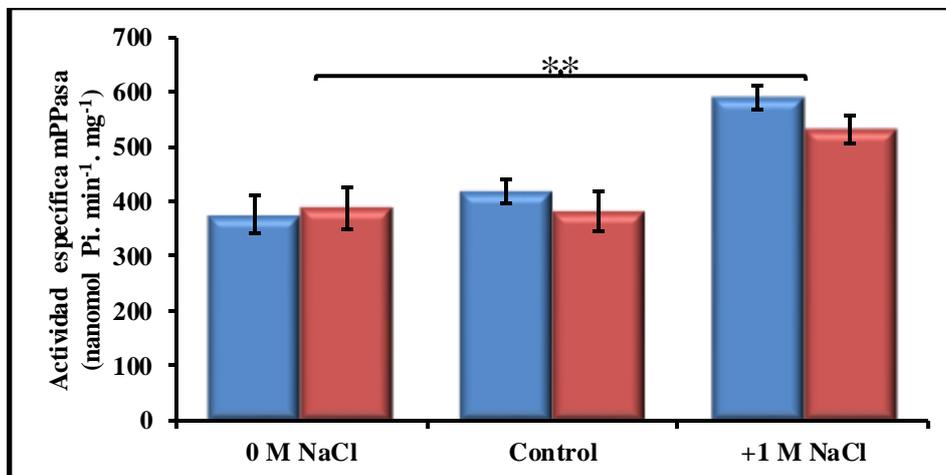
Debido a la especial característica de la mPPasa asociada a membranas de las microalgas eustigmatofíceas, y para confirmar esta propuesta, se decidió evaluar el efecto de la salinidad sobre la misma en la especie *N. gaditana*, tanto *in vitro*, en el ensayo, como *in vivo* sometiendo los cultivos a choque hipersalino. Para ello, se evaluó el efecto sobre la actividad de concentraciones crecientes de sodio (hasta 300 mM NaCl) en la mezcla de ensayo (Figura 3.5.16A), y se determinaron los niveles de actividad específica mPPasa en preparaciones de membranas de células cultivadas en fotoautotróficamente en medio F/2 hasta alcanzar la fase estacionaria, y posteriormente sometidas a choque hipersalino (adición 1 M de NaCl) durante 18 h (Figura 3.5.16B). Además se determinación por *Western blotting* los niveles del polipéptido H⁺-PPasa en las fracciones de membrana de cada uno de los cultivos (Figura 3.5.16C).

De acuerdo con resultados previamente presentados en esta Tesis, la actividad mPPasa independiente de K^+ asociada a membranas de *N. gaditana* presentó una alta tolerancia a la presencia de NaCl en la mezcla de ensayo, viéndose afectada de forma significativa únicamente a 300 mM NaCl, la mayor concentración utilizada, la cual además parece potenciar el efecto inhibitor del potasio (Figura 3.5.16A). Estos resultados refuerzan la propuesta de que la dependencia por potasio de las H^+ -PPasas debe estar mecanísticamente relacionada con su sensibilidad al sodio, siendo las de tipo I o dependientes de K^+ (que son funcionales en plantas, y muchos protistas y procariontas) altamente inhibibles por sodio, y las de tipo II o independientes de K^+ . (cuya funcionalidad en plantas no está clara, pero están presentes en muchos protistas y procariontas) muy tolerantes a este catión, como se ha demostrado en esta Tesis. Hay que señalar que los cultivos sometidos a choque hipersalino (1 M de NaCl) o desarrollados en ausencia de sal no mostraron diferencias fenotípicas evidentes comparados con el cultivo desarrollado en condiciones estándar de salinidad (0.3 M NaCl), con lo que *Nannochloropsis* se ha revelado como uno de los géneros de microalgas más adaptables a las alteraciones en salinidad, una característica de gran valor biotecnológico. Por otra parte, la actividad específica mPPasa de las membranas de células cultivadas en ausencia de sal no varió con respecto al cultivo control, mientras que presentó niveles significativamente superiores en las membranas de las células cultivadas en presencia de 1 M de NaCl (Figura 3.5.16B). Un comportamiento paralelo se pudo observar en la determinación de los niveles del polipéptido mPPasa mediante *Western blotting*, siendo su nivel claramente mayor en las células tratadas con 1 M NaCl (Figura 3.5.16C), lo que sugiere una regulación de la síntesis de proteína por las condiciones salinas. Estos resultados fueron similares a los observados en la rodofita *G. sulphuraria*, muy alejada filogenéticamente de *Nannochloropsis*, lo que indica el alto valor adaptativo de los mecanismos de regulación de las mPPasas en estas microalgas.

A



B



C

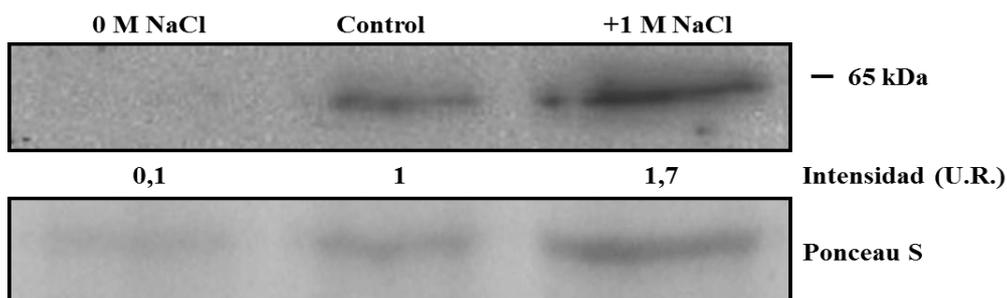


Figura 3.5.16: Efecto de la salinidad sobre la actividad mPPasa de la eustigmatofícea *N. gaditana*. A) Niveles de actividad mPPasa determinada en presencia de concentraciones crecientes de NaCl en la mezcla de ensayo. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. B) Efecto de la salinidad del medio de cultivo sobre los niveles de actividad mPPasa de preparaciones de membranas. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. C) Niveles del polipéptido H⁺-PPasa determinados por *Western blotting* en fracciones de membranas de cultivos desarrollados con las concentraciones de NaCl indicadas durante 18 h. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01).

3.5.4 Efecto regulador de las condiciones tróficas de cultivo sobre las H⁺-PPasas de microalgas

En trabajos previos del grupo, se llevaron a cabo los primeros estudios sobre el efecto regulador de las condiciones tróficas de cultivo sobre las H⁺-PPasas de la clorofita *C. reinhardtii* y la rodofita *G. sulphuraria* (Herrera-Palau, 2011; López-Marqués, 2004). Sin embargo, esos trabajos se centraron principalmente sobre regulación de la expresión génica y, además, no contemplaron todos los escenarios tróficos posibles. En este trabajo se ha tratado de completar esos resultados previos para tratar de tener una visión más global sobre el tema. Entender cómo afectan a las mPPasas las condiciones nutricionales que determinan el crecimiento de las microalgas puede proporcionar una información muy útil sobre el comportamiento de las plantas superiores y sus H⁺-PPasas ante estos factores.

Para este estudio hemos utilizado tres especies de microalgas de genomas secuenciados y con características diferenciales, tanto en sus condiciones de cultivo como en el tipo de H⁺-PPasa que presentan sus membranas. Dos clorofitas: *C. reinhardtii*, que en su genoma sólo posee un gen que codifica una H⁺-PPasa dependiente de K⁺ y utiliza acetato como fuente de carbono orgánico, y *Chlorella* sp. N64A, cuyo genoma contiene dos genes que codifican H⁺-PPasas, una independiente y otra dependiente de K⁺, y utiliza glucosa como fuente de carbono orgánico. La tercera microalga analizada fue la rodofita termoacidófila *G. sulphuraria* que tiene tres genes que codifican H⁺-PPasas independientes de K⁺ y también utiliza glucosa como fuente de carbono orgánico. Para las condiciones fotoautotróficas de cultivo, las microalgas se cultivaron bajo luz blanca continua y en agitación en sus respectivos medios específicos (medio Sueoka con nitrato para las dos clorofitas, y medio ácido específico para *Galdieria*). También se cultivaron bajo luz continua en condiciones mixotróficas, suplementando los medios con 14,7 mM de acetato sódico en el caso de *C. reinhardtii* o con glucosa 17 mM en el caso de las otras dos especies. Para las condiciones heterotróficas se utilizaron medios suplementados de la misma forma que para las mixotróficas, pero en este caso los cultivos se desarrollaron en absoluta oscuridad cubriendo los recipientes con una doble capa de papel de aluminio. Los cultivos se desarrollaron hasta fase

exponencial y las células se recogieron por centrifugación para preparar las fracciones de proteínas solubles y particulada de membranas que se utilizaron para determinar respectivamente los niveles de actividad sPPasa y mPPasa y sus polipéptidos por *Western blot*. Para la inmunodetección de la sPPasa de *C. reinhardtii* se utilizaron anticuerpos específicos para la sPPasa plastídica sPPA1 y su homóloga mitocondrial sPPA2 previamente generados por nuestro grupo (Gómez-García, Losada et al. 2006), y para las H⁺-PPasas se empleó un anticuerpo contra la Na⁺-PPasa de *T. marítima*, también generado por nuestro grupo (Drake, Serrano et al. 2010).

El crecimiento de los cultivos de *C. reinhardtii* fue similar en condiciones de autotrofia y heterotrofia, pero fue mucho mayor en condiciones de mixotrofia, alcanzando este cultivo en la fase estacionaria un valor de más del doble de concentración de clorofila que los dos restantes. En cuanto a la regulación de sus PPasas, se apreció un ligero aumento de actividad PPasa soluble y un aumento en los niveles de polipéptidos de la PPasa soluble cloroplástica (sPPA1), mientras que no se observó ningún efecto evidente sobre la actividad y hubo un ligero aumento de los niveles de polipéptido de la sPPasa mitocondrial (sPPA2) tanto en heterotrofia como en mixotrofia. Los datos de actividad y niveles de polipéptido de la H⁺-PPasa fueron similares en estudios previos del grupo, aunque en nuestro trabajo se apreció una caída significativa, pero moderada, de los niveles de actividad PPasa asociada a membrana en condiciones de mixotrofia. Este efecto fue más evidente en condiciones de heterotrofia, como ya se observó en estudios anteriores (Herrera-Palau, 2011) (Figura 3.5.17).

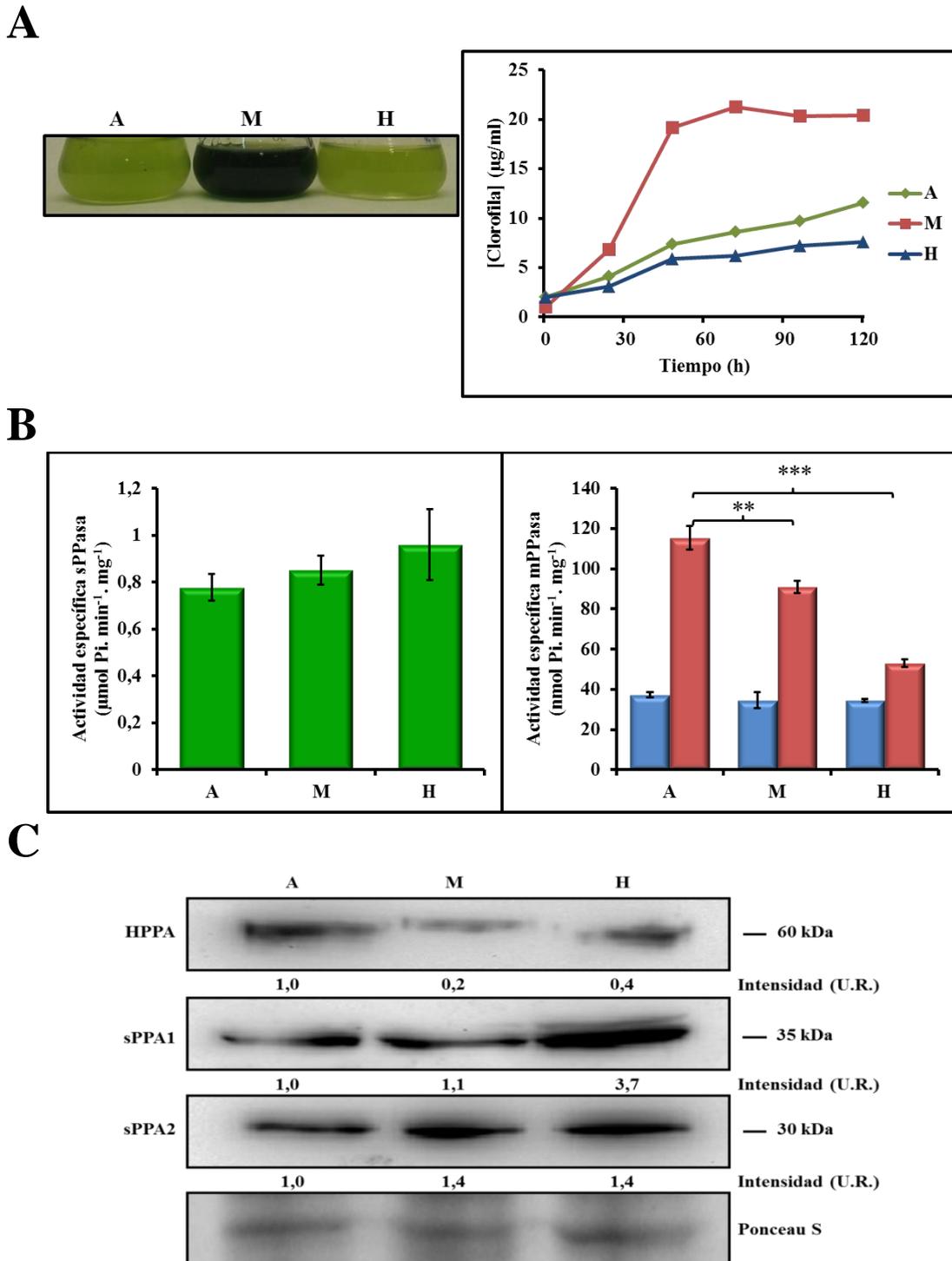


Figura 3.5.17: Efecto de las condiciones tróficas sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de las PPasas de *C. reinhardtii*. A) Aspecto final de los cultivos tras 5 días de desarrollo y curvas de crecimiento de los mismos en las distintas condiciones tróficas indicadas (A, autotrofia; M, mixotrofia; H, heterotrofia). B) Niveles de actividad específica sPPasa en la fracción soluble (izquierda) y mPPasa en fracciones de membranas (derecha) de cultivos desarrollados en las condiciones indicadas. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo de la mPPasa. C) Niveles de los polipéptidos de la H⁺-PPasa HPPA, la sPPasa plástica sPPA1, y sPPasa mitocondrial sPPA2 determinados por Western blot en fracciones de membranas de los diferentes cultivos. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; n.s., no significativo).

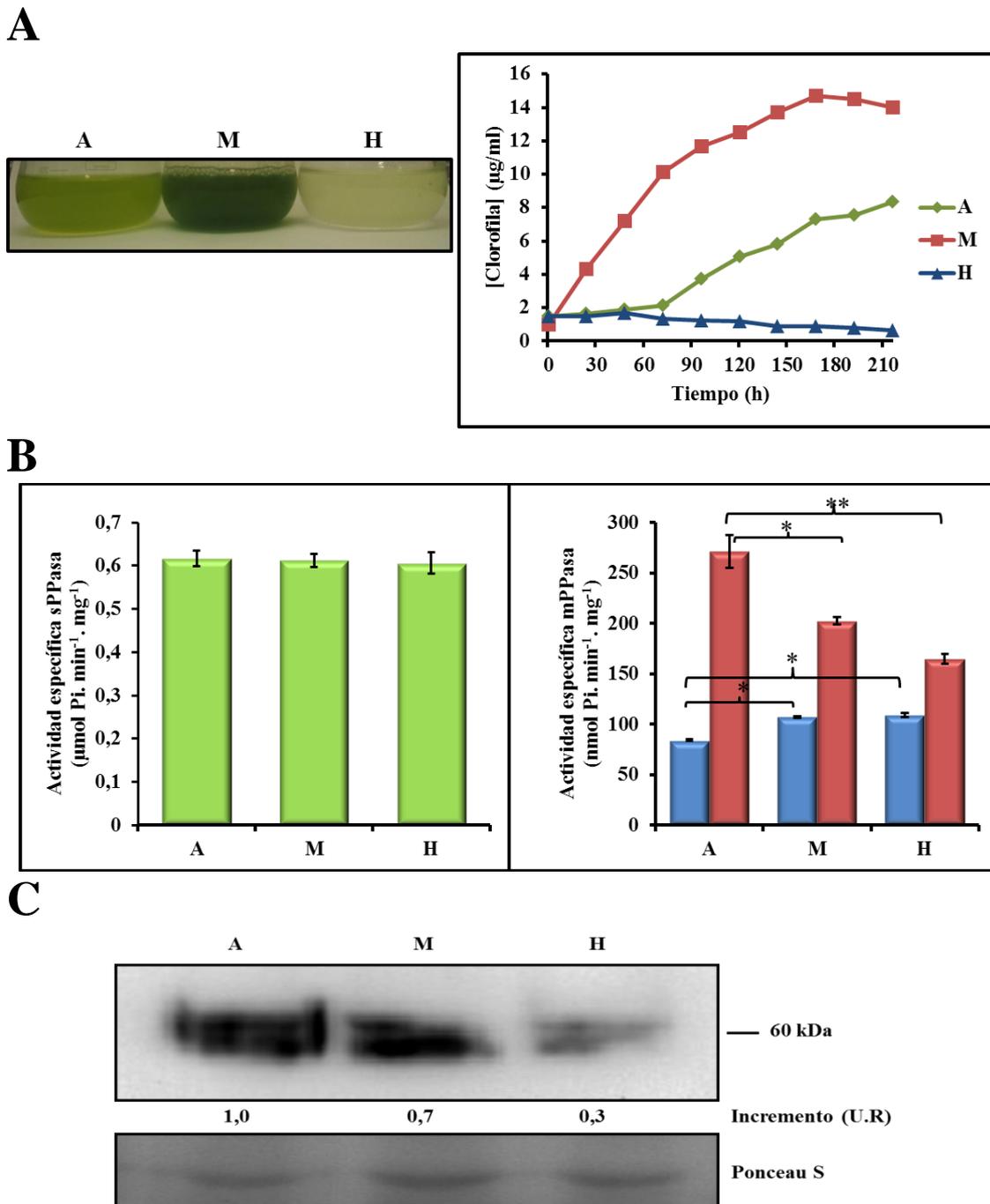
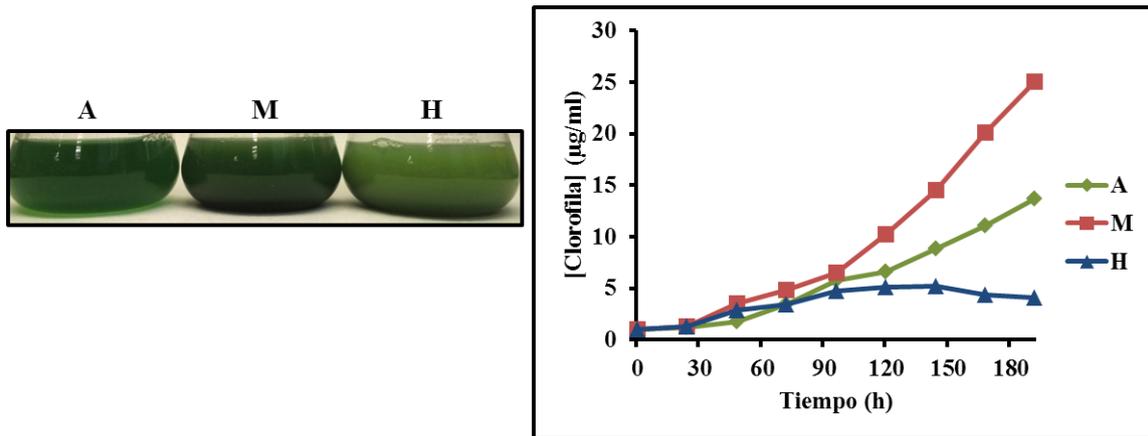


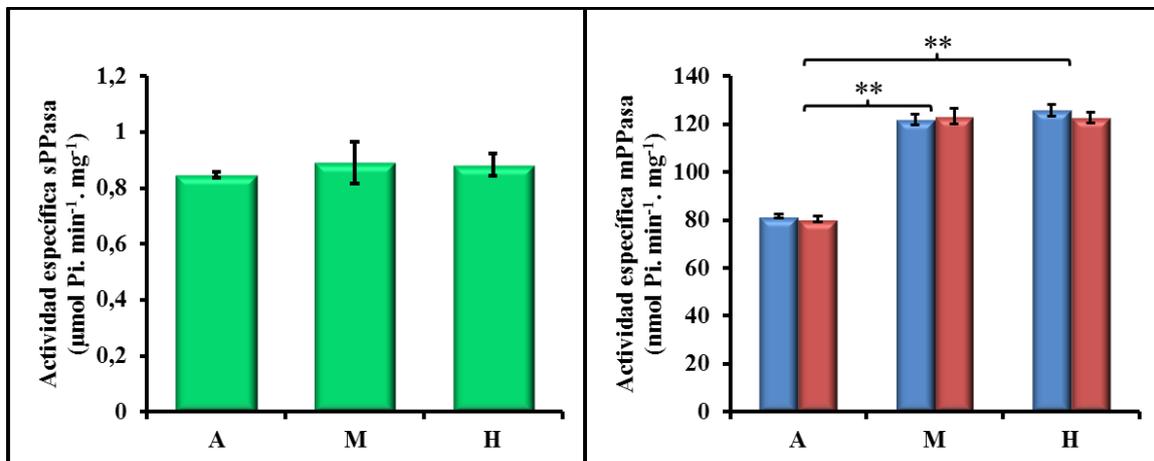
Figura 3.5.18: Efecto de las condiciones tróficas sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de las PPasas de *Chlorella* sp. N64A. **A)** Aspecto final de los cultivos tras 5 días de desarrollo y curvas de crecimiento de los mismos en las distintas condiciones tróficas indicadas (A, autotofía; M, mixotofía; H, heterotofía). **B)** Niveles de actividad específica sPPasa en la fracción soluble (izquierda) y mPPasa en fracciones de membranas (derecha) de cultivos desarrollados en las condiciones indicadas. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo de la mPPasa. **C)** Niveles del polipéptido de la H⁺-PPasa determinados por *Western blot* en fracciones de membranas de los diferentes cultivos. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01).

El crecimiento de la especie *Chlorella* sp. N64A fue mucho mayor, y estuvo más acelerado, en condiciones de heterotrofia que en condiciones de autotrofia. A diferencia de la especie anterior, este organismo no fue capaz de producir ningún crecimiento en condiciones de oscuridad absoluta a pesar de tener una concentración adecuada de glucosa disponible como fuente de carbono. Esto demuestra una dependencia completa de la luz en este organismo, siendo el metabolismo heterotrófico un mecanismo secundario de obtención de energía. Los niveles de actividad de su sPPasa no se vieron afectados en ninguna de las situaciones estudiadas, no siendo posible detectar ninguna banda correspondiente a su polipéptido mediante *Western blot*. Esto puede ser debido a la inespecificidad del anticuerpo utilizado. Únicamente se observó un aumento de los niveles de actividad PPasas asociada a membrana, y dependiente de KCl, en condiciones de autotrofia y se vio una disminución de los niveles de polipéptido de esta proteína tanto en condiciones de mixotrofia como de heterotrofia. Además, se pudo observar una doble banda en todos los casos, pudiendo corresponder la más pequeña a la H⁺-PPasa independiente de K⁺. También fue posible apreciar un aumento significativo de los niveles de actividad mPPasa independientes de K⁺ en condiciones de mixotrofia y heterotrofia (Figura 3.5.18).

A



B



C

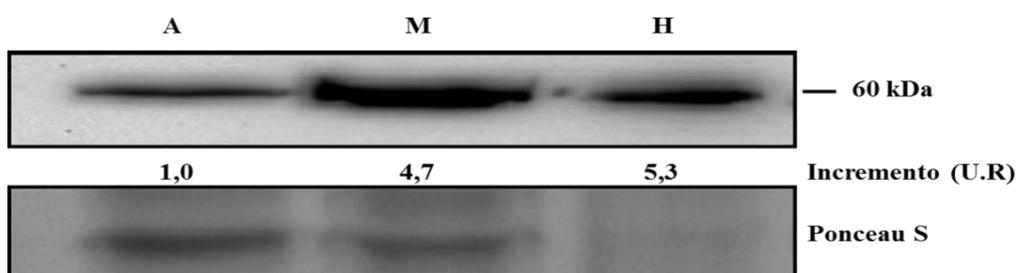


Figura 3.5.19: Efecto de las condiciones tróficas sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de las PPasas de la rodofita *Galdieria sulphuraria*. A) Aspecto final de los cultivos tras 8 días de desarrollo y curvas de crecimiento de los mismos en las distintas condiciones tróficas indicadas (A, autotofía; M, mixotofía; H, heterotofía). B) Niveles de actividad específica sPPasa en la fracción soluble (izquierda) y mPPasa en fracciones de membranas (derecha) de cultivos desarrollados en las condiciones indicadas. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo de la mPPasa. C) Niveles del polipéptido de la H⁺PPasa determinados por *Western blot* en fracciones de membranas de los diferentes cultivos. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 80 µg de proteína, por calle. Se muestra la tinción con Ponceau S de las calles correspondientes usadas como control de carga. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; **, P < 0.01).

La tasa de crecimiento de esta especie no se vio especialmente alterada en condiciones de mixotrofia, aunque sí aumentó la concentración de clorofila máxima alcanzada. En condiciones de heterotrofia hubo una disminución de la concentración de clorofila máxima alcanzada, aunque, por lo que se vio en las fotos de los cultivos, parece ser más debido a una pérdida de clorofila que a una disminución del crecimiento. La actividad PPasa soluble no se vió afectada en ninguna condición de crecimiento, mientras que la actividad PPasa asociada a membrana aumentó tanto en condiciones de mixotrofia como de heterotrofia. Los datos obtenidos por nuestro grupo (Herrera-Palau, 2011) mediante análisis por RT-PCR semicuantitativa, mostraban un aumento de la expresión de los genes Gs28190 y Gs15740 en condiciones de mixotrofia, mientras que en condiciones de autotrofia solo se expresaba el gen Gs15900. Estos datos concuerdan con los obtenidos en nuestro trabajo mediante determinación de la actividad PPasa asociada a membrana y ponen de manifiesto que el aumento de actividad producido se debe a la presencia de las proteínas expresadas por ambos genes. Mediante *Western blot* se observó un aumento de los niveles de polipéptido de H⁺-PPasa tanto en mixotrofia como en heterotrofia, observándose además una banda más pequeña con una variación inversa a la variación observada en la banda superior. Esta banda puede ser debida a una degradación de la H⁺-PPasa, que sería menos efectiva en las dos condiciones mencionadas, y explicaría, junto con los datos de expresión obtenidos mediante RT-PCR, el aumento de los niveles de actividad PPasa asociada a membrana y los niveles de polipéptido de H⁺-PPasa observados (Figura 3.5.19).

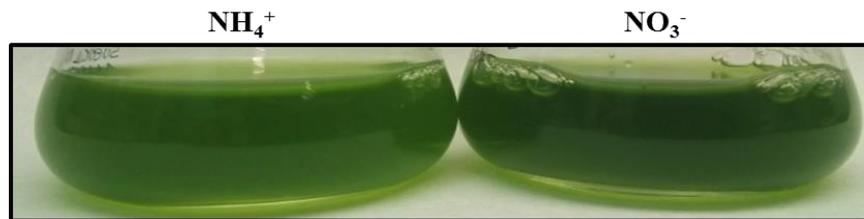
3.5.4.1 Efecto de la fuente de nitrógeno combinado sobre las actividades sPPasa y mPPasa de *C. reinhardtii*

Se ha evaluado el efecto de la fuente de nitrógeno combinado presente en el medio de cultivo sobre las actividades PPasas, tanto soluble como asociada a membrana, de la microalga modelo *C. reinhardtii*. Para ello se utilizó la estirpe CW15 que es capaz de utilizar tanto amonio como nitrato como fuentes inorgánicas de N combinado. Se utilizó el medio mineral SUEOKA suplementado con la misma concentración 10 mM de amonio (NH₄⁺) o nitrato

(NO_3^-). Los cultivos se desarrollaron fotoautotróficamente en condiciones estándar de iluminación y temperatura durante aproximadamente siete días, tras lo cual se recogieron las células por centrifugación y se procedió a la rotura de las mismas para obtener las fracciones de proteínas solubles y particulada de membranas que se utilizaron para determinar los niveles de actividad específica sPPasa y mPPasa, respectivamente.

El efecto sobre el crecimiento de los cultivos fue evidente, siendo mayor en el medio suplementado con nitrato que en el suplementado con amonio (Figura 3.5.20A). Mientras que la actividad sPPasa no se vio afectada por las condiciones estudiadas (Figura 3.5.20B, panel izquierdo), el nivel de actividad mPPasa estimulada por potasio fue significativamente mayor (casi un 30%) en las membranas de células cultivadas con nitrato que en las cultivadas con amonio (Figura 3.5.20C, panel derecho). Este efecto puede ser debido a que la concentración de PPi citosólica en las células cultivadas en presencia de nitrato sea mayor que en las cultivadas en medio con amonio, como se ha sugerido recientemente en la planta *A. thaliana* (Fukuda, Segami et al. 2016). Se ha descrito que la asimilación de amonio estimula en microalgas la glicolisis y el metabolismo respiratorio del carbono (Mohanty, Bruce et al. 1991). Dado que la glicolisis vegetal consume PPi, es de esperar una disminución del nivel de este metabolito cuando se utiliza amonio como fuente de N, con respecto al nitrato. Por otra parte, el nitrato es un inhibidor conocido de la V-ATPasa, la otra bomba de protones presente en las membranas intracelulares de los eucariotas fotosintéticos, por lo que la estimulación por nitrato de la mPPasa observada se podría vincular a este efecto inhibitorio (Ratajczak 2000). La disponibilidad del sustrato podría afectar a la actividad y/o los niveles de proteína mPPasa en lo que podría ser un nuevo mecanismo de regulación que está aún por estudiar, y para lo cual las microalgas serían un sistema ideal por su gran versatilidad metabólica y facilidad de cultivo en el laboratorio.

A



B

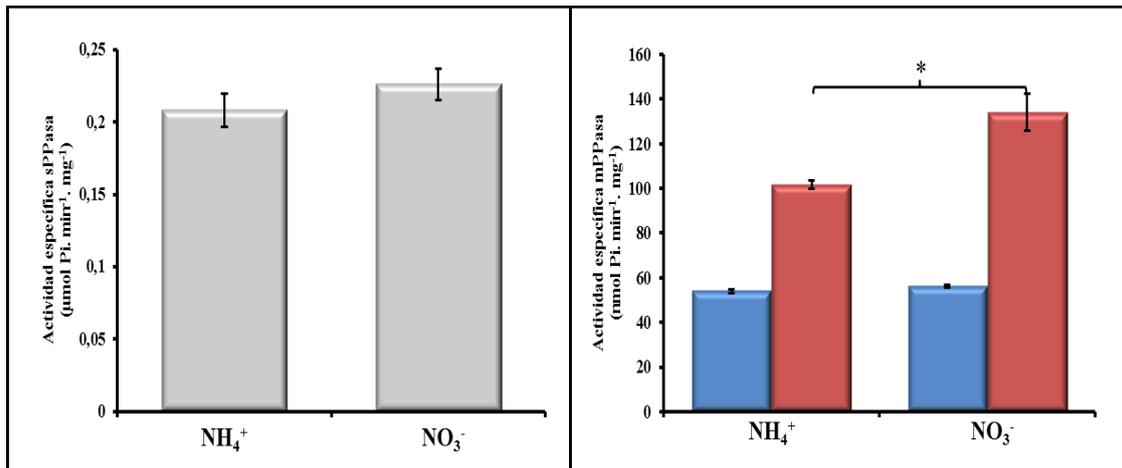


Figura 3.5.20: Efecto de la fuente de nitrógeno combinado en el medio de cultivo sobre el crecimiento y las actividades sPPasa y mPPasa de *Chlamydomonas reinhardtii* CW15. A) Aspecto de los cultivos tras 7 días de crecimiento fotoautotrófico en medio con amonio (NH₄⁺) o nitrato (NO₃⁻). **B)** Niveles de actividad específica sPPasa en la fracción soluble (panel izquierdo) y mPPasa en la fracción de membranas (panel derecho) de células procedentes de cultivos desarrollados con amonio o nitrato. Barras azules: sin KCl; barras rojas: con 100 mM KCl en el ensayo. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0.05).

3.6 Expresión heteróloga de Na⁺-PPasas de distintas especies de algas eucarióticas marinas en *S. cerevisiae*

Mediante análisis y búsquedas informáticas en bases de datos se ha conseguido identificar una serie de genes que codifican Na⁺-PPasas en distintas especies de algas marinas de distinta fisiología y filogenia, tres de las cuales se han elegido para generar construcciones génicas que permitan la expresión funcional de sus Na⁺-PPasas en *S. cerevisiae*. Se trata de una especie de alga rodofita talofítica (multicelular), *Porphyra yezoensis*, y dos especies de microalgas unicelulares, la prasinofícea *Ostreococcus tauri* y la rodofita *Porphyridium purpureum*.

Se identificaron dos genes que codifican sendas putativas Na⁺-PPasas en la colección de clones de cDNAs de *P. yezoensis* del *KAZUSA DNA Research Institute* (Chiba, Japón); para su clonación se obtuvieron tres clones, dos de los cuales (PFL020a03_r, PFL085b10_r) contendrían la ORF completa de una isoforma de Na⁺-PPasa denominada Na⁺-PPasa 1, y el tercero (PL016e10_r) la ORF completa de una segunda isoforma denominada Na⁺-PPasa 2. Todas las secuencias se podían extraer, teóricamente, del plásmido vector pBS SK- utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* – *XhoI* usadas para clonar los cDNAs en el vector.

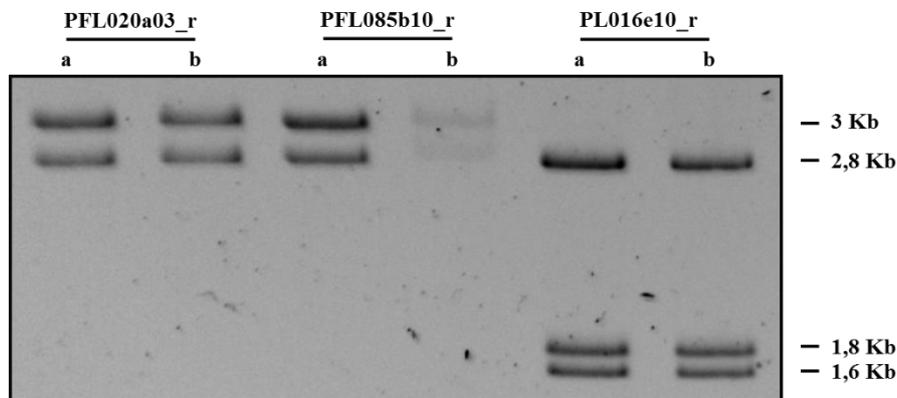
Tabla IX: Putativas Na⁺-PPasas de la rodofita *Porphyra yezoensis*.

Proteína	Nº de acceso GenBank	Clon ID number
Na ⁺ -PPasa 1 (1)	AU191676	PFL020a03_r
Na ⁺ -PPasa 1 (2)	AU196120	PFL085b10_r
Na ⁺ -PPasa 2	AV430303	PL016e10_r

Primero se comprobó que los plásmidos contenían realmente las ORFs completas en la orientación correcta (Figura 3.6.1). Para ello se realizó un análisis de restricción con las restrictasas anteriormente citadas y también reacciones de PCR utilizando los clones como moldes y los oligonucleótidos universales M13, los cuales flanquean a los insertos en los plásmidos

portadores de los cDNAs. Tanto el ensayo de restricción como las PCRs con los oligonucleótidos M13 resultaron producir fragmentos de DNA del tamaño correcto para la ORF completa con los dos clones que portaban los cDNAs codificantes de la isoforma Na⁺-PPasa 1, obteniéndose en cada caso una banda de aproximadamente 3 kb correspondiente al inserto (Figura 3.6.1A). En el análisis de restricción se observó además una banda menor, de 2,8 kb, correspondiente al plásmido portador. En el caso del clon correspondiente a la Na⁺-PPasa 2, el análisis de restricción mostró la banda de 2,8 kb correspondiente al plásmido, pero no la banda de 3 kb correspondiente a la ORF. Se obtuvieron dos bandas de 1,8 kb y 1,6 kb que corresponden al inserto dividido en dos partes (tamaño total, aprox. 3,4 kb), ya que la secuencia posee un sitio interno de corte para la enzima EcoRI. En la PCR con los oligonucleótidos M13 no se apreció la banda correspondiente a este inserto (Figura 3.6.1B), probablemente por problemas técnicos debidos al tamaño de la banda a amplificar en este caso (se usó una *Taq* convencional).

A



B

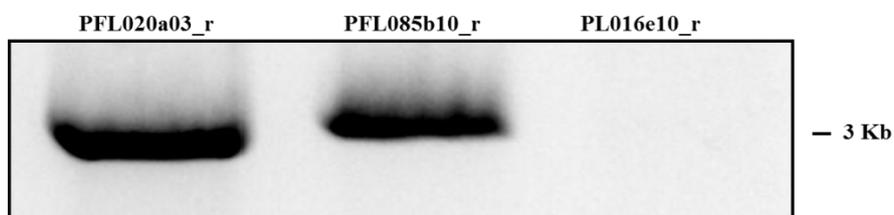


Figura 3.6.1: Comprobación de los clones que contienen las ORFs de las putativas Na⁺-PPasas de la rodofita talofítica *P. yezoensis*. A) Análisis de restricción con *EcoRI* – *XhoI*, los sitios de clonación del inserto de cDNA en los plásmidos obtenidos de la colección del Instituto KAZUSA (Japón). Tamaño de los plásmidos sin inserto, aprox. 2,8 kb. B) PCR de comprobación utilizando los oligonucleótidos universales M13. Los tamaños de los fragmentos de DNA de los insertos (aprox. 3 kb) indican que contienen las secuencias completas de las ORFs teóricas.

Resultados

Una vez comprobado que todos los clones contenían las ORFs codificantes completas de Na⁺-PPasas, se procedió a secuenciar los insertos de los clones PFL020a03_r y PFL085b10_r, mientras que el tercer clon se descartó debido a los problemas ocurridos durante la comprobación del mismo. Sólo se pudo secuenciar correctamente la región 5' de la ORF del clon PFL020a03_r, aunque la secuenciación confirmó las secuencias obtenidas de bases de datos, por lo que se pudieron diseñar oligonucleótidos que permitieron clonar dicha ORF de forma íntegra y con extremos adecuados para su clonación en vectores de expresión en levadura.

Paralelamente, se diseñaron oligonucleótidos para clonar las ORFs de la putativa Na⁺-PPasa de *O. tauri* y las tres mPPasas de *P. purpureum* por PCR de alta fidelidad usando el correspondiente DNA genómico como molde, ya que los genomas de estas microalgas poseen muy pocos intrones que están ausentes en las secuencias génicas de sus mPPasas. Todos los oligonucleótidos utilizados tenían sitios de corte específicos que permitían la inserción de las ORF en un vector de expresión en levadura.

Tabla X: mPPasas identificadas en los genomas de *Ostreococcus tauri* y *Porphyridium purpureum*, de las cuales las marcadas con asteriscos se han utilizado en este trabajo

<i>O. tauri</i>	Códigos UniProtKB (genes/proteínas)
H ⁺ -PPasa	ostta01g00980/A0A090M1W8_OSTTA
Na ⁺ -PPasa (*)	ostta01g03420/A0A090M3V7_OSTTA
H ⁺ -PPasa K ⁺ -indep	ostta04g03800/A0A090M4R4_OSTTA
<i>P. purpureum</i>	Códigos del genoma (<i>draft</i>)
Na ⁺ -PPasa1 (*)	contig_2255.10, AROW01001170.1 (1075 aa)
Na ⁺ -PPasa2 (*)	contig_2623.1, AROW01001538.1 (1080aa)
H ⁺ -PPasa K ⁺ -indep. (*)	contig_704.2, AROW01000398.1 (761 aa)

También se diseñaron oligonucleótidos para clonar algunas de las ORFs de putativas Na⁺-PPasas sin incluir su región 5' terminal, que podría codificar un péptido señal (12-15 aa) según predice el programa SignalP4.1, ya que por trabajos previos de nuestro grupo se sabe que el extremo N-terminal de las mPPasas influye en la expresión y localización subcelular de las mismas cuando

se expresan en levadura (Drake, Serrano et al. 2010). Una vez clonadas las ORFs completas de las Na⁺-PPasas de microalgas, se procedió a introducirlas mediante ligación en un plásmido lanzadera de expresión en levadura derivado de pRS699, el cual permite la fusión traduccional N-terminal de la proteína de interés con el plásmido señal N-terminal de la H⁺-PPasa de *Trypanosoma cruzi* y la proteína fluorescente verde yEGFP3 (Figura 3.6.2) (Drake, Serrano et al. 2010). Los plásmidos obtenidos, portadores de las ORFs para Na⁺-PPasas de microalgas, se utilizaron para transformar la cepa YPC3 de *S. cerevisiae* y estudiar si las proteínas que expresan eran capaces de complementar funcionalmente la deficiencia de la sPPasa endógena Ipp1p cuando los transformantes se cultivaban en presencia de glucosa.

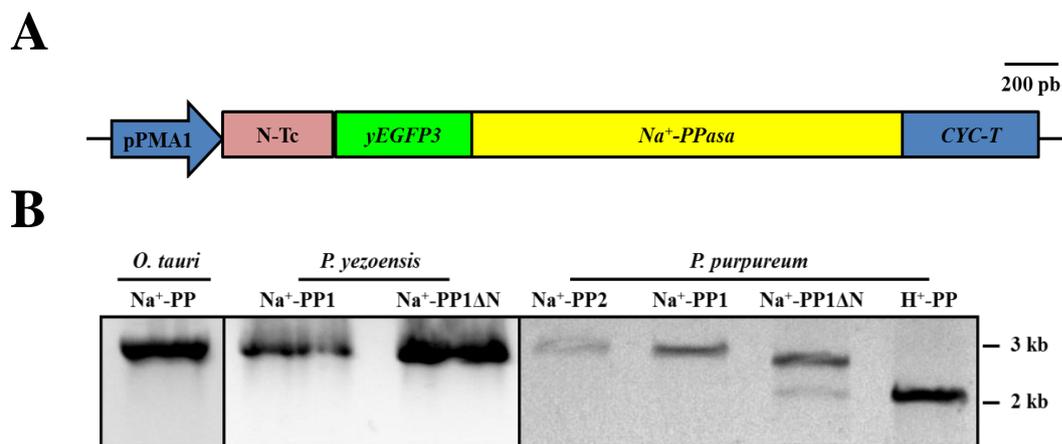


Figura 3.6.2: Clonación de las ORFs de las putativas Na⁺-PPasas de algas marinas en vectores lanzadera de levadura. A) Estrategia de subclonación en un plásmido lanzadera de expresión en levadura (derivado de pRS699) de los genes de Na⁺-PPasas. pPMA1: Promotor del gen *PMA1*; N-Tc: N-terminal de la mPPasa de *T. cruzi*; yEGFP3: ORF del gen *yEGFP3*; Na⁺-PPasa: ORF de una PPasa translocadora de sodio; CYC-T: Terminador del gen *CYC1*. B) Clonación mediante PCR de las putativas Na⁺-PPasas de las tres especies de algas marinas y de la H⁺-PPasa independiente de K⁺ de *P. purpureum*. Na⁺-PP1Δ, secuencias sin péptido N-terminal identificado como péptido señal por el programa SignalP; H⁺-PP, H⁺-PPasa independiente de K⁺.

A pesar de que se obtuvieron transformantes utilizando todas las construcciones, no se ha obtenido hasta la fecha complementación funcional por ninguna de ellas de la deficiencia de Ipp1p en el mutante YPC3, comprobada mediante ensayos típicos de goteo en medio con glucosa. Es necesario probar estrategias alternativas y/o nuevas cepas mutantes de *S. cerevisiae* derivadas de YPC3, p.e. deficientes en proteasas u otros sistemas de degradación de proteínas, que permitan conseguir en un próximo futuro la expresión funcional en levadura de estas y otras mPPasas no convencionales.

3.7 Obtención de cepas transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii* con expresión alterada del gen que codifica la H⁺-PPasa

Para determinar el papel de la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* en la respuesta de esta microalga a las condiciones ambientales, se decidió generar cepas genéticamente modificadas, tanto sobreexpresoras como con niveles reducidos de esta proteína, obtenidas en este caso por silenciamiento génico. Una vez obtenidos los transformantes, se realizarían estudios comparativos de fisiología microbiana con la cepa silvestre como control.

3.7.1 Obtención de cepas transformantes de *C. reinhardtii* por silenciamiento génico mediante microRNAs artificiales (amiRNA)

En trabajos previos del grupo (Herrera-Palau, 2011) se describió el proceso de obtención de un vector que permitía la expresión inducible por nitrato de un amiRNA específico dirigido contra el gen *HPPA*, que codifica la H⁺-PPasa dependiente de K⁺ de esta microalga. La secuencia escogida para obtener el amiRNA reconoce una secuencia de 20 nucleótidos en la posición 2.751-2.771 de la secuencia del gen que codifica la H⁺-PPasa, situada en su región 3'-UTR. El plásmido utilizado para la expresión del amiRNA se conoce como pMS539 (Molnár, Schwach et al. 2007) y contiene el gen marcador *ARG7* que permite seleccionar los transformantes de la estirpe CW15-325 auxótrofa para arginina (*arg7*) en medio de cultivo sin arginina, y el promotor del gen de la NIT1 de la nitrato reductasa, por lo que la expresión del amiRNA se puede regular por la presencia de nitrato en el medio.

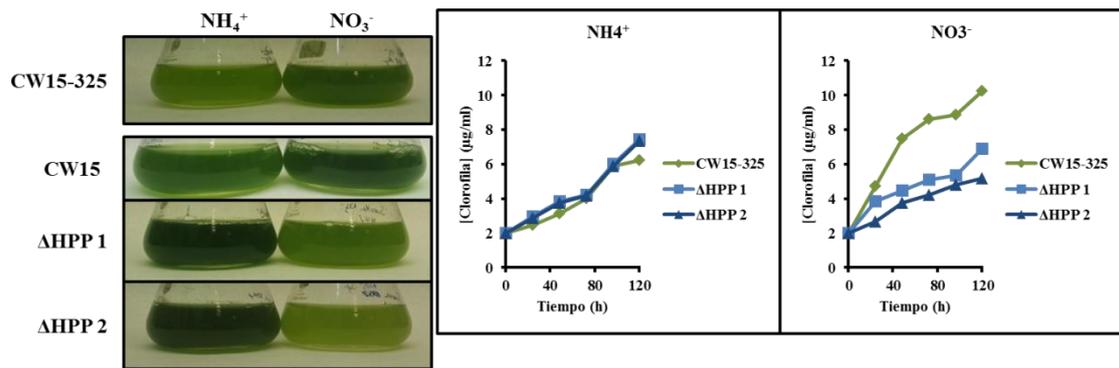
Los amiRNA son pequeños RNAs monocatenarios de 21-24 nucleótidos que tienen una función importante en el silenciamiento de algunos genes de *Chlamydomonas* (Zhao, Wang et al. 2009). El efector del silenciamiento es una ribonucleoproteína formada por la proteína Argonauta y una cadena del amiRNA, que se unen al RNA complementario e impiden su traducción (Rosana Herrera-Palau. 2011).

El plásmido pMS539-H⁺PPasa conteniendo el amiRNA contra el gen *HPPA* se utilizó para transformar la cepa CW15-325 de *C. reinhardtii* y los

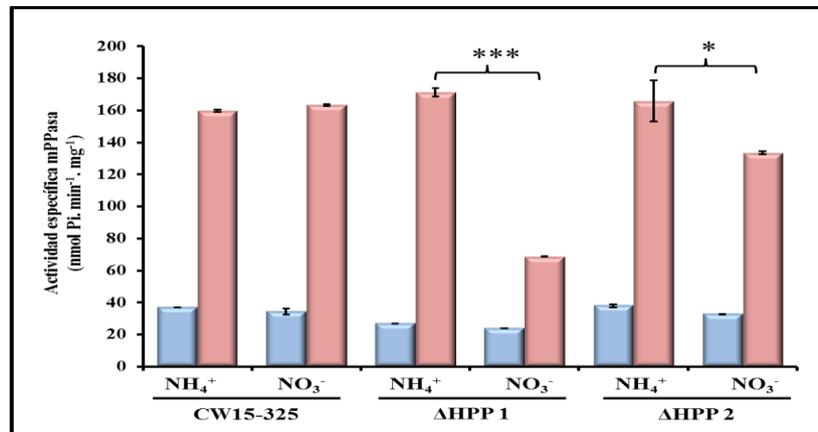
transformantes se seleccionaron mediante crecimiento en placas de medio TAP-amonio sin arginina. Se seleccionaron dos cepas transformantes, denominadas Δ PP1 y Δ PP2, de entre unas 15 posibles cepas positivas. Una vez obtenidos los transformantes seleccionados, se procedió a su comprobación midiendo los niveles de actividad específica mPPasa y de polipéptido H^+ -PPasa, determinados éstos por *Western blotting*, en preparaciones de membranas de células cultivadas en medio con nitrato, comparándolos con los niveles obtenidos en células cultivadas con amonio. Cabe destacar que la cepa CW15-325 no transformada precisa de la suplementación del medio de cultivo con arginina (50 μ g/ml).

Se apreció un efecto negativo sobre el crecimiento para las dos cepas transformantes en medio con nitrato, al contrario de lo que sucedía con el crecimiento de la cepa silvestre parental. Se observó también una diferencia de crecimiento entre los mutantes y el control en medio con amonio, que se invirtió al cultivar las cepas en medio con nitrato. La cepa transformante Δ HPP2 muestra, además, un menor crecimiento que la cepa transformante Δ HPP1 en medio con nitrato (Figura 3.7.1A). Por otra parte, se observó un descenso de la actividad específica mPPasa dependiente de K^+ en las membranas de ambas cepas transformantes de silenciamiento por amiRNA contra H^+ -PPasa cultivadas con nitrato. Este descenso fue mayor en el transformante Δ HPP1 que en Δ HPP2, mientras que no se produjo en la cepa silvestre (Figura 3.7.1B). Mediante *Western blot* (Figura 3.7.1C) se observó una mayor cantidad de polipéptido de H^+ -PPasa en las fracciones de membranas de células cultivadas con nitrato de la cepa silvestre y del transformante Δ HPP2, aunque este aumento no llevó asociado un aumento de los niveles de actividad PPasa asociada a membrana. Además, se comprobó que los niveles de polipéptido H^+ -PPasa eran mucho menores en las membranas del transformante Δ HPP1 que en las de la cepa silvestre, lo que concuerda con los niveles de actividad mPPasa determinados en ambas cepas. En esta cepa transformante no se observó el aumento de polipéptido H^+ -PPasa producido por nitrato que sí se observó en las otras cepas.

A



B



C

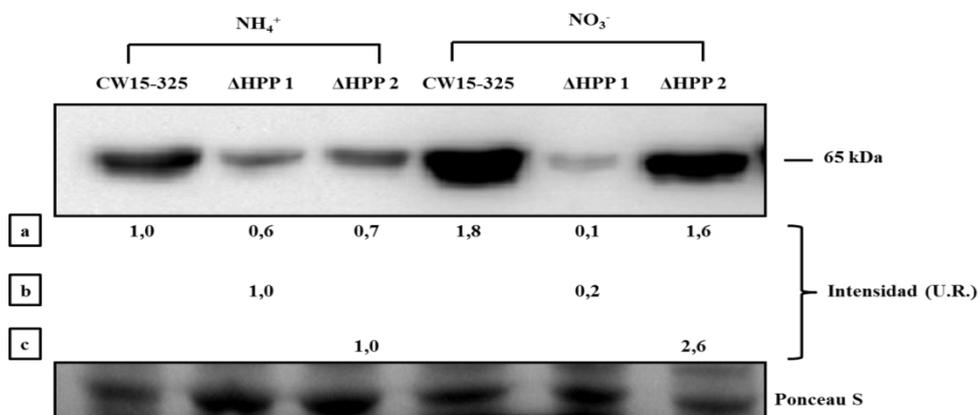
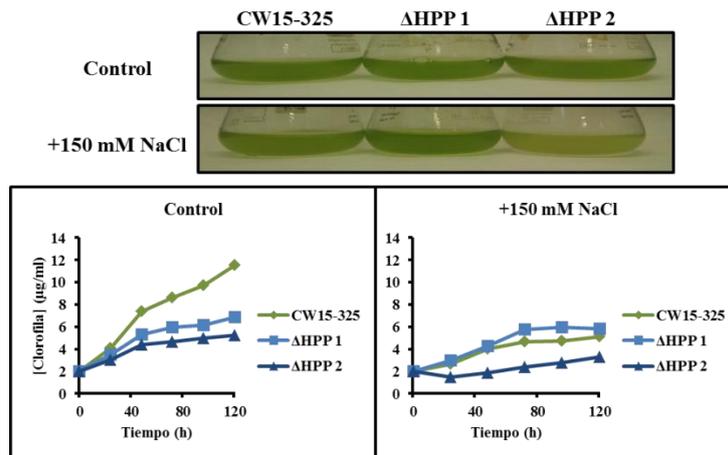


Figura 3.7.1: Efecto de la expresión de un amiRNA contra el gen *HPPA* sobre el crecimiento de los cultivos y los niveles de H^+ -PPasa de la cepa parental CW15-325 y dos cepas transformantes, Δ HPPA1 y 2, de *C. reinhardtii*. A) Aspecto de los cultivos desarrollados en medio Sueoka con amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) tras 7 días de crecimiento y curvas de crecimiento correspondientes. B) Niveles de actividad mPPasa en preparaciones de membranas de las cepas indicadas cultivadas con amonio o nitrato. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. C) Detección del polipéptido mPPasa en fracciones de membranas de las cepas indicadas cultivadas en medio con amonio o nitrato. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 50 µg de proteína, por calle. Se muestran las calles correspondientes teñidas con Ponceau S usadas como control de carga. a) Cuantificación tomando CW15-325 como referencia. b) Cuantificación tomando Δ HPP1 como referencia. c) Cuantificación tomando Δ HPP2 como referencia. U.R., unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P < 0,05; ***, P < 0.001).

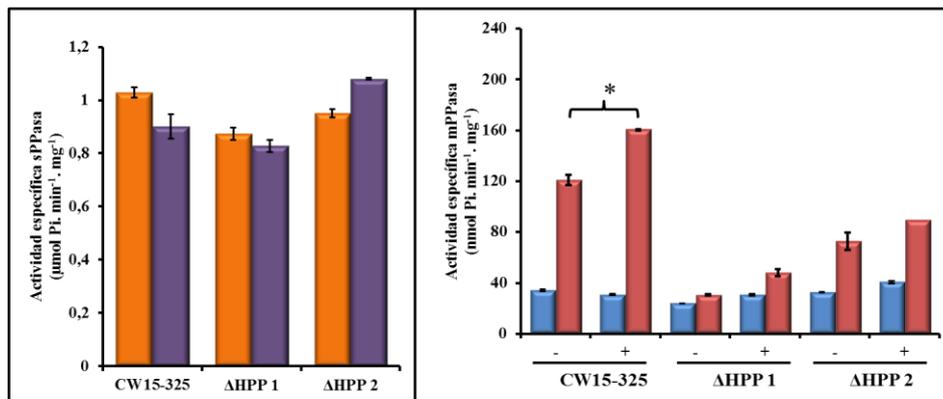
Para completar el estudio sobre regulación de las mPPasas en microalgas eucarióticas, se procedió a repetir algunos de los experimentos descritos en apartados anteriores utilizando las cepas transformantes de silenciamiento génico mediante amiRNA. Para ello se desarrollaron cultivos tanto de los dos transformantes obtenidos como de la cepa silvestre parental en distintas condiciones tróficas (auto-, mixo- y heterotrofia) y en presencia o ausencia de 150 mM NaCl. Se prepararon extractos celulares, de los cuales se obtuvieron las correspondientes fracciones de proteínas solubles y particuladas de membranas, en las que se determinaron respectivamente los niveles de actividad sPPasa y mPPasa, así como los niveles de polipéptido para H⁺-PPasa mediante *Western blotting*.

La cepa transformante Δ HPP2 presentó la menor tasa de crecimiento que la parental silvestre tanto en presencia como en ausencia de 150 mM de NaCl. Sin embargo, en condiciones salinas, la cepa Δ HPP1 presentó un crecimiento ligeramente mayor que la cepa silvestre, mientras que en condiciones de no salinidad la cepa silvestre creció mejor que ambas cepas transformantes (Figura 3.7.2A). Todas las cepas presentaron los niveles similares de actividad sPPasa, y estos niveles no se vieron alterados por la presencia de NaCl. En cuanto a la actividad mPPasa asociada a membranas, se observó un incremento de la actividad en todas las cepas cultivadas en medio salino respecto a los cultivos sin sal, aunque este incremento fue mayor en la silvestre. Ambas cepas transformantes presentaron niveles de actividad mPPasa significativamente menores que la cepa silvestre, aunque los niveles de Δ HPP1 fueron significativamente menores que los de Δ HPP2 (Figura 3.7.2B). Estos resultados se repitieron en las medidas de los niveles de polipéptido H⁺-PPasa en la cepa silvestre y en la cepa Δ HPP1, mientras que en la cepa Δ HPP2 se apreció una mayor cantidad de polipéptido H⁺-PPasa en condiciones de no salinidad, pero el nivel de polipéptido H⁺-PPasa bajó a niveles mínimos en condiciones de salinidad (Figura 3.7.2C).

A



B



D

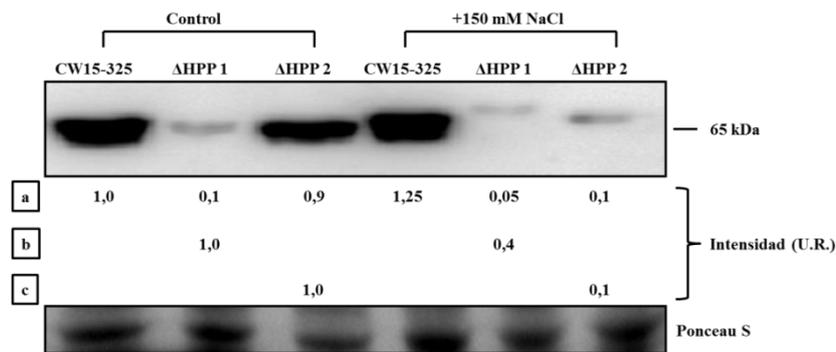
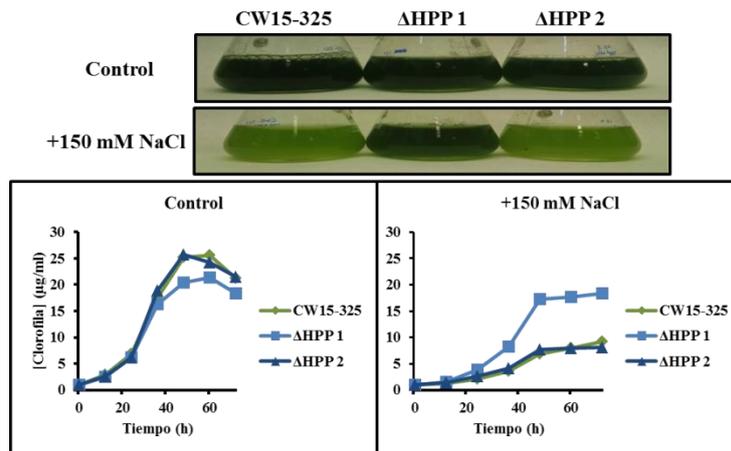
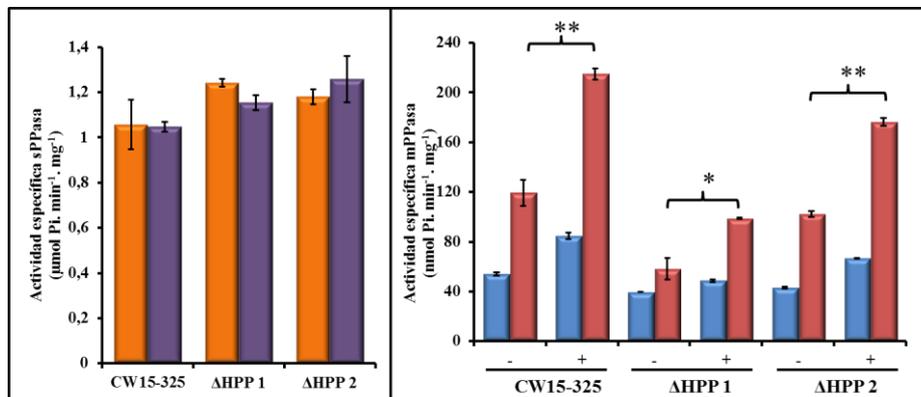


Figura 3.7.2: Efecto de la salinidad sobre la cepa CW15-325 de *C. reinhardtii* y sus transformantes de silenciamiento génico por amiRNA contra *HPP* cultivadas en condiciones autotróficas y bajo estrés salino. A) Aspecto de los cultivos desarrollados en las distintas condiciones tras 7 días de crecimiento y curvas de crecimiento correspondientes. B) Niveles de actividad sPPasa en la fracción soluble (izquierda) y mPPasa en preparaciones de membranas (derecha) de las cepas cultivadas en las distintas condiciones. Barras naranjas: 0 mM NaCl; barras moradas: 150 mM NaCl en el medio. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. C) Detección del polipéptido mPPasa en fracciones de membranas de las cepas indicadas cultivadas en las diferentes condiciones. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 50 µg de proteína, por calle. Se muestran las calles correspondientes teñidas con Ponceau S usadas como control de carga. U.R., unidades relativas. a) Cuantificación tomando CW15-325 como referencia. b) Cuantificación tomando Δ HPP1 como referencia. c) Cuantificación tomando Δ HPP2 como referencia. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05).

A



B



C

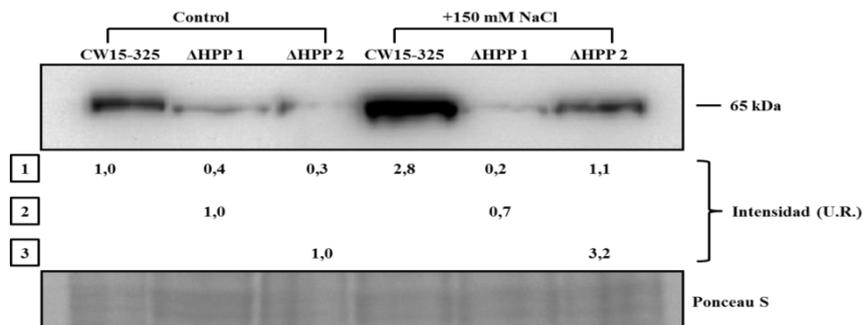
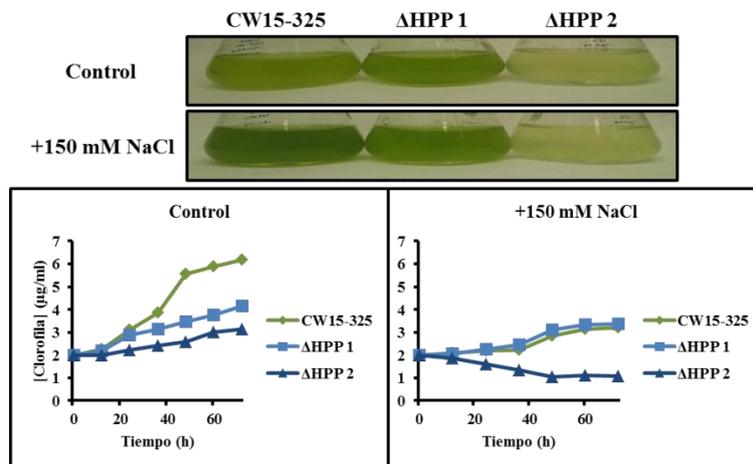


Figura 3.7.3: Efecto de la salinidad sobre la cepa CW15-325 de *C. reinhardtii* y sus transformantes de silenciamiento génico por amiRNA contra *HPP* cultivadas en condiciones mixotróficas y bajo estrés salino. A) Aspecto de los cultivos desarrollados en las distintas condiciones tras 7 días de crecimiento y curvas de crecimiento correspondientes. B) Niveles de actividad sPPasa en la fracción soluble (izquierda) y mPPasa en preparaciones de membranas (derecha) de las cepas cultivadas en las distintas condiciones. Barras naranjas: 0 mM NaCl; barras moradas: 150 mM NaCl en el medio. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. C) Detección del polipéptido mPPasa en fracciones de membranas de las cepas indicadas cultivadas en las diferentes condiciones. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 50 μg de proteína, por calle. Se muestran las calles correspondientes teñidas con Ponceau S usadas como control de carga. U.R., unidades relativas. a) Cuantificación tomando CW15-325 como referencia. b) Cuantificación tomando ΔHPP1 como referencia. c) Cuantificación tomando ΔHPP2 como referencia. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01).

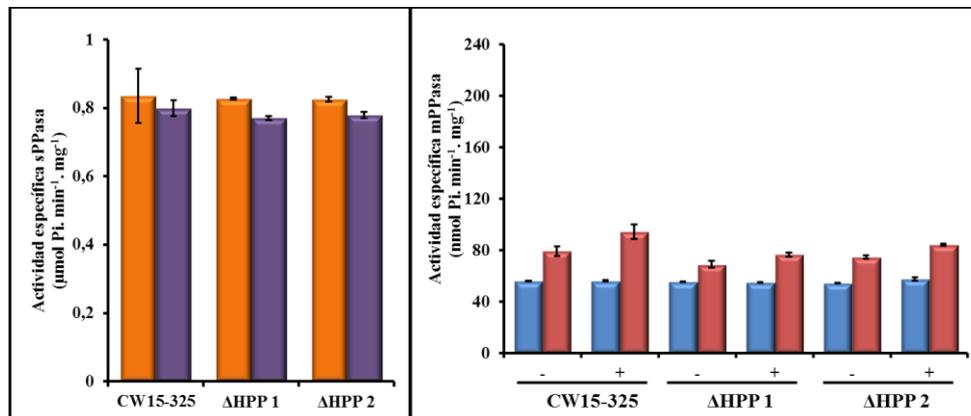
Todas las cepas presentaron un crecimiento similar en el medio de cultivo suplementado con acetato sin NaCl (condiciones mixotróficas), aunque en presencia de 150 mM NaCl la cepa transformante Δ HPP1 presentó un crecimiento mayor que la silvestre y Δ HPP2, similar al observado en condiciones de no salinidad (Figura 3.7.3A). Al igual que en el caso de los cultivos desarrollados en autotrofia, no se apreciaron diferencias en los niveles de actividad sPPasa en ninguna de las cepas en presencia o ausencia de sal, mientras que la actividad mPPasa asociada a membranas aumentó en todas las cepas, aunque en menor medida en las transformantes, cuando estas se cultivaron mixotróficamente en presencia de 150 mM NaCl (Figura 3.7.3B). En cuanto a los niveles de polipéptido H^+ -PPasa, se apreció que eran menores en las dos cepas transformantes y que aumentaban en la cepa silvestre y, en menor medida, el transformante Δ HPP2 en presencia de 150 mM NaCl, mientras que en el caso de Δ HPP1 no se observaron cambios significativos (Figura 3.7.3C).

Las tasas de crecimiento observadas en condiciones de heterotróficas fueron similares a las observadas en condiciones fotoautotróficas, siendo la cepa transformante Δ HPP1 la que mejor creció. No se apreció un efecto significativo del NaCl sobre el crecimiento de esta cepa transformante, mientras que el transformante Δ HPP2 presentó el menor crecimiento en ambas condiciones, y mostró una marcada hipersensibilidad a la sal no observada en las otras condiciones tróficas (Figura 3.7.4A). La actividad sPPasa tampoco cambió en ningún caso, mientras que la actividad mPPasa asociada a membrana fue mucho menor que en las otras dos condiciones estudiadas, hasta el punto de alcanzar niveles residuales, y no se observaron aumentos significativos de la misma en presencia de 150 mM NaCl (Figura 3.7.4B). En cuanto a los niveles de polipéptido H^+ -PPasa, se pudo apreciar que ambos transformantes presentaban niveles menores que la silvestre, aunque en las tres cepas eran claramente mucho menores en las otras condiciones tróficas, y no se vio aumento evidente de los niveles en ninguna de las cepas cultivadas en presencia de NaCl. Estos resultados indican que la expresión de la H^+ -PPasa de *C. reinhardtii* está fuertemente reprimida hasta el punto de alcanzar niveles residuales en condiciones heterotróficas, tanto en la cepa silvestre como en los transformantes de silenciamiento génico analizados (Figura 3.7.6C).

A



B



D

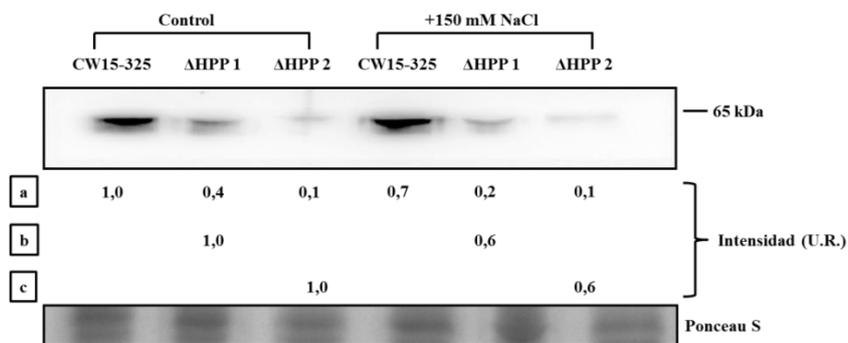


Figura 3.7.4: Efecto de la salinidad sobre la cepa CW15-325 de *C. reinhardtii* y sus transformantes de silenciamiento génico por amiRNA contra *HPP* cultivadas en condiciones heterotróficas y bajo estrés salino. A) Aspecto de los cultivos desarrollados en las distintas condiciones tras 7 días de crecimiento y curvas de crecimiento correspondientes. B) Niveles de actividad sPPasa en la fracción soluble (izquierda) y mPPasa en preparaciones de membranas (derecha) de las cepas cultivadas en las distintas condiciones. Barras naranjas: 0 mM NaCl; barras moradas: 150 mM NaCl en el medio. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. C) Detección del polipéptido mPPasa en fracciones de membranas de las cepas indicadas cultivadas en las diferentes condiciones. Se aplicó la misma cantidad de extracto, aprox. 50 µg de proteína, por calle. Se muestran las calles correspondientes teñidas con Ponceau S usadas como control de carga. U.R., unidades relativas. a) Cuantificación tomando CW15-325 como referencia. b) Cuantificación tomando Δ HPP1 como referencia. c) Cuantificación tomando Δ HPP2 como referencia.

Los resultados obtenidos con las cepas transformantes afectadas en el gen *HPPA* muestran las complejas relaciones fisiológicas entre el metabolismo del C y el del PPI en los eucariotas fotosintéticos, con la complicación adicional del uso biotecnológico de la fuente de N inorgánico, otro factor nutricional en juego, como agente modulador de la expresión del amiRNA. Sería deseable, por tanto, desarrollar un sistema de expresión modulable alternativo que utilizara otro promotor no directamente implicado en el metabolismo del N, para realizar este estudio en el futuro.

3.7.2 Obtención de construcciones génicas para obtener transformantes de *C. reinhardtii* sobreexpresores de quimeras de PPasas con la proteína fluorescente amarilla YFP

Aunque se ha determinado la localización de las dos sPPasas de *C. reinhardtii* mediante aislamiento de fracciones subcelulares (Gómez-García, Losada et al. 2006), no existe aún ninguna evidencia directa experimental obtenida *in vivo* sobre la localización subcelular de las distintas PPasas (2 sPPasas de la Familia I y 1 H⁺-PPasa dependiente de K⁺) en esta microalga. El objetivo de este trabajo era obtener cepas de *C. reinhardtii* sobreexpresoras de sus propias sPPasas y mPPasa, así como de otras PPasas heterólogas, y determinar mediante microscopia de fluorescencia la localización subcelular de todas ellas.

Para este fin, se amplificaron los genes de las tres PPasas de *C. reinhardtii* a partir de DNA genómico o cDNA y se introdujeron mediante el sistema Gateway en el vector de expresión constitutiva pEARLY GATE C-YFPHA (Lucas-Reina, Romero-Campero et al. 2015), el cual permite la fusión al extremo C-terminal de la proteína de interés de la proteína fluorescente amarilla (YFP), adaptada para su expresión en este microorganismo (Matsuo and Ishiura 2010) (Figura 3.7.5). Adicionalmente, los genes que codifican las PPasas de *C. reinhardtii* se introdujeron en otra versión del plásmido que permite la expresión regulable de las quimeras mediante el cultivo con amonio/nitrato (promotor NiA). Algunos de los genes también se clonaron en un vector de expresión en plantas que permite la fusión con YFP en el extremo N-terminal de cada proteína (pEARLYGATE 101), con el objetivo de expresar

las PPasas en *Arabidopsis thaliana*. Todos estos plásmidos poseían el gen de resistencia a higromicina como sistema de selección.

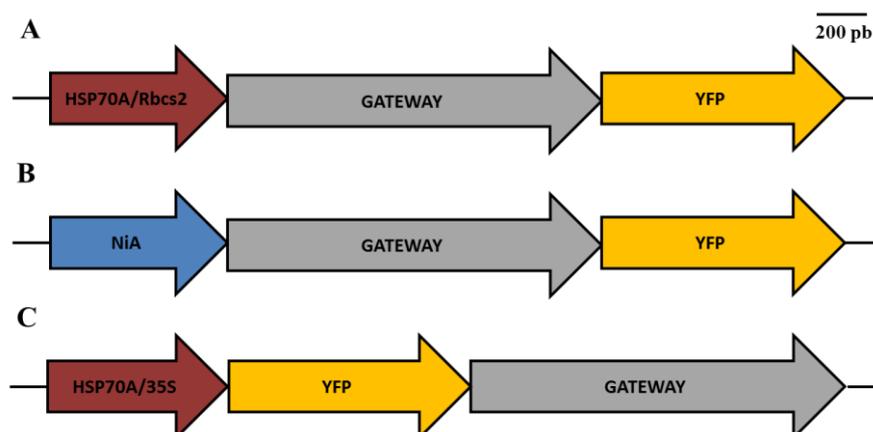


Figura 3.7.5: Construcciones génicas para expresar PPasas en *C. reinhardtii* y *A. thaliana*. A) Construcción para expresar, de forma constitutiva, PPasas en *Ch. reinhardtii* con fusión a YFP en el extremo C-terminal. B) Construcción para expresar, mediante inducción por nitrato, PPasas en *C. reinhardtii* con fusión a YFP en el extremo C-terminal. C) Construcción para expresar, de forma constitutiva, PPasas en *A. thaliana* con fusión a YFP en el extremo N-terminal. HSP70A/Rbcs2: promotor combinado del gen *HSP70A* y del gen de la subunidad pequeña de la Rubisco; Gateway: región de recombinación; YFP: proteína fluorescente amarilla; NiA: promotor regulable por amonio/nitrato; HSP70/35S: promotor combinado del gen *HSP70* y del gen del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor.

Las ORFs de genes de PPasas que se han introducido en plásmidos durante el desarrollo de este trabajo, con el objetivo de expresarlas heterológamente en *C. reinhardtii*, se muestran a continuación en la Tabla XI.

Tabla XI: Genes de PPasas utilizados para la expresión en *C. reinhardtii*

Gen	PPasa	Vector
<i>ChPPA1</i>	sPPasa cloroplástica de <i>C. reinhardtii</i>	Constitutivo/Inducible/Plantas
<i>ChPPA2</i>	sPPasa mitocondrial de <i>C. reinhardtii</i>	Constitutivo/Inducible
<i>ChHPPA</i>	H ⁺ -PPasadependiente de K ⁺ de <i>C. reinhardtii</i>	Constitutivo/Inducible
<i>MmPPA</i>	Na ⁺ -PPasa de <i>Methanosarcina mazei</i>	Constitutivo/Inducible/Plantas
<i>OtPPA</i>	Na ⁺ -PPasa de <i>Ostreococcus tauri</i>	Constitutivo/Inducible/Plantas
<i>SmPPA</i>	sPPasa de Familia II de <i>Streptococcus mutans</i>	Constitutivo/Inducible/Plantas

Una vez realizadas las transformaciones, los clones candidatos se seleccionaron en placas de medio TAP NH₄⁺ suplementadas con 25 µg/ml de higromicina, y se observaron las células procedentes de las colonias resultantes

al microscopio de fluorescencia confocal. Desafortunadamente, en los primeros análisis no se consiguió observar fluorescencia en ninguno de los posibles transformantes, por lo que se intentó aumentar la eficacia de la expresión de las proteínas heterólogas en *C. reinhardtii*. Para ello se incluyó, en cada construcción, el primer intrón del gen de la subunidad de la Rubisco, *rbcS2* (Sizova, Fuhrmann et al. 2001). A pesar de ser una estrategia ampliamente utilizada, en este caso tampoco resultó efectiva. Las construcciones para la expresión en plantas están listas para ser utilizadas para transformar *A. thaliana*, aunque en el momento de la redacción de esta Tesis aún no se ha llegado a hacer.

Actualmente se está poniendo a punto otro sistema de expresión en *C. reinhardtii* que utiliza una familia de plásmidos optimizados para la expresión de proteínas heterólogas en esta microalga (pOpt) que permiten la fusión traduccional a varias proteínas fluorescentes (mVenus, Clover, mRuby2, mCerulean3), tanto en el extremo C-terminal como N-terminal de la proteína de interés bajo el control del promotor constitutivo combinado del gen *HS70A* y el gen *RBCS2* de la subunidad pequeña de la Rubisco, y que poseen genes de resistencia a higromicina o paromomicina como agentes de selección (Figura 3.7.6). Estos vectores tienen la ventaja adicional de que las secuencias de las proteínas reporteras se han optimizado para su expresión en *C. reinhardtii* mediante la inclusión de dos de los intrones de la subunidad pequeña de la rubisco *Rbcs2* (Lauersen, Kruse et al. 2015).

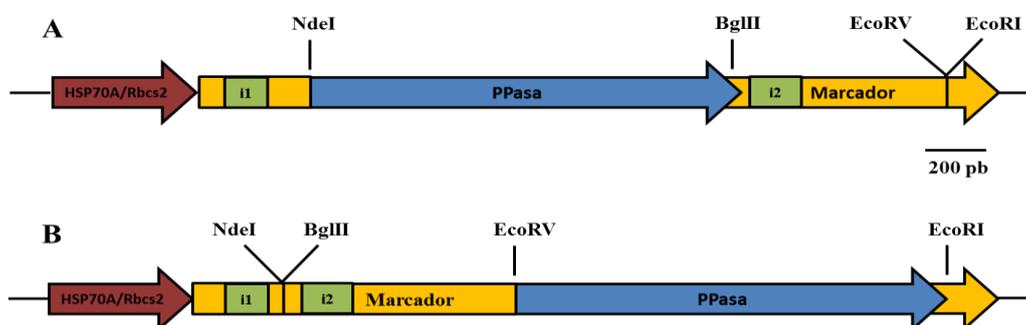


Figura 3.7.6: Construcciones genéticas en plásmidos pOpt para expresar PPasas en *C. reinhardtii*. **A)** Construcción para expresar, de forma constitutiva, PPasas en *C. reinhardtii* con fusión a una proteína marcadora en el extremo C-terminal. **B)** Construcción para expresar, de forma constitutiva, PPasas en *C. reinhardtii* con fusión a una proteína marcadora en el extremo C-terminal. HSP70A/Rbcs2: promotor combinado del gen *HSP70A* y del gen de la subunidad pequeña de la Rubisco; Marcador: Proteína marcadora fluorescente; PPasa: pirofosfatasa; i1, i2: Intrones del gen la subunidad pequeña de la Rubisco. Todas las construcciones tenían un tamaño aproximado de 3-4 kb.

3.8 Expresión funcional de mPPasas heterólogas en la cianobacteria dulceacuícola *Synechocystis* sp. PCC6803, y efectos sobre su tolerancia a la salinidad

Dado que se ha propuesto que las mPPasas juegan un papel importante en la respuesta a diferentes estreses medioambientales, entre ellos, la adaptación de las células a estrés salino en distintos organismos, se ha llevado a cabo la expresión heteróloga de mPPasas de diverso origen en una cianobacteria modelo y se ha estudiado su posible papel en la bioenergética de estos procariotas fotosintéticos, lo cual, ayudaría a comprender mejor el papel jugado por estas bombas de iones bajo diversas situaciones fisiológicas. Las mPPasas utilizadas han sido tres H⁺-PPasas, dos dependientes de K⁺ y una independiente de K⁺, y una Na⁺-PPasa, provenientes de distintos organismos (Tabla XII).

Tabla XII: Genes de mPPasas utilizados para su expresión en *Synechocystis* sp. PCC6803

Especie	Tipo de organismo	mPPasa (Código genómico)	Tipo (M _m , número de aa)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protista parásito trypanosomátido	TcPP (QADG5)	H ⁺ -PPasa K ⁺ dependiente (84 kDa, 814 aa)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Planta superior dicotiledónea	AVP1 (At1g15690)	H ⁺ -PPasa K ⁺ dependiente (80 kDa, 770 aa)
<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Bacteria fotosintética anoxigénica	CaPP (Caur_1306)	H ⁺ -PPasa K ⁺ independiente (80 kDa, 775 aa)
<i>Methanosarcina mazei</i>	Arquea metanógena anaerobia	MmPP (MM_0700)	Na ⁺ -PPasa (69 kDa, 676 aa)

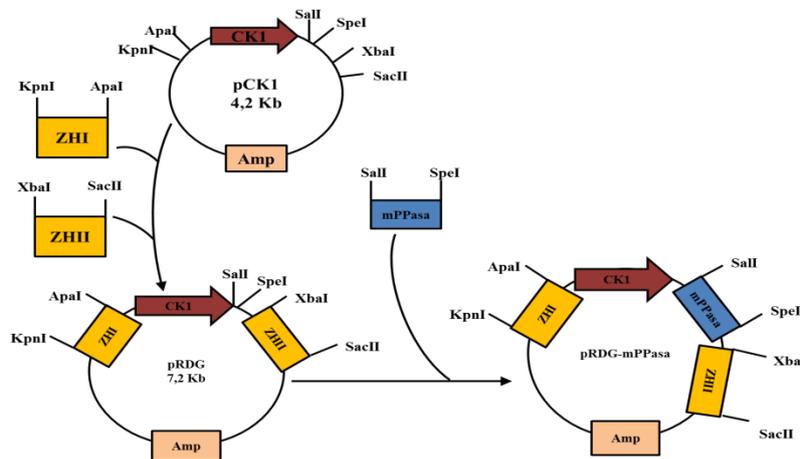
Para este trabajo se ha transformado la estirpe unicelular *Synechocystis* sp. PCC6803 con plásmidos que contienen secuencias codificantes de mPPasas de distintos organismos, las cuales se integraron en el ADN genómico cianobacteriano mediante recombinación homóloga. Para ello, se amplificaron mediante técnicas de PCR de alta fidelidad dos fragmentos de ADN contiguos en el genoma de esta cianobacteria que corresponden al gen dispensable *gln N*, los cuales a su vez estaban clonados en el plásmido pKW1188, un vector que

permite la inserción por recombinación homóloga de ADN foráneo en el cromosoma de *Synechocystis*, sin producir ningún efecto negativo en la cepa transformante (Williams 1988). Este plásmido contiene la secuencia del gen *gln N* de *Synechocystis* sp. PCC6803 interrumpida por una casete de resistencia a kanamicina (Km) y un sitio de restricción múltiple en su extremo 3', con sitios de corte para diversas enzimas de restricción. Este tipo de plásmidos y sus derivados permiten la recombinación homóloga entre los fragmentos de ADN de la cianobacterias que se encuentran en ellos y sus secuencias homólogas en el cromosoma del organismo, obteniendo como resultado la integración de la casete de resistencia a kanamicina, y cualquier otra secuencia que se quiera introducir, entre las secuencias de recombinación (Williams 1988). En un primer paso se amplificó el fragmento ZHI del gen *gln N* de *Synechocystis* con oligonucleótidos que poseían los sitios artificiales de restricción flanqueantes *KpnI* y *ApaI*, utilizando como molde el plásmido pKW1188 y se clonó en un plásmido comercial pBluescript SK⁺ que contenía a su vez una casete de kanamicina clonada mediante ligaciones cohesivas (pCK1), obteniendo como resultado el plásmido pCK1ZHI. Posteriormente se amplificó el fragmento ZHII del gen *gln N* de *Synechocystis*, utilizando nuevamente como molde el plásmido pKW1188 y oligonucleótidos con los sitios de restricción artificiales flanqueantes *XbaI* y *SacII*. Este fragmento se clonó en el plásmido pCK1ZHI mediante ligaciones cohesivas para formar el plásmido pRDG. A continuación se clonaron en este plásmido pRDG las secuencias codificantes, obtenidas bien de ADN genómico o de ADNc, de mPPasas procedentes de distintos organismos: una planta, un protista parásito, una bacteria y una arquea (Tabla XII).

Para la generación de las estirpes de *Synechocystis* sp. PCC6803 expresoras de estas proteínas de membrana se eligieron dos H⁺-PPasas dependientes de K⁺ procedentes de organismos eucarióticos de filogenia muy diferente (la H⁺-PPasa acidocalcisomal del protista *T. cruzi* y su homóloga vacuolar de la planta *A. thaliana*), una H⁺-PPasa independiente de K⁺ de la membrana plasmática de una bacteria fotosintética verde no sulfurosa, *Chloroflexus aurantiacus*, y una Na⁺-PPasa de la membrana plasmática de una Arquea metanogénica, *Methanosarcina mazei*. Las secuencias de los genes que

codifican estas proteínas se amplificaron mediante técnicas de PCR de alta fidelidad y se clonaron mediante ligaciones cohesivas en el plásmido pRDG, en el sentido correcto de transcripción, obteniéndose los plásmidos pRDG-AVP1, pRDG-TcPP, pRDG-CaPP y pRDG-MmPP (Figura 3.8.1A). Las secuencias de los genes de mPPasas se colocaron detrás del gen de resistencia a Km para utilizar el promotor de la misma para su propia expresión. Estos plásmidos, junto con el vector pRDG “vacío” como control, fueron utilizados para transformar la estirpe silvestre de *Synechocystis* sp. PC6803 y generar nuevas estirpes transformantes que tuvieran integrado en su cromosoma el gen de una mPPasa bajo el control del promotor de la kanamicina (Figura 3.8.1).

A



B

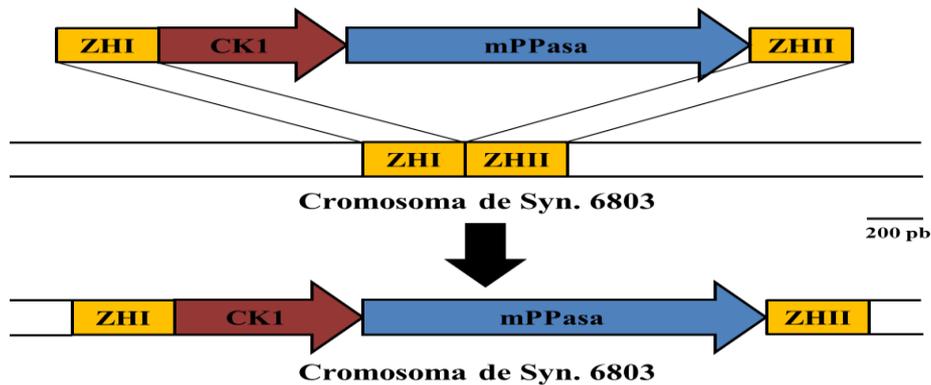


Figura 3.8.1: Obtención de los plásmidos pRDG-mPPasa y generación de la estirpe SDG de *Synechocystis* sp. PCC6803. A) Estrategia de subclonación del plásmido pRDG y de los plásmidos pRDG-AVP1, pRDG-TcPP, pRDG-CaPP y pRDG-MmPP. B) Estrategia de transformación para introducir CK1 y las mPPasas en el cromosoma cianobacteriano para obtener las estirpes transformantes de *Synechocystis*: SDG, SDG-AVP1, SDG-TcPP, SDG-CaPP y SDG-MmPP. CK1: Gen de resistencia a Km; Amp: Gen de resistencia a ampicilina; ZHI,ZHII: Fragmentos del gen *gln N*; mPPasa: pirofosfatasa de membrana.

Resultados

Una vez transformada la estirpe silvestre con los diferentes plásmidos, las colonias transformantes resistentes aparecieron tras 10-15 días de incubación a 30 °C en medio BG11 suplementado con Km debido a la introducción del ADN exógeno en el cromosoma de la cianobacteria, ya que los plásmidos introducidos no contenían ningún origen de replicación reconocible por el organismo. En rondas de replicación posteriores se aumentó progresivamente la concentración del antibiótico en el medio de cultivo hasta 500 µg/ml, para forzar la segregación completa de las copias cromosómicas mutantes. Con el fin de identificar los genes de las diferentes mPPasas en las estirpes transformantes, se realizaron amplificaciones mediante PCR que permitieron distinguir en los transformantes una banda de ADN de tamaño distinto a la obtenida en los dos controles utilizados, la estirpe silvestre y ésta transformada con el plásmido pRDG “vacío” (SDG). Estos resultados también confirmaron la segregación cromosómica total en todas las estirpes (Figura 3.8.2).

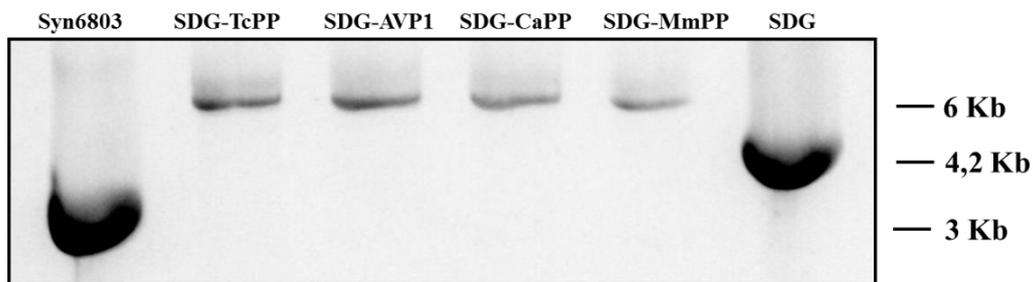


Figura 3.8.2: Comprobación del grado de integración y completa segregación de los genes que codifican mPPasas en el cromosoma de la estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803 y sus estirpes transformantes, determinados mediante PCR. Para la PCR se utilizaron los oligonucleótidos ZHI_fw y ZHI_rev.

Una vez realizada la caracterización genética básica de los transformantes, se llevó a cabo un estudio fisiológico comparativo del crecimiento de los mismos en condiciones fotoautotróficas, con la estirpe silvestre y la estirpe SDG como controles, utilizando como parámetro la medida de la concentración de clorofila. El crecimiento no se vio afectado en ninguna de las cepas en comparación con la cepa control (Figura 3.8.3)

A



B

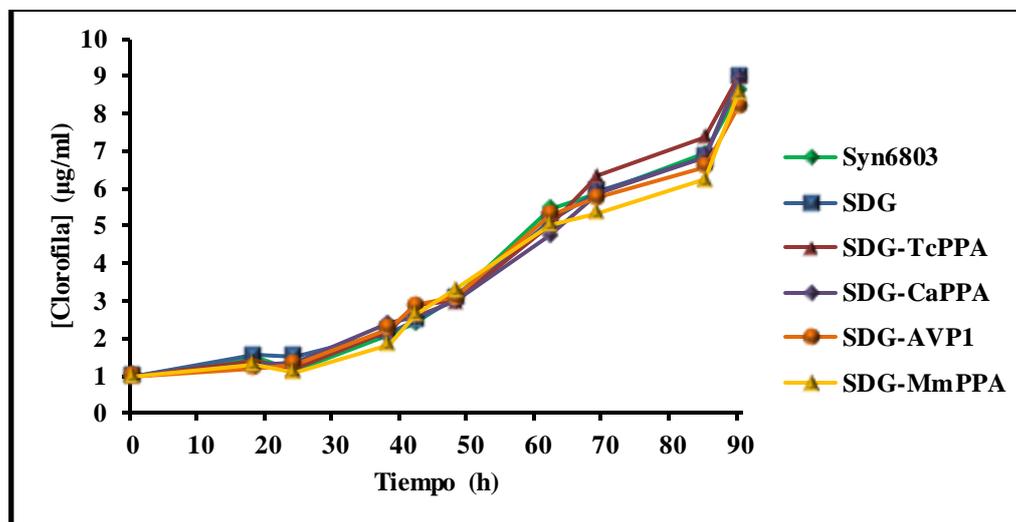


Figura 3.8.3: Crecimiento de los cultivos fotoautotróficos de la estirpe silvestre de *Synechocystis* sp. PCC6803 y sus transformantes obtenidos con los plásmidos pRDG, pRDG-AVP1, pRDG-TcPP, pRDG-CaPP y pRDG-MmPP. A) Aspecto de los cultivos desarrollados en autotrofia tras 4 días de crecimiento. B) Curva de crecimiento de los cultivos desarrollados en autotrofia durante 4 días.

Se llevaron a cabo medidas de actividad PPasa asociada a membranas de extractos crudos de los transformantes y de los controles, tanto en presencia como en ausencia de 100 mM KCl (Figura 3.8.4A). También se realizaron ensayos de *Western blot* con un anticuerpo anti mPPasas, específico para la Na^+ -PPasa de *Thermotoga marítima*. Esto permite detectar polipéptidos con un tamaño aparente de aproximadamente 65 kDa, el tamaño esperado para las mPPasas (Figura 3.8.4B).

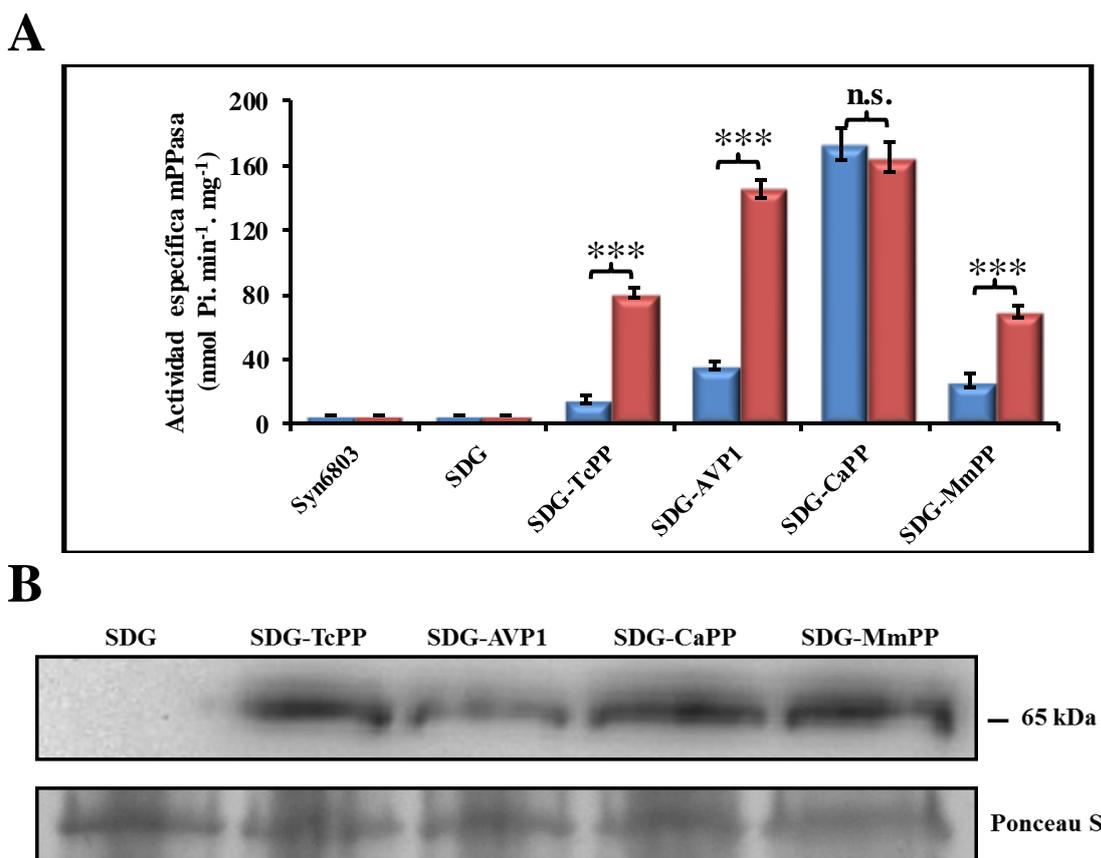


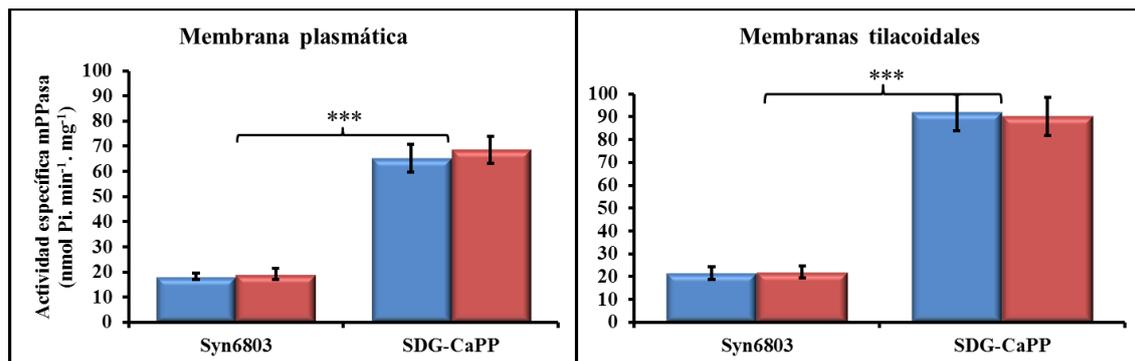
Figura 3.8.4: Análisis de los niveles de actividad mPPasa y proteína de las distintas mPPasas en preparaciones de membranas de las estirpes silvestre y transformantes de *Synechocystis* sp. PCC6803 cultivadas en condiciones fotoautotróficas. **A)** Niveles de actividad específica mPPasa asociada a membranas en extractos de membrana totales. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. **B)** Inmunodetección por *Western blotting* de polipéptidos de mPPasas. Se muestra la tinción con Ponceau S como control de carga. Las barras de error representan error estándar (n = 3; ***, P<0,001; n.s., no significativo).

Estos resultados en conjunto muestran que los transformantes expresores de las diferentes mPPasas no se ven afectados en su crecimiento en comparación con la estirpe silvestre, y muestran unos niveles muy significativos tanto de actividad mPPasa asociada a membranas como de los niveles de los correspondientes polipéptidos. Además, la funcionalidad catalítica propia de los dos tipos de H⁺-PPasas, independientes de K⁺ (tipo I) e independientes de K⁺ (tipo II), se conserva en el sistema de expresión heterólogo bacteriano, lo que indica que no han sufrido alteraciones estructurales y funcionales significativas. Cabe destacar que, según los resultados obtenidos, de las cuatro mPPasas de membrana utilizadas, la de origen bacteriano de *C. aurantiacus* es la que presenta mayores niveles de actividad específica. Sin embargo, los análisis por *Western blot* no muestran una diferencia en los niveles de polipéptidos de mPPasas entre esta estirpe y las

demás. Es posible que el entorno celular cianobacteriano, más similar al nativo de esta mPPasa (p.e. la composición lipídica de la membrana), contribuya a una catálisis más eficiente, aunque este tema todavía no se ha estudiado en detalle.

Por último, y con el fin de determinar la localización celular de estas proteínas y a qué tipo de membranas se encontraban asociadas en la célula cianobacteriana, las preparaciones de membranas totales obtenidas a partir de células transformantes de *Synechocystis* expresoras de la H⁺-PPasa tipo II de *C. aurantiacus* se sometieron a fraccionamiento por ultracentrifugación en gradientes discontinuos de densidad de sacarosa. De esta forma, se pudo separar la fracción de membrana plasmática o celular, de color amarillento, de la fracción correspondiente a las membranas tilacoidales intracelulares, de color verde intenso.

A



B

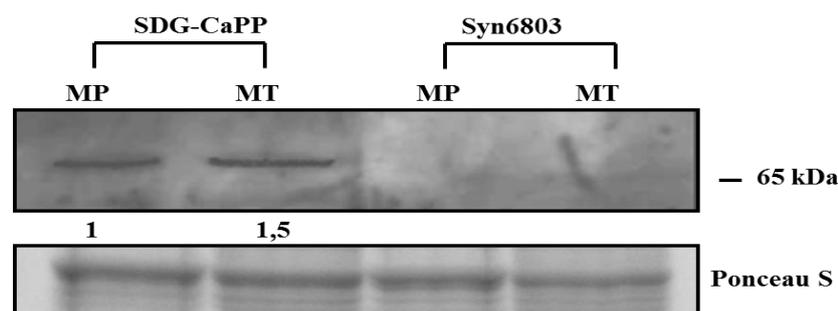
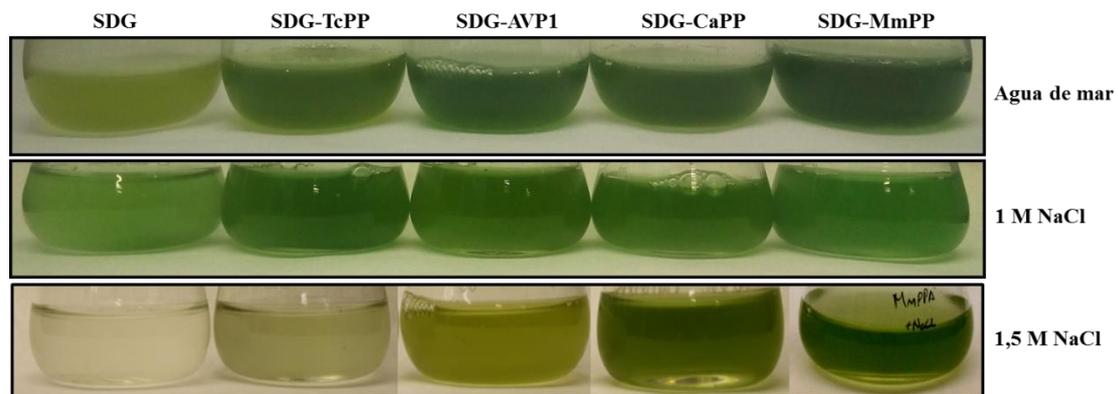


Figura 3.8.5: Niveles de actividad específica y proteína mPPasa de las fracciones de membrana plasmática (MP) y membranas tilacoidales (MT) aisladas por gradiente de densidad de sacarosa de la estirpe silvestre de *Synechocystis* sp. PCC6803 y la transformante SDG-CaPP. **A)** Niveles de actividad específica mPPasa asociada a cada fracción de membranas en las estirpes silvestre y transformante SDG-CaPP. Barras azules: sin KCl; barras rojas: +100 mM KCl en el ensayo. **B)** Inmunodetección por *Western blotting* del polipéptido de H⁺-PPasa en cada una de las fracciones de membranas de las distintas estirpes. Se muestra la tinción con Ponceau S usada como control de carga en la cuantificación. U.R.: unidades relativas. Las barras de error representan error estándar (n = 3; ***, P<0,001).

Los resultados de los niveles de actividad específica mPPasa indicaron claramente que la H⁺-PPasa heteróloga se distribuye entre ambos tipos de membranas, aunque los niveles de actividad específica detectados son algo mayores en las membranas tilacoidales (Figura 3.8.5A). Asimismo, experimentos de inmunodetección mediante *Western blot* del polipéptido mPPasa confirmaron la presencia de la proteína en ambas fracciones de membrana de la estirpe SDG-CaPP. No obstante, se detectaron niveles de proteína ligeramente mayores en las membranas tilacoidales, en concordancia con los datos de actividad. Estos resultados sugieren que la capacidad catalítica de las mPPasas no se altera significativamente por su diferente localización subcelular en la cianobacteria (Figura 3.8.5B).

En vista de los resultados obtenidos, se desarrollaron cultivos de las estirpes transformantes expresoras de las cuatro mPPasas en medio líquido BG11 suplementado con distintas concentraciones de NaCl: 0,3 (con agua de mar en lugar de destilada), 1,0 y 1,5 M. Los cultivos se mantuvieron a 30 °C bajo agitación y con luz continua, y tras 48 h desde la adición de NaCl ya se podían apreciar claras variaciones, tanto en la apariencia como en la velocidad de crecimiento, entre los cultivos de las estirpes transformantes y la estirpe SDG, utilizada como control (Figura 3.8.6A). En presencia de sal, la tasa de crecimiento de los cultivos de todos los transformantes fue claramente mayor que la del control, y dicha diferencia fue más acusada cuanto más alta fue la concentración de NaCl en los cultivos, hasta tal punto que la estirpe SDG no fue capaz de sobrevivir con 1,5 M de NaCl, mientras que las estirpes transformantes sí fueron capaces y mostraron crecimientos significativos en este medio hipersalino (Figura 3.8.6B). Por lo tanto, la expresión heteróloga de mPPasas *Synechocystis* sp. PCC6803, sea cual sea su organismo de origen y/o posean diferentes características catalíticas, aumenta siempre la tolerancia de *Synechocystis* a la salinidad, y permite su supervivencia y crecimiento incluso a un nivel de estrés salino que es letal para la estirpe silvestre. Todas las estirpes se cultivaron también con medio BG11 preparado con agua marina filtrada en lugar de agua destilada. En este caso también se comprobó que las cepas transformantes presentaban un mayor crecimiento que la cepa SDG utilizada como control.

A



B

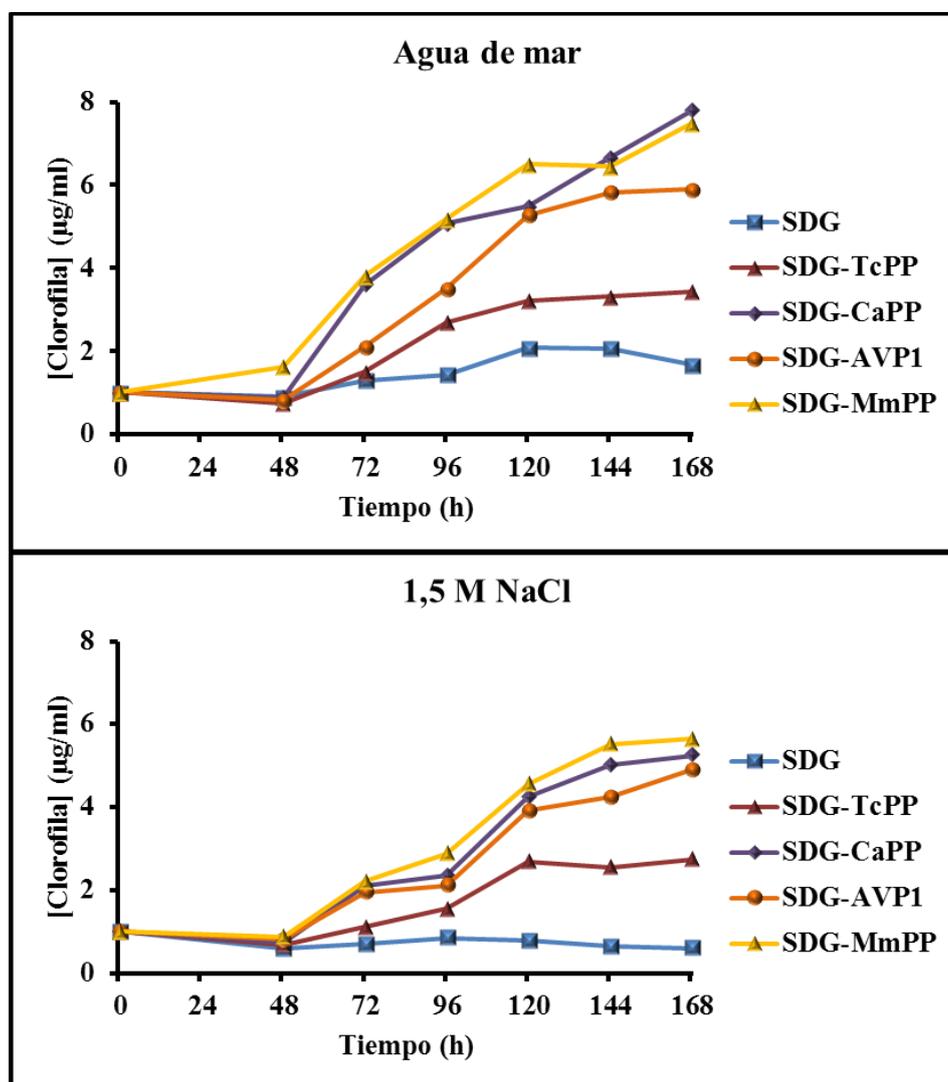


Figura 3.8.6: Efecto del estrés salino sobre el crecimiento fotoautotrófico de cultivos de la estirpe silvestre de *Synechocystis* sp. PCC6803 y las transformantes expresoras de mPPasas. A) Aspecto de los cultivos tras 7 días en condiciones de estrés salino moderado (agua de mar, aprox. 0,3 M NaCl), estrés salino subletal (+1 M NaCl) y estrés salino letal (+1,5 M NaCl). B) Curvas de crecimiento de los cultivos desarrollados en las condiciones de estrés salino indicadas.

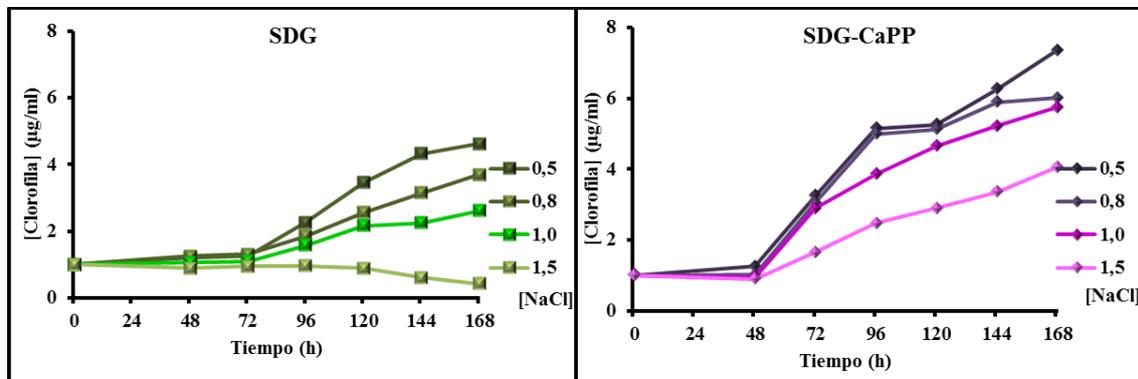
Se pudo observar una clara diferencia de crecimiento entre las distintas especies transformantes en presencia de sal, siendo las estirpes SDG-MmPP y SDG-CaPP las que presentaron el mejor comportamiento (Figura 3.8.6). Esto puede ser debido a la mayor similitud de los entornos celulares de los microorganismos de origen con el de la cianobacteria donde se realizó la expresión heteróloga, o puede ser debido a las diferentes características catalíticas intrínsecas de ambas proteínas. Tanto las Na⁺-PPasas como las H⁺-PPasas independientes de K⁺ presentan una tolerancia a salinidad mayor que las H⁺-PPasas dependientes de K⁺, como indican los resultados obtenidos en otros apartados de esta Tesis.

Aunque en las cuatro estirpes de *Synechocystis* expresoras de mPPasas, los genes para estas se encuentran bajo el control del promotor constitutivo del gen de resistencia a kanamicina, se quiso comprobar si tanto la actividad como los niveles de proteína mPPasa se veían alterados por las altas concentraciones de NaCl añadidas a los cultivos. Para comprobarlo se eligió la estirpe SDG-CaPP, que fue la cepa con mayor actividad específica mPPasa. Se desarrollaron cultivos en medio BG11 suplementados con concentraciones crecientes de NaCl (0,5, 0,8, 1,0 y 1,5 M) a 30 °C y luz continua, y se fueron tomando muestras para realizar curvas de crecimiento de los mismos. Al final de la fase exponencial, se recogieron las células y se sometieron a un fraccionamiento para separar la fracción de membranas de la fracción soluble y poder medir tanto la actividad mPPasa asociada a membranas como los niveles de polipéptido H⁺-PPasa que presentaban.

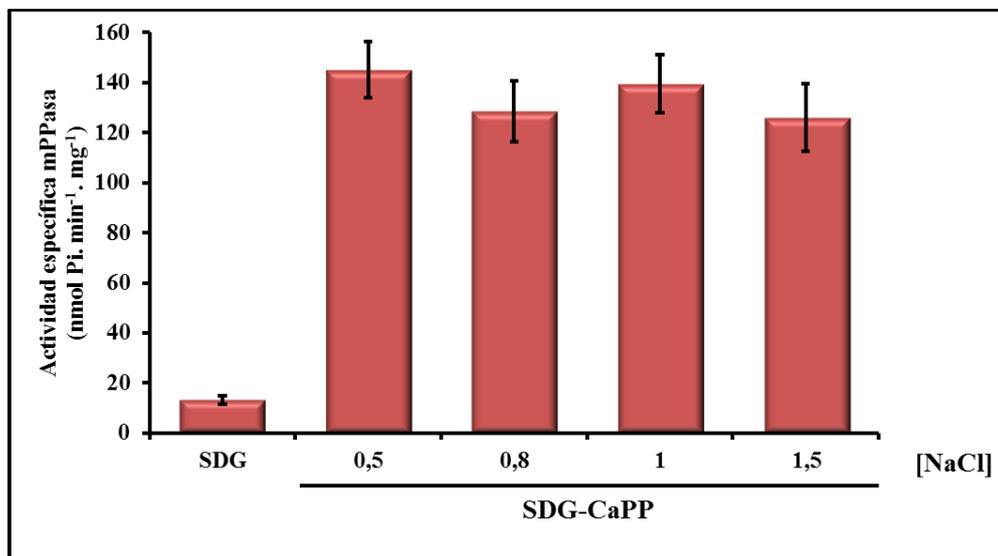
Estos experimentos demostraron que ni los niveles de actividad mPPasa ni los niveles de polipéptido H⁺-PPasa se veían afectados significativamente por las elevadas concentraciones salinas. Sin embargo, las curvas de crecimiento mostraron que la estirpe SDG-CaPP, además de sobrevivir y proliferar bajo un estrés salino letal (1,5 M), alcanzaba en concentraciones salinas subletales tasas de crecimiento claramente superiores a los de la estirpe silvestre, siendo estas diferencias más claramente visibles en las fases finales del desarrollo de los cultivos (Figura 3.8.7). Estos resultados muestran que la presencia de una H⁺-PPasa heteróloga favorece el desarrollo de *Synechocystis* bajo estas condiciones de estrés abiótico, de manera que se reproduce en esta cianobacteria

dulceacuícola, un comportamiento similar al observado en otras especies de cianobacterias naturalmente halotolerantes.

A



B



C

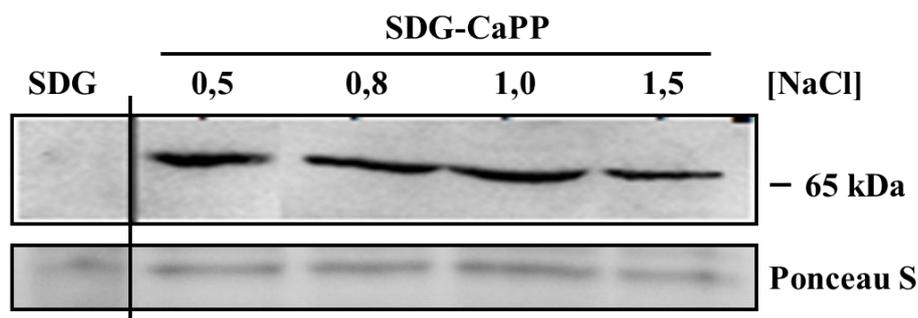


Figura 3.8.7: Crecimiento de las estirpes SDG y SDG-CaPP de *Synechocystis sp.* PCC6803 en presencia de concentraciones crecientes de NaCl, y niveles de actividad específica y proteína mPPasa de las correspondientes fracciones de membranas. **A)** Curva de crecimiento de los cultivos desarrollados en autotrofia durante 7 días en presencia de las concentraciones indicadas de NaCl. **B)** Niveles de actividad específica mPPasa asociada a la fracción de membranas de los cultivos indicados. **C)** Inmunodetección por *Western blotting* del polipéptido H⁺-PPasa en las fracciones de membranas de los cultivos indicados. Se muestra la tinción con Ponceau S usada como control de carga.

En trabajos previos del grupo se ha demostrado que la estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803 es incapaz de crecer si se inactiva por mutagénesis insercional el gen *ppa1* que codifica su única sPPasa, debido a que la subsiguiente acumulación intracelular de PPI es tóxica para el microorganismo (Gómez-García, Losada et al. 2003). Por tanto, nos propusimos comprobar si era posible conseguir una cepa expresora de mPPasas en la que el gen *ppa1* estuviese mutado, con lo que podríamos establecer si una mPPasa es capaz de complementar funcionalmente la deficiencia de PPA1 en esta cianobacteria. Con este fin, se construyó un plásmido similar a pRDG en el que las regiones ZHI y ZHII se sustituyeron por una región del cromosoma de *Synechocystis* aguas arriba de *ppa1* (PPA1 5') que comprende un fragmento 5' del gen *ppa1* y parte de su región 5'-UTR no codificante, y por una región (PPA1 3'), que comprende un fragmento 3' del gen *ppa1* y parte de su región 3'-UTR no codificante. El gen de resistencia a Km se sustituyó por un gen que otorga resistencia a cloranfenicol (*CC1*), situado entre las regiones PPA1 5' y PPA1 3'. El plásmido resultante se denominó pRDP. Al transformar *Synechocystis* con este plásmido, se pretende conseguir la recombinación homóloga entre las regiones PPA1 5' y PPA1 3' del plásmido y del cromosoma cianobacteriano, haciendo que se pierda un fragmento de aproximadamente 300 pb del gen *ppa1* y se interrumpa su expresión (Figura 3.8.8). Los sitios de corte utilizados para las ligaciones son los mismos que se muestran en la figura 3.7.1 para el plásmido pRDG.

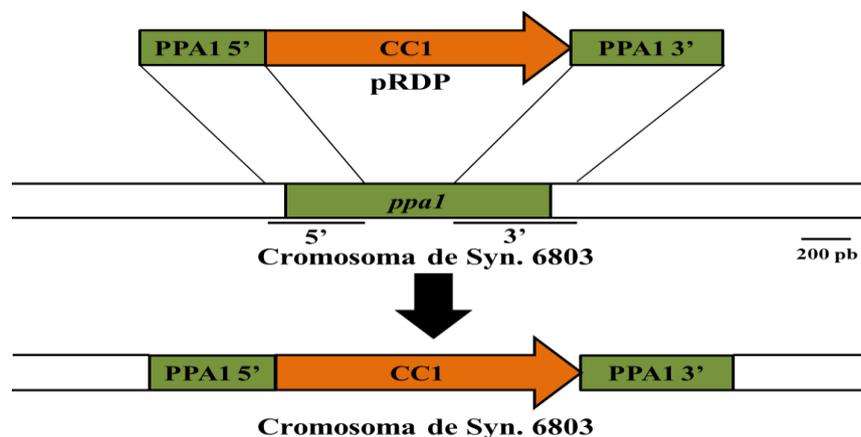


Figura 3.8.8: Estrategia de transformación para inactivar el gen *ppa1* del cromosoma principal de *Synechocystis* sp. PCC6803 y obtener estirpes transformantes carentes de la sPPasa endógena PPA1 y expresoras de mPPasas. Leyenda; PPA1 5'-3': Fragmentos de DNA genómico con parte del gen *ppa1* y de sus regiones flanqueantes no codificantes; *CC1*: Gen de resistencia a cloranfenicol.

Resultados

Las estirpes expresoras de mPPasas y la estirpe SDG, usada como control, se transformaron con el plásmido pRDP y se seleccionaron en placas de BG11 suplementadas con cloranfenicol a una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$, aumentando la misma hasta 80 $\mu\text{g/ml}$ en rondas sucesivas de replicación. A pesar de obtener colonias resistentes a este antibiótico, las comprobaciones mediante PCR mostraron que todas ellas eran merodiploides, no pudiéndose obtener ninguna estirpe en las que la delección del gen *ppal* estuviese completamente segregada.

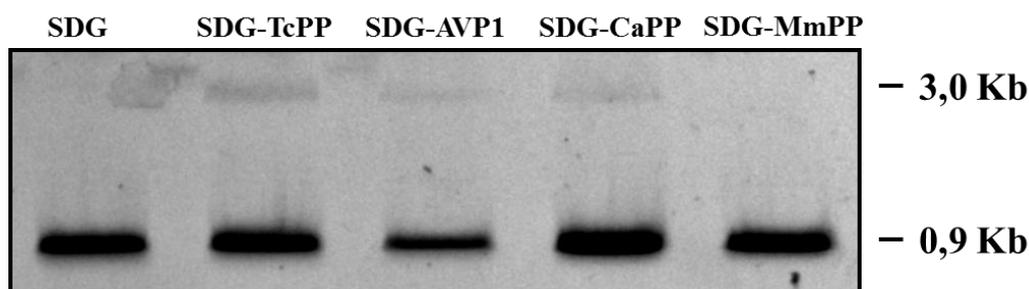


Figura 3.8.9: Comprobación por PCR del grado de integración y segregación del gen *CCI* que codifica la resistencia a cloranfenicol en el locus *ppal* del cromosoma principal de los transformantes de *Synechocystis* sp. PCC6803 expresores de mPPasas. El análisis de los productos de PCR en gel de agarosa mostró que la inserción del gen de resistencia *CCI*, que produciría la amplificación de un fragmente de DNA de aprox. 3,0 Kb según los oligonucleótidos utilizados, se ha producido con eficiencia muy baja en algunos de los transformantes.

El análisis de los productos de PCR mostró una banda mayoritaria en todas las estirpes transformantes de aproximadamente 0,9 Kb, correspondiente al gen *ppal* completo y parte de sus regiones flanqueantes. En algunas estirpes transformantes también aparece una banda de aproximadamente 3 Kb correspondiente al gen *ppal* interrumpido por el gen de resistencia a cloranfenicol, aunque es mucho más tenue que la banda de 0,9 Kb (Figura 3.8.9). Esto puede indicar que la presencia de una mPPasa no es suficiente para soportar los requerimientos de actividad de hidrólisis de PPi de la cianobacteria, posiblemente debido a que la gran cantidad de membranas tilacoidales apiladas que presenta haría que la actividad de la mPPasa no fuera capaz de reducir suficientemente los niveles de PPi . Nuevos estudios son necesarios para esclarecer esta cuestión.

Paralelamente a esto, se procedió a la construcción de un plásmido para interrumpir el gen *nhaS3*, que codifica el principal antiportador Na^+/H^+ de

Synechocystis sp. PCC6803. La incapacidad de este microorganismo para sobrevivir sin este gen también ha sido demostrada (Elanskaya, Karandashova et al. 2002) y se quería comprobar si la presencia de una Na⁺-PPasa funcional en las membranas de la cianobacteria podía complementar la deficiencia del antiportador *nhaS3*. El plásmido para la inactivación de *nhaS3* por recombinación homóloga se construyó de forma análoga al plásmido pRDP y los resultados obtenidos con su transformación en *Synechocystis* también pusieron de manifiesto la imposibilidad de obtener estirpes de esta cianobacteria con el citado gen inactivado (datos no mostrados).

4. DISCUSIÓN

4.1 Expresión heteróloga de la sPPasa de *Moorella thermoacetica* en levadura

Las secuencias CBS (cistationina- β -sintasa) son dominios reguladores que se presentan en proteínas con una gran variedad de actividades catalíticas y que aparecen en todos los reinos de la vida (Hao, Shang et al. 2016). Son dominios de unión a nucleótidos de adenina y las mutaciones en estas secuencias pueden producir diversas enfermedades hereditarias humanas como la retinitis pigmentosa, miotonía congénita, epilepsia, Parkinson, disfunciones cardíacas... (Kemp 2004). Se conocen multitud de proteínas que presentan estos dominios y están implicadas en respuesta a estrés ambiental, tanto en plantas como en animales, como por ejemplo la protein-quinasa activada por AMP (AMPK) en humanos. Gracias a la capacidad que tienen para unirse a nucleótidos de adenina, son capaces de sensar el estado energético celular y pueden regular, directa o indirectamente, los niveles de energía de la célula a través de modificaciones en la razón ATP/(ADP-AMP) (Kemp 2004; Hao, Shang et al. 2016). La proteína CbCBS de *Coleus blumei* actúa aumentando los niveles de ATP durante situaciones de estrés y la proteína iosina-5'-monofosfato dehidrogenasa (IMPDH), que también posee secuencias CBS, controla el metabolismo de los nucleótidos de purina y mantiene los correctos niveles celulares de ATP y GTP (Pimkin and Markham 2008).

En el presente trabajo se ha utilizado la sPPasa Familia II de la bacteria *Moorella thermoacetica* MtPPasa, la cual posee un dominio CBS en su secuencia y está implicada, teóricamente, en la respuesta a estrés ambiental del organismo ya que se activa en situaciones de bajo nivel energético celular (Jämsen, Tuominen et al. 2007). Se pretendía recrear el escenario metabólico del PPi de esta bacteria en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, aunque los resultados obtenidos no permitieron alcanzar este objetivo.

Como se puede observar en el apartado 3.1 de resultados, únicamente la quimera carente del dominio CBS de la MtPPasa fue capaz de complementar la deficiencia funcional de Ipp1p de la cepa YPC3 de *S. cerevisiae*. Este resultado indica que la presencia del dominio CBS en las quimeras impide obtener una versión funcional en levadura tanto de MtPPasa como de Ipp1p, a pesar de que

las cepas transformadas presentaban niveles medibles de actividad PPasa soluble. Los resultados obtenidos mediante análisis por *Western blot* en las distintas cepas hacen pensar que uno de los motivos por los que no se da la citada complementación funcional de Ipp1p podría ser que se está produciendo una degradación proteolítica de las quimeras mediada por el propio dominio CBS, aunque no es posible determinar qué proteasa en concreto la realiza.

Tabla XIII: Pesos moleculares de las quimeras de MtPPasa e Ipp1p con el dominio CBS utilizados en este trabajo.

Quimera	Peso molecular teórico (kDa)	Peso molecular obtenido por <i>Western blotting</i> (kDa)
MtPP-GFP	75	35 (62 en el mutante BJ5459 de <i>S.c.</i> deficiente en proteasas)
MtPP(Δ CBS)-GFP	61	35 (62 en el mutante BJ5459 de <i>S.c.</i> deficiente en proteasas)
SmPP-GFP	60	55/30 (62 en el mutante BJ5459 de <i>S.c.</i> deficiente en proteasas)
Ipp1-CBS	48	45/32
CBS-Ipp1	48	45(muy minoritaria)/32
Ipp1p	32	32

En las cepas transformantes SmPP-GFP e Ipp1-CBS se observaron dos bandas de distintos pesos moleculares, que pueden ser debidas a un procesamiento proteolítico llevado a cabo por alguna de las proteasas de *S. cerevisiae* y en el que el dominio CBS puede estar implicado.

Estos datos por sí solos no explican la no complementación funcional de la deficiencia de Ipp1p de la cepa YPC3 de *S. cerevisiae* por las quimeras que presentan el dominio CBS de la MtPPasa, por lo cual debe existir algún efecto propio de este dominio que impide la correcta expresión de las quimeras. Se analizó la secuencia en busca de dominios que pudiesen alterar la distribución subcelular de las quimeras, como dominios de unión a SRP (Von Heijne 1985), pero no se encontró nada relevante.

4.2 Análisis de expresión de la región promotora del gen *IPPI*

La región intergénica entre el gen YBR011C (*IPPI*) de *S. cerevisiae* y el gen YBR013C, inmediatamente anterior (aguas arriba), comprende unas 2 Kb de ADN no codificante. De esta región, más de la mitad corresponde a retrotransposones, por lo cual es probable que la posible secuencia promotora del gen *IPPI* se encuentre en la región restante. Se han diseccionado las aproximadamente 900 pb que la componen para tratar de determinar la región mínima indispensable para producir la expresión del gen *IPPI*. Para ello se han diseñado vectores de expresión en levadura que expresaban la proteína yEGFP o Ipp1p bajo el control versiones de distinta longitud de la citada región intergénica.

Los resultados obtenidos muestran que existe una secuencia promotora de aproximadamente 157 pb aguas arriba del inicio del gen *IPPI* que es totalmente indispensable para que ocurra la expresión del gen en las condiciones estudiadas.

```

TTTTTCTCGTTTTTTTTTCGACGTTTTAAGGTCGCGTC
GAAGTTAGGAAGGTTAGTTCATTTACAACTTGTTTT
GAATACTTACTTTCTTAATCATCTATTTTGATTGTTG
TCCCTTAGGTCTATAGAACAGGATATCCCGCCGCGC
AATTACTAATG
    
```

Figura 4.1: Secuencia de los 157 nucleótidos inmediatamente anteriores al gen *IPPI*. En rojo se muestran las posibles secuencias de inicio de transcripción. En verde se muestra una secuencia para una posible caja TATA débil. En azul se muestra el codón de inicio de transcripción del gen *IPPI*.

Esta región es rica en nucleótidos A/T, característica común entre los promotores eucariotas (Lo and Smale 1996) y, además, dentro de ella existen varias secuencias (C/T)(C/T)CA(C/T)(C/T), reconocidas por muchos autores como una señal consenso de inicio de transcripción en eucariotas (Javahery, Khachi et al. 1994). También existe una secuencia GATATC dentro de esta región que está reconocida como una caja TATA débil y presenta menor efectividad que la caja TATA convencional (TATAAA) (Zenzie-Gregory, Khachi et al. 1993). No aparecen secuencias de cajas TATA típicas en esta región, aunque está demostrado que no todos los promotores precisan de este

tipo de secuencias para su expresión eficaz (Smale and Baltimore 1989). En 1985, se realizó un análisis de 18 promotores de levadura (Hahn, Hoar et al. 1985) y se establecieron dos posibles secuencias consenso para el inicio de transcripción en levadura:

- TC(G/A)A.
- RRYRR, siendo Y un nucleótido de pirimidina y R un nucleótido de purina.

Dentro de la secuencia de estudio existen varios posibles sitios de inicio de transcripción, algo común dentro de los promotores de levadura (Guarente, Lalonde et al. 1984). Las cajas TATA, en caso de existir, se encuentra a una distancia de +/-30 nucleótidos del punto de inicio de transcripción.

No se observaron diferencias de expresión entre las cepas transformantes que contenían secuencias promotoras de 900 pb y las de 350 pb en las condiciones de estudio. Según la literatura, las zonas donde aparecen las regiones de unión a elementos reguladores se pueden situar hasta a 1 Kb de distancia de los elementos TATA (Hahn, Hoar et al. 1985). Se utilizó el programa informático Patch 1.0 TRANSFAC[®] para analizar la secuencia intergénica en busca de posibles sitios de unión a factores de transcripción (Tabla XIV).

Una gran parte de estos factores de transcripción están implicados en la regulación del metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos y azúcares. También aparecen algunos relacionados con el control del ciclo celular y la respuesta a estrés ambiental. En conjunto, sus características están de acuerdo con el papel clave que juega la sPPasa en el anabolismo celular y en la respuesta celular a situaciones de estrés.

Se pudo observar que las distintas cepas crecían a una tasa similar siempre y cuando presentaran expresión del gen *IPP1*, no dándose crecimiento alguno cuando la expresión del gen era nula. Este dato demuestra que en *S. cerevisiae* se necesita un nivel mínimo de actividad PPasa para que se de proliferación celular, pero el aumento de dicha actividad no mejora esta proliferación en las condiciones de trabajo utilizadas.

Tabla XIV: Sitios de unión a factores de transcripción identificadas en la secuencia promotora del gen *IPPI* de *S. cerevisiae* mediante análisis informático.

900 pb	350 pb	157 pb	Función conocida
MED8			Represor <i>HXK2</i> (Hexoquinasa) y <i>SUC2</i> (Sacarosa hidrolasa)
GCR1	GCR1		Activador de transcripción, enzimas glicolíticas y ribosomales
LYS14			Regulación metabolismo de la lisina
GCN4	GCN4		Regulación genes de biosíntesis proteica
GAL4	GAL4		Regulación genes de respuesta a galactosa
TBP			Activador de polimerasas
MIG1	MIG1	MIG1	Regulación de genes de represión por glucosa
NDT80			Regulación de genes de gametogénesis
ROX1			Represor de genes de hipoxia
HAP2	HAP2		Activador genes de la cadena de transporte e ⁻ mitocondrial
ABF2	ABF2		Regulación genes de proteínas mitocondriales y mtADN
DAL80	DAL80		Represor
ADR1	ADR1		Activador
FKH1-2			Regulación centrómeros, ciclo celular y morfología
MET31-32			Regulación del metabolismo de aminoácidos
UME6	UME6		Represor del catabolismo
DSC1	DSC1	DSC1	Regulación de genes de síntesis de ADN
MCBF	MCBF	MCBF	Regulación de genes del ciclo celular
PRP/RPH1	PRP/RPH1	PRP/RPH1	Respuesta a estrés ambiental
Rep. CAR1	Rep. CAR1	Rep. CAR1	Regulación del metabolismo de la arginina

4.3 Implicaciones funcionales de variaciones inducidas en la distribución núcleo-citoplásmica de la sPPasa Ipp1p de *Saccharomyces cerevisiae*

Ipp1p había sido descrita como una enzima estrictamente citosólica, pero estudios “in vivo” con quimeras unidas a proteínas fluorescentes así como ensayos de actividad e inmunodetección en fracciones subcelulares han demostrado que se trata de una proteína con localización núcleo-citoplásmica. La alteración de esta distribución afecta tanto a los niveles de actividad sPPasa celular como a los del polipéptido de Ipp1p, siendo ambos menores en las células que tienen la sPPasa confinada en el núcleo y mayores en aquellas donde la proteína es excluida activamente del mismo. La alteración de la distribución subcelular de Ipp1p también altera otros parámetros biológicos de la célula; como son la tasa de crecimiento, la capacidad replicativa o el envejecimiento celular (*lifespan* cronológico). La importancia de la presencia de esta proteína en ambos compartimentos mediante un transporte núcleo-citoplásmico hace suponer que su distribución subcelular está altamente regulada por la célula.

Mediante análisis informáticos de la secuencia de Ipp1p con el programa de predicción NLStradamus (www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/) se ha podido detectar una secuencia 74-KKGKLR-79 que puede corresponder a una clásica señal NLS monopartita endógena (NLSe). Esta secuencia de aminoácidos básicos se encuentra altamente conservada entre sPPasas eucarióticas muy alejadas evolutivamente, pero se encuentra ausente en las sPPasas procarióticas. Para comprobar *in vivo* que efectivamente se trata de una secuencia NLS funcional en el transporte núcleo-citoplásmico, se han generado una serie quimeras de Ipp1p-GFP con distintas mutaciones de la región NLSe, mediante mutagénesis directa o por delección. Todas las cepas transformadas con estas quimeras mostraron una alteración de la distribución subcelular de Ipp1p, aumentando sus niveles en la fracción citosólica y disminuyendo levemente en la fracción nuclear. Cabe destacar que el motivo NLSe está localizado en la superficie de las subunidades del dímero de la sPPasa de levadura, como se ha demostrado mediante análisis de su estructura tridimensional, y haría estas secuencias fácilmente accesibles al reconocimiento y unión física a las importinas para su ingreso en el núcleo. Los niveles de proteína y actividad

sPPasa de las cepas que expresaban las quimeras fueron mayores que los de la cepa control, tal y como ocurre en cepas que expresaban la quimera Ipp1p-GFP unida a una señal potente de exclusión nuclear exógena (NES). Estos resultados apoyan la teoría de que efectivamente la secuencia NLSe actúa como una verdadera señal de localización nuclear de Ipp1p y que es la única secuencia de estas características que es funcional en esta proteína. Por otro lado, las quimeras de Ipp1p-GFP unidas a tres secuencias exógenas consecutivas NLS del antígeno T del virus SV40 (un potente dominio NLS exógeno), mostraron una distribución opuesta a las quimeras de Ipp1p-GFP con la señal NLSe alterada, apareciendo confinadas en el núcleo celular. Los niveles de proteína y actividad sPPasa en extractos totales fueron mucho menores que los observados en la cepa control o en la cepa que expresaba Ipp1p-NES-GFP, indicando que el confinamiento nuclear de la proteína quimérica disminuye significativamente la estabilidad de la misma. Estos niveles fueron comparativamente superiores en la fracción nuclear que en la fracción citoplásmica, aunque se pudieron observar valores residuales en esta fracción, lo que sugiere la existencia de una secuencia crítica débil de exclusión nuclear NES en Ipp1p que aún no ha sido detectada. De hecho, análisis de la secuencia de Ipp1p con el programa de predicción NetNES detectaron una región de 10 residuos (V148-L157) rica en valina, alanina y leucina, que podría corresponder a una señal NES endógena que esta conservada en otras sPPasas eucarióticas (datos no mostrados).

Los bajos niveles de Ipp1p observados en el núcleo de todas las cepas expresoras de las distintas quimeras nos llevó a estudiar el mecanismo por el que esta localización subcelular afecta a su estabilidad. El mantenimiento de estos bajos niveles nucleares de la proteína sugiere la existencia de una degradación proteica específica en el compartimento nuclear. En eucariotas, la degradación proteica depende del grado de ubiquitinización de las proteínas (Ravid and Hochstrasser 2008). Así que en teoría, debe observarse un mayor grado de ubiquitinización de las quimeras de Ipp1p confinadas en el núcleo, lo cual hemos podido comprobar en este estudio. A pesar de que todas las quimeras mostraron ubiquitinización, esta fue mayor en la quimera Ipp1p-GFP-NLS y menor en la quimera Ipp1p-NES-GFP comparadas ambas con la quimera control Ipp1p-GFP. Análisis “ómicos” a gran escala de las proteínas

ubiquitinizadas de *S. cerevisiae* llevados a cabo mediante espectroscopía de masas han identificado dos residuos (K239 y K279) de la secuencia de Ipp1p que efectivamente se ubiquitinan (Starita, Lo et al. 2012). Para completar este estudio, se analizó mediante co-inmunoprecipitación si existía una interacción física entre las quimeras Ipp1p-GFP con distinta localización subcelular y la deubiquitinasa Ubp3p, una proteasa implicada en la ruta de degradación proteasomal. Se pudo observar que se daba una interacción física entre ambas proteínas únicamente en las cepas que expresaban la quimera control Ipp1p-GFP e Ipp1p-GFP-NLS, mientras que no se producía en la cepa que expresaba la quimera Ipp1-NES-GFP, activamente excluida del núcleo. Estos resultados construyen evidencias claras de que se produce una degradación proteica de Ipp1p mediada por el sistema ubiquitina-proteasoma nuclear.

Nuestros resultados muestran que la distribución de Ipp1p se encuentra altamente regulada por los mecanismos de tráfico núcleo-citosólico y por degradación proteasomal. Esto pone de manifiesto la importancia del control de los niveles de PPi para el correcto desarrollo de procesos que ocurren en el espacio nuclear, como la replicación y reparación del DNA y la síntesis de RNA, relacionados directamente con procesos biológicos tan relevantes como la proliferación celular o el envejecimiento. Hay estudios que demuestran que los niveles de PPi están relacionados con el grado de fidelidad de las ADN y ARN polimerasas, además la pirofosforólisis puede estar implicada en mecanismos de reparación del ADN (Vaisman, Ling et al. 2005). Esto hace pensar que los mecanismos que regulan la distribución núcleo-citoplásmica de Ipp1p pueden estar directamente involucrados en la eficiencia de la polimerización del ADN y ARN, así como en la estabilidad genética. Este punto está siendo estudiado actualmente por nuestro grupo.

4.4 Reproducción del escenario metabólico del PPi de células vegetales utilizando *S. cerevisiae* como modelo eucariótico

El escenario metabólico del PPi en células vegetales es complejo, debido a la presencia simultánea de sPPasas localizadas en orgánulos (plástidos, mitocondrias), no en el citosol, y mPPasas localizadas en endomembranas

(tonoplasto, sistema Golgi, membrana lisosomal). Además existe un tercer tipo de enzimas, las H^+ -ATPasas tipo V (V-ATPasas), que realizan una función equivalente a las mPPasas y están también localizadas en endomembranas, pero utilizando como sustrato ATP en lugar de PPi. Este hecho sugiere que la coexistencia de estas proteínas debe estar altamente regulada por la célula y abre un interesante campo de estudio.

Nuestro grupo ha demostrado la capacidad de la mPPasa mayoritaria de *Arabidopsis thaliana* (AVP1) para complementar la deficiencia de la sPPasa soluble de *S.cerevisiae* (Pérez-Castiñeira, López-Marqués et al. 2002; Drake, Serrano et al. 2010) y para complementar la deficiencia de la V-ATPasa de este mismo organismo cuando se localiza en la membrana vacuolar, si bien esta última complementación no es posible en presencia de una sPPasa soluble (Pérez-Castiñeira, Hernández et al. 2011). La presencia de varias PPasas tanto solubles como de membrana en las células de *A. thaliana*, unida a los datos obtenidos en estos trabajos, plantea el interrogante sobre cómo es capaz la célula vegetal de regular la actividad de todas ellas y qué sentido tiene la presencia en las membranas de los mismos orgánulos de mPPasas y ATPasas.

En el presente trabajo se ha tratado de responder a estas cuestiones, ampliando los resultados obtenidos en otro trabajo previo del grupo (Serrano-Bueno, 2012), que ya permitían entrever la capacidad de AVP1 para complementar la V-ATPasa de *S. cerevisiae* cuando la sPPasa endógena (Ipp1p) se encontraba compartimentalizada en el interior del núcleo. Los datos obtenidos refuerzan esta teoría y demuestran el bombeo de protones y la acidificación vacuolar promovidos por AVP1 en células donde la actividad V-ATPasa está reprimida solo se producen eficientemente cuando la sPPasa se confina en el núcleo. Esto permite proponer que el escenario metabólico del PPi en células vegetales debe ser muy parecido al que se ha reproducido en células de levadura, estando las sPPasas confinadas en algún orgánulo celular, núcleo y/o plástidos, donde no interfieren con la actividad de las mPPasas. Es interesante señalar a este respecto que la secuencia NLSe está presente también en las sPPasas plastídicas de microalgas y plantas (A. Serrano, comunicación personal), por lo que estas proteínas podrían tener una localización dual núcleo-

plástidica en estos organismos. Este punto está siendo estudiado actualmente por nuestro grupo.

La complementación observada de la V-ATPasa por AVP1 puede explicar por qué las plantas son tolerantes a amino-fungicidas, que afectan a la capacidad de la V-ATPasa para bombear protones y acidificar orgánulos internos, debido a que estos compuestos alteran el metabolismo de esteroides (p.e. afectando a la esteroil isomerasa codificada por el gen *ERG2* de *S. cerevisiae*), que están implicados en el acoplamiento de la actividad de hidrólisis de la V-ATPasa con la actividad de bombeo de H⁺ de esta compleja máquina molecular. La mayor tolerancia a Tridemorph, y otros compuestos que actúan sobre la V-ATPasa, observada en las células de levadura que expresan AVP1 concuerda con lo que ocurre en plantas. Además, los mutantes de *A. thaliana* deficientes en AVP1 presentan una mayor sensibilidad a Tridemorph que la cepa silvestre, especialmente en la formación de las raíces. Este hecho se explica por la mayor importancia cuantitativa y cualitativa de AVP1 en el meristemo radicular, siendo además la mPPasa más expresada en *A. thaliana*, y por la dependencia de la elongación de las raíces de los mecanismos de acidificación luminal (Barrada, Montané et al. 2015). Además, se ha demostrado que AVP1 es el regulador esencial de los niveles de PPi citosólicos (Ferjani, Segami et al. 2012). La mayor sensibilidad a Tridemorph no se observa en los mutantes deficientes en AVP2 de *A. thaliana*, ya que esta proteína se expresa en menor medida que AVP1 y preferentemente en el meristemo apical, donde hay una presencia simultánea de AVP1, lo que explicaría el mínimo efecto del Tridemorph sobre este tejido. La tercera mPPasa de *A. thaliana* (AVP3) se expresa a niveles muy reducidos, por lo que no es probable que la deficiencia de la misma conlleve una mayor sensibilidad de los mutantes al amino-fungicida.

En resumen, la presencia simultánea de mPPasas y V-ATPasas en las membranas de los orgánulos internos puede otorgar una mayor resistencia a compuestos que afectan a la acción de alguna de ellas, siendo una ventaja adaptativa importante con respecto a aquellos organismos que solo presentan una de ellas.

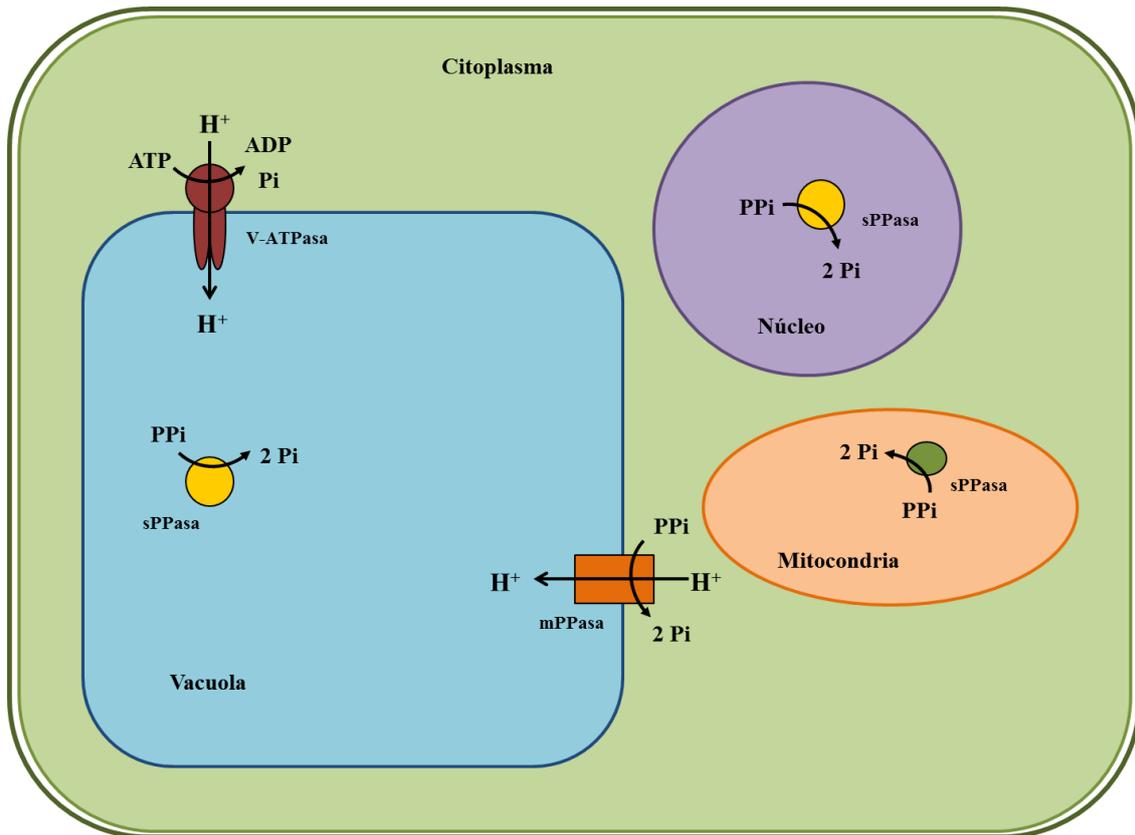


Figura 4.2: Modelo del escenario metabólico del PPi en una célula vegetal, con sPPasas localizadas en la matriz de diversos orgánulos y mPPasas localizadas en endomembranas (p.ej. tonoplasto).

4.5 Regulación de las mPPasas de microalgas eucarióticas por condiciones ambientales tróficas y de estrés

Dentro de las microalgas eucariotas existe una gran diversidad en cuanto a los tipos de mPPasas que presentan en sus membranas y la distribución de las mismas. Existen especies que, de acuerdo con la información obtenida de los distintos Proyectos Genoma, sólo poseen H⁺-PPasas dependientes de K⁺ (*C. reinhardtii*, *C. euryale*), especies que poseen H⁺-PPasas tanto dependientes como independientes de K⁺ (*Ch. salina*, *Chlorella* sp. N64A), y especies que sólo presentan H⁺-PPasas independientes de K⁺ (*G. sulphuraria*, *Nannochloropsis* spp.). Hay que señalar a este respecto que análisis filogenéticos realizados por nuestro grupo con microalgas eucariotas marinas indican que muchas especies de diversos grupos taxonómicos (Prasinofíceas, Estramenópilos, Alveolados, Criptofitas, Haptofitas, Clorarachniofitas, Rodofitas) pueden poseer Na⁺-PPasas, además de los dos tipos de H⁺-PPasas

mencionados anteriormente (p.ej. *O. tauri*, *Ph. tricornutum*, *P. purpureum*) (Figura 4.3). Estas serían las primeras Na⁺-PPasas descritas de organismos eucariotas, ya que hasta ahora se habían identificado únicamente en bacterias y arqueas (Malinen, Belogurov et al. 2007). En cualquier caso, la amplia distribución de estas Na⁺-PPasas entre algas marinas sugiere que podrían ser piezas claves de un nuevo tipo de estrategia metabólica de tolerancia a la salinidad evolutivamente conservada en estos organismos.

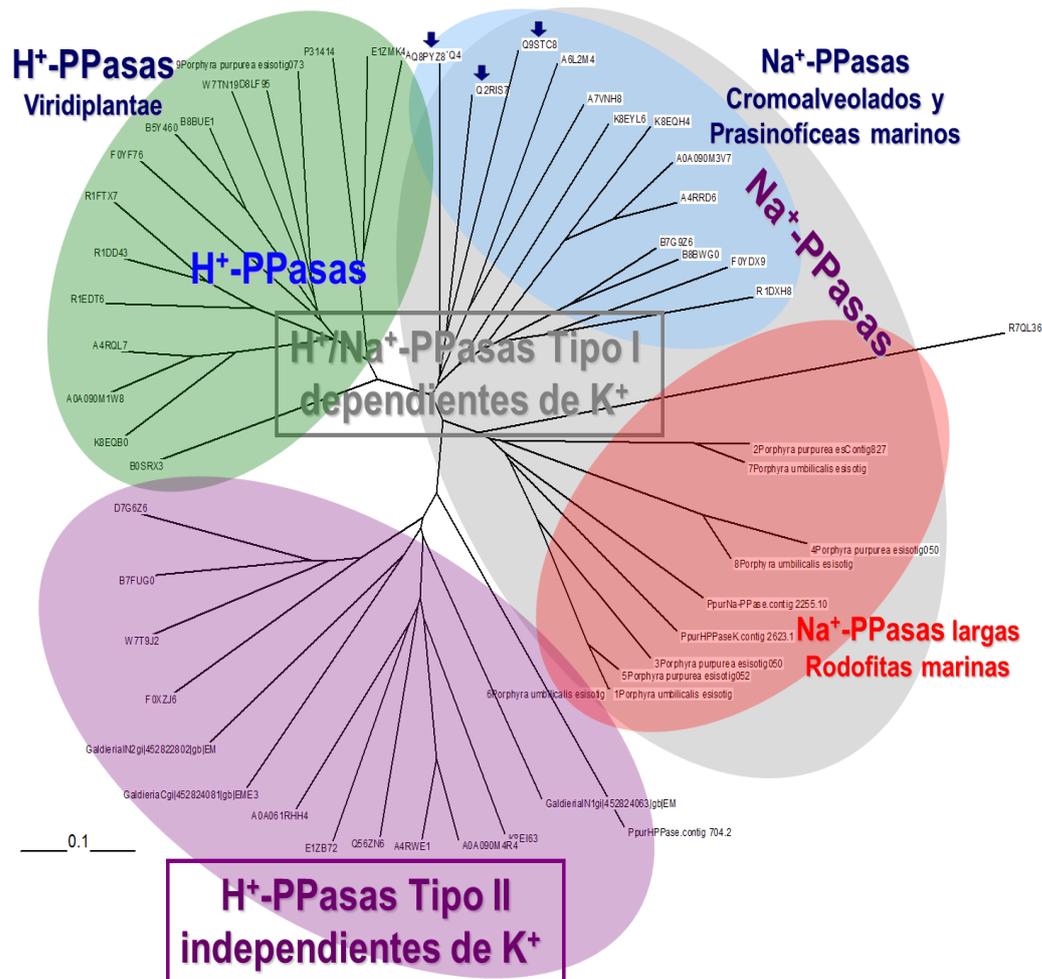


Figura 4.3: Árbol filogenético de distancias evolutivas de las tres clases de mPPasas presentes en los organismos eucarióticos fotosintéticos: H⁺-PPasas dependientes de K⁺, Na⁺-PPasas (dependientes de K⁺) y H⁺-PPasas independientes de K⁺. Nótese que las Na⁺-PPasas bien caracterizadas bioquímicamente de bacterias y arqueas (indicadas por flechas) se sitúan en la base del grupo de sus ortólogos de microalgas marinas de las que podrían ser sus ancestros evolutivos. Las secuencias están identificadas por sus códigos UniprotKG. El alineamiento de las secuencias de proteínas se hizo con el programa CLUSTALX mediante un algoritmo NJ.

Numerosos estudios llevados a cabo con plantas superiores, relacionan la presencia de las mPPasas con la adaptación de estos organismos a diversas situaciones de estrés ambiental, como la salinidad (Gao, Gao et al. 2006) o la presencia de pesticidas y otros xenobióticos (Yao, Zeng et al. 2012). Esto ha llevado a numerosos autores a sobreexpresar H⁺-PPasas dependientes de K⁺ vegetales, homólogas o heterólogas, en diversas especies de plantas cultivables para tratar de mejorar su resistencia a la salinidad u otros estreses abióticos (Xing, YanWen et al. 2010; Hanjagi, Sashidhar et al. 2011). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la actividad mPPasa asociada a membrana se ve afectada por la presencia de NaCl en una relación directa con la dependencia de K⁺ que presenten, es decir: la actividad de hidrólisis de PPi en membranas que presentan mPPasas con mayor dependencia de K⁺ disminuye mucho más en presencia de la misma concentración de NaCl que la de membranas que presentan actividad mPPasa menos dependiente de K⁺. En este trabajo se ha podido verificar este hecho comparando la eficiencia catalítica (E.C.) de ambos tipos de mPPasas en presencia o ausencia de NaCl. Mientras que la E.C. de las dos H⁺-PPasas dependientes de K⁺ estudiadas (*C. reinhardtii* y *C. euryale*) disminuía en presencia de NaCl, este mismo parámetro de una H⁺-PPasa independiente de K⁺ (*G. sulphuraria*) incluso se incrementó en presencia de la misma concentración de NaCl. El efecto de la salinidad sobre la actividad también es menor en las Na⁺-PPasas que son inhibidas a concentraciones muy altas de NaCl, llegando incluso a mostrar una estimulación a concentraciones fisiológicas (aprox. 10 mM) de sodio. Todo esto nos lleva a sugerir que sería más conveniente utilizar H⁺-PPasas independientes de K⁺ o Na⁺-PPasas para mejorar la tolerancia a salinidad en vegetales de interés agrotecnológico. Se ha podido comprobar que las especies de microalgas estudiadas que sólo presentan actividad H⁺-PPasa independiente de K⁺ en sus membranas, presentan una sensibilidad menor de esta a la adición de NaCl en el ensayo de forma paralela a su comportamiento respecto a la salinidad. La insensibilidad a sal de las H⁺-PPasas independientes de K⁺ radica en la ausencia de un sitio regulador en su estructura al que se unen tanto el K⁺ como el Na⁺, y por el que computen, tanto el K⁺ como el Na⁺. Hay que señalar a este respecto que el hecho de que las especies del género *Nannochloropsis* únicamente contengan H⁺-PPasas independientes de K⁺ en sus membranas es un caso

inusual dentro de los organismos eucariotas, y constituye un ejemplo de estrategia adaptativa hacia una mayor halotolerancia de la bioenergética de estos organismos (Figura 4.4).

Hemos podido observar que el tipo y abundancia de mPPasas en las membranas de las distintas especies de microalgas está relacionado con su respuesta al estrés salino, siendo las especies más sensibles a salinidad aquellas que presentaban sólo H^+ -PPasas dependientes de K^+ (*C. reinhardtii*) o aquellas que, aun presentando también H^+ -PPasas independientes de esta catión, presentaban un componente mayoritario de dependencia por el K^+ en su actividad mPPasa asociada a membranas (*Chlorella* sp. N64A). La especie eurihalina *C. euryale* tiene una alta tolerancia a salinidad a pesar de contar con una única H^+ -PPasa dependiente de K^+ , posiblemente debido a que sus niveles de actividad y proteína mPPasa son extraordinariamente altos. En general existen dos estrategias de tolerancia a salinidad, una es el desarrollo de sistemas de transporte de protones resistentes a la presencia de sodio y otra la presencia de fuertes sistemas de extrusión de sodio que mantengan bajos los niveles citosólicos de este metabolito aunque los niveles en el exterior celular (lumen vacuolar incluido) sean altos. Este último podría ser el escenario metabólico desarrollado por *C. euryale* mediante la alta expresión de su H^+ -PPasa dependiente de K^+ asociada a antiportadores Na^+/H^+ . Las especies que poseen unos niveles altos de actividad mPPasa independiente de K^+ o que, posiblemente, expresan Na^+ -PPasas presentan una tolerancia mayor a la presencia de sal en el medio, siendo la mayoría de ellas de ambientes marinos o con óptimos de crecimiento a una salinidad similar a la del agua marina. En este estudio no se ha observado la excepcional tolerancia salina de la especie *G. sulphuraria* descrita por otros autores (Gross and Oesterhelt 1999), probablemente debido a que no se ha cultivado a su temperatura óptima de crecimiento. Otro hecho interesante que se puede extraer de los resultados obtenidos en este trabajo es que las especies más sensibles a la salinidad en el medio de cultivo, aquellas que poseen predominantemente una actividad mPPasa dependiente de K^+ , presentan una inducción de los niveles tanto de actividad como de polipéptido mPPasa que no se observa en aquellas otras especies con una tolerancia mayor a la salinidad. Esto podría deberse a una

estrategia de la microalga dirigida a mantener los niveles de actividad de sus bombas de iones adecuados para su correcto funcionamiento, en condiciones donde sus mPPasas pueden verse afectadas. Sin embargo, el estudio de actividad mPPasa de la especie halófila extrema *Dunaliella salina* (Figura S.6) muestran que sus niveles de actividad mPPasa tienen un máximo a concentraciones de NaCl de 0,5 M en el medio de cultivo, siendo inexistentes a concentraciones hipersalinas de 1,5-3,0 M. Esto nos hace pensar que la sobreexpresión de las mPPasas es una buena estrategia de tolerancia a aumentos leves de salinidad, pero se necesitan otros mecanismos para hacer frente eficientemente a valores de salinidad muy elevados. En resumen, podemos decir que las microalgas eucariotas presentan tres estrategias distintas de adaptación a medios salinos según el tipo de mPPasas que presenten: 1) Sobreexpresar las H⁺-PPasas dependientes de K⁺; 2) Utilizar H⁺-PPasas independientes de K⁺; o 3) Utilizar Na⁺-PPasas.

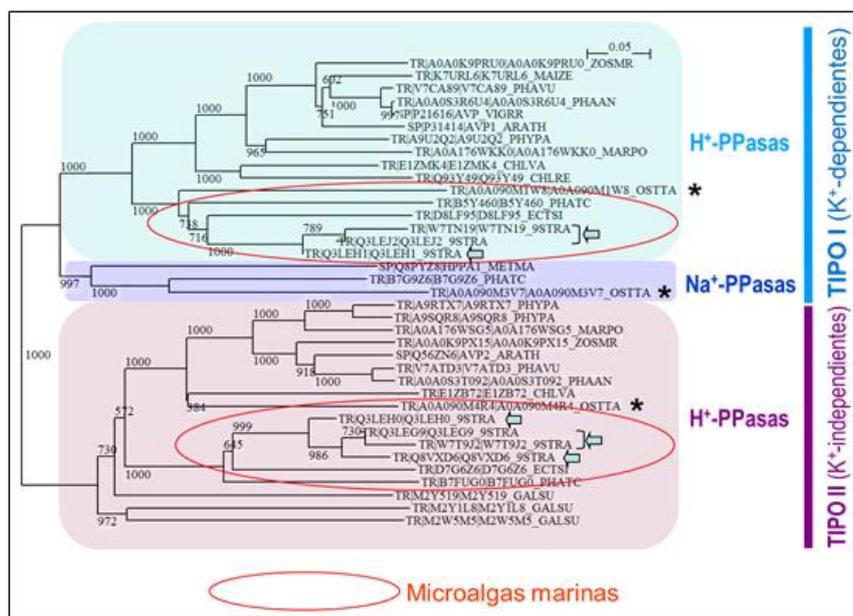


Figura 4.4: Árbol filogenético de distancias evolutivas de las mPPasas de distintas especies de organismos eucarióticos fotosintéticos, con especial énfasis de algunas especies de microalgas marinas estudiadas en esta Tesis. Las flechas indican secuencias de H⁺-PPasas de especies del género *Nannochloropsis* analizadas en este trabajo: *N. gaditana*, 2 codificadas por el genoma (1 tipo I y 1 tipo II) que corresponden a 2 secuencias de PCR; *N. oculata*, 2 secuencias de PCR (I y II); y *N. salina*, 1 secuencia de PCR (tipo II) (López-Marqués, Tesis Doctoral). Los asteriscos indican las tres secuencias de mPPasas codificadas por el genoma de la prasinofícea *Ostreococcus tauri*: 2 de tipo I (1 H⁺-PPasa y 1 Na⁺-PPasa) y 1 una H⁺-PPasa de tipo II. Esta última no se agrupa con las H⁺-PPasas tipo II de otras microalgas marinas sino con las de microalgas dulceacacuólicas y plantas. Las secuencias están identificadas por sus códigos UniprotKG. El alineamiento de las secuencias de proteínas se hizo con el programa CLUSTALX mediante un algoritmo NJ y los números de los nodos indican el soporte estadístico (*bootstrap* de 1000 replicaciones) de los grupos.

En estudios anteriores del grupo (López-Marqués, 2004; Herrera-Palau, 2011), se estableció que la H⁺-PPasa de *C. reinhardtii* presenta un patrón de expresión mediado por la luz, induciéndose su expresión génica en presencia de luz y reprimiéndose casi totalmente en condiciones de oscuridad. En el presente trabajo hemos podido confirmar estos resultados, aunque observando unos niveles intermedios de actividad y proteína mPPasa en condiciones mixotróficas. Paralelamente a la disminución de la actividad y niveles de polipéptido de H⁺-PPasa, se observó un aumento de los niveles de polipéptidos de las dos sPPasas presentes en la microalga cultivada en presencia de acetato (mixotrofia y heterotrofia). Esto puede deberse a la activación del metabolismo respiratorio y de la síntesis cloroplástica de almidón producido por la presencia de una fuente orgánica de carbono en el medio de cultivo, lo que llevaría asociado un aumento de los niveles de PPI en diversos compartimentos intracelulares.

En la especie *Chlorella* sp. N64A también pudo observarse una disminución de actividad mPPasa dependiente de K⁺ en condiciones de mixotrofia y heterotrofia, indicando una regulación por la luz de la H⁺-PPasa dependiente de K⁺, y un aumento de los niveles de la actividad mPPasa independiente de K⁺ en las mismas condiciones, lo cual puede deberse a que la H⁺-PPasa independiente de K⁺ tenga alguna función relacionada con la asimilación y/o transporte de la glucosa. Esta modificación del patrón de expresión también se ve reflejada en los niveles de polipéptidos de mPPasas, aunque nos es imposible distinguir ambos tipos de mPPasas con el anticuerpo utilizado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con la especie *G. sulphuraria*, donde observamos un aumento de la actividad mPPasa, independiente de K⁺ únicamente en este caso, en condiciones de mixotrofia y heterotrofia. Por trabajos anteriores (Herrera-Palau, 2011) sabemos que se produce una inducción de dos de los tres genes para mPPasa que posee el organismo y que normalmente se encuentran reprimidos en condiciones de autotrofia (Gs15900 es constitutivo). Curiosamente los dos genes inducibles de H⁺-PPasas independientes de K⁺ presentan una mutación puntual de un residuo de isoleucina por uno de valina que se ha demostrado produce un desacoplamiento de la actividad PPI-hidrolasa con el transporte de H⁺ en la H⁺-

PPasa de *Vigna radiata* (Asaoka, Segami et al. 2016). Esto nos hace pensar que ambas proteínas podrían ser utilizadas por el organismo más como PPasas que como bombas de H^+ , en respuesta al aumento de PPI intracelular debido al drástico cambio de metabolismo que produce la presencia de una fuente de carbono orgánica en el medio de cultivo. Los datos de las tres especies estudiadas nos permiten establecer que existe una diferente regulación de las mPPasas en las microalgas eucariotas, dependientes tanto de las condiciones de iluminación como de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo.

En esta Tesis se han llevado a cabo los primeros pasos para caracterizar funcionalmente las Na^+ -PPasas que los análisis bioinformáticos sugieren, y algunos de los resultados de esta Tesis demuestran, deben poseer muchas microalgas marinas (Figura 4.5). Los resultados con la Prasinofícea *O. tauri*, la diatomea *Ph. triornutum* y la rodofita *P. purpureum* indican efectivamente que sus membranas deben contener Na^+ -PPasas. Aunque han generado las construcciones génicas para expresar funcionalmente en levadura Na^+ -PPasas de las microalgas citadas, así como una Na^+ -PPasa de la rodofita talofítica *Porphyra yezoensis* (NORI), los primeros intentos de expresarlas funcionalmente en el mutante YPC3 de *S. cerevisiae* no han tenido éxito. Es de esperar que futuros estudios del grupo contribuyan a esclarecer el papel fisiológico de las Na^+ -PPasas en las microalgas marinas, y permitan evaluar su potencial biotecnológico para la generación de cultivos transgénicos más tolerantes a salinidad y desecación, dos problemas agrobiológicos globales que amenazan seriamente el futuro de los recursos alimenticios de la Humanidad.

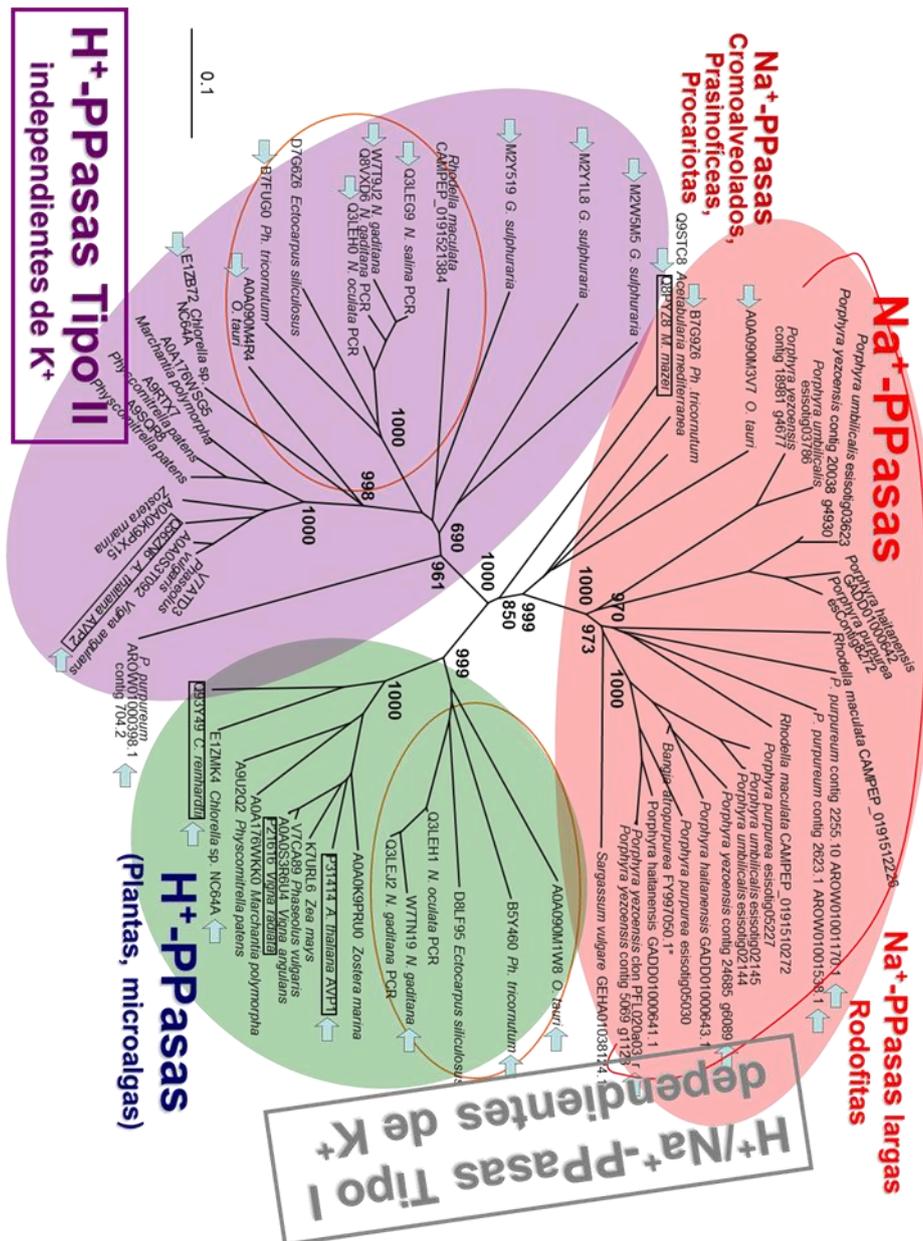


Figura 4.5: Árbol filogenético de distancias evolutivas de las mPPasas de distintas especies de organismos eucarióticos fotosintéticos, con especial énfasis en las Na⁺-PPasas de las algas rodofitas marinas. Las flechas indican las secuencias de mPPasas de diversas especies de eucariotas fotosintéticos estudiadas en este trabajo. Nótese que la Na⁺-PPasa de la arquea *M. mazei* bien caracterizadas bioquímicamente se sitúan en la base del grupo de sus ortólogos de microalgas marinas y lo soporta filogenéticamente. Las Na⁺-PPasas de las rodófitas presentan ciertas particularidades estructurales (son proteínas de mayor tamaño que las mPPasas convencionales, con aprox 1.100 aa) las cuales podrían ser el reflejo de particularidades funcionales aún por esclarecer. Por otro lado, nótese que las H⁺-PPasas de microalgas marinas forman subgrupos específicos dentro de los correspondientes tipos de H⁺-PPasas (círculos naranja) que podrían estar relacionadas también con particularidades funcionales vinculadas con la halotolerancia. Las secuencias están identificadas por los nombres de las especies y los códigos de las secuencias, bien UniprotKG o de los proyectos genoma o transcriptoma correspondientes. Aquellas mPPasas bien caracterizadas bioquímicamente se presentan en recuadros. El alineamiento de las secuencias de proteínas se hizo con el programa CLUSTALX mediante un algoritmo NJ y los números de los nodos indican el soporte estadístico (*bootstrap* de 1000 replicaciones) de los grupos.

4.6 Obtención de cepas transformantes de *Chlamydomonas reinhardtii* con expresión alterada del gen que codifica la H⁺-PPasa

Dos cepas transformantes de *C. reinhardtii* obtenidas mediante silenciamiento con amiRNAs contra el gen que codifica su única H⁺-PPasa (Δ HPP1 y Δ HPP2) se han estudiado en el presente trabajo, y mostraron niveles de actividad mPPasa dependiente de K⁺ y de polipéptidos de mPPasas significativamente menores que la cepa control, aunque la cepa transformante Δ HPP1 mostró ambos niveles significativamente menores que la otra cepa. El primer fenotipo que pudimos observar fue la diferencia de crecimiento que tenía lugar entre los cultivos desarrollados en presencia de amonio y los desarrollados en presencia de nitrato. Mientras que la cepa control creció mejor en condiciones de nitrato, las cepas transformantes crecieron mejor en condiciones de amonio, lo cual es lógico debido a que el amiRNA está controlado por el promotor de la nitrato reductasa. Estudios similares realizados con mutantes de AVP1 (*fugu 5*) en *A. thaliana* demuestran que estos crecen peor en medios totalmente libres de amonio, debido a que en esas condiciones se produce un aumento de hasta el 70% de los niveles de PPi citosólicos (Fukuda, Segami et al. 2016). Estos datos concuerdan con nuestras observaciones y sugieren que la actividad de hidrólisis de PPi de la proteína H⁺-PPasa es indispensable para regular los niveles de PPi presentes en el citosol, ya que las dos sPPasas solubles de organismos fotosintéticos se encuentran confinadas en orgánulos celulares. Se pudo observar un aumento en los niveles de polipéptido y actividad mPPasa dependiente de K⁺ en la cepa control cuando se crecía en presencia de nitrato, lo cual también podría deberse a un aumento de los niveles de PPi en las células crecidas sin amonio.

Al cultivar las cepas transformantes en presencia o ausencia de 150 mM de NaCl, se observó que la actividad mPPasa dependiente de K⁺ se indujo en condiciones de mixotrofia y autotrofia, de forma proporcional a los niveles basales de cada cepa. Este efecto tuvo su máximo en condiciones de mixotrofia, y no se observó en condiciones de heterotrofia, en las cuales la mPPasa se encuentra a niveles mínimos. En todas las condiciones, excepto en heterotrofia, se observó que la cepa que mejor creció en presencia de 150 mM de NaCl era la que presentaba los menores niveles de actividad mPPasa dependiente de K⁺.

Estudios en plantas superiores han demostrado que se produce una inducción de la expresión de las mPPasas y ATPasas vacuolares en presencia de sal (Sobreira, Maia et al. 2014), que ambos tipos de proteínas están involucradas en la tolerancia a estrés salino (Ballesteros, Donaire et al. 1996) y que hay una relación inversa entre los niveles de una y otra bomba de protones (He, Shen et al. 1998). El mayor crecimiento de la cepa transformante con menor actividad mPPasa dependiente de K^+ en presencia de sal podría explicarse por un aumento de los niveles de actividad V-ATPasa en su membrana vacuolar, que sería mayor que en la otra cepa transformante o en la cepa silvestre, aunque este punto necesita ser confirmado. Esta mayor actividad ATPasa mantendría un mayor gradiente electroquímico de iones a través de las membranas que mejoraría la tolerancia a la salinidad. En condiciones de heterotrofia, los niveles de actividad PPasa dependiente de K^+ disminuyeron en todas las cepas, por lo cual no se pudo apreciar ningún efecto cuando se cultivaron las células en presencia de sal. En estas condiciones los niveles de actividad ATPasa fueron más bajos que en condiciones de exposición a luz, ya que se ha demostrado que la luz induce la actividad ATPasa en plantas (Kinoshita and Shimazaki 1999), y eso podría ser la causa de que el mutante Δ HPP1 no presente el fenotipo de sensibilidad a sal observado en el resto de condiciones.

El fenotipo observado en la cepa transformante Δ HPP1 es muy similar al observado en los mutantes *fugu5* de *A. thaliana*, que tienen niveles muy bajos de su H^+ -PPasa mayoritaria (AVP1). En estos mutantes se ha demostrado que los efectos fenotípicos se deben en mayor medida a la falta de actividad PPasa que a defectos en la acidificación vacuolar (Ferjani, Segami et al. 2012). Además, se ha demostrado que la acumulación de PPi inhibe la gluconeogénesis y que la proteína AVP1 es el regulador clave de los niveles de este metabolito en el citosol (Ferjani, Segami et al. 2014). El valor de concentración de PPi en el citosol de células de plantas superiores es de 0,1-0,3 mM (Weiner, Stitt et al. 1987), pudiendo variar según el estado fisiológico del organismo. Sería interesante determinar los valores de concentración de PPi en células tanto de la cepa silvestre de *C. reinhardtii* como de las cepas transformantes con menores niveles de actividad mPPasa.

En ninguna de las cepas, transformantes o silvestre, se observó que la presencia de sal o las distintas condiciones tróficas afectaran a los niveles de actividad sPPasa de las células.

4.7 Expresión funcional de mPPasas heterólogas en la cianobacteria dulceacuícola *Synechocystis* sp. PCC6803, y efectos sobre su tolerancia a la salinidad

Las concentraciones cambiantes y elevadas de sal representan uno de los factores abióticos más importantes que afectan al crecimiento de los microorganismos (Hagemann 2011). Durante su evolución, las cianobacterias se han adaptado a ambientes acuáticos con diferente concentración salina, por lo que las bases fisiológicas para la adaptación a niveles altos de salinidad han sido estudiadas en profundidad en varias especies de este tipo de organismos. Una de las especies más utilizada por los investigadores es *Synechocystis* sp. PCC6803, una especie dulceacuícola con una tolerancia moderada a la salinidad. En esta especie, como en la mayoría de resto de microorganismos, la respuesta básica a salinidad se produce en tres fases:

- Primera: Se produce tras una rápida subida de la concentración de NaCl en el medio de cultivo; se produce en segundos e implica una rápida entrada de iones Na^+ y Cl^- en el citoplasma a través de la membrana plasmática.
- Segunda: Ocurre en los siguientes 60 minutos tras la subida de NaCl y se caracteriza por el intercambio de iones Na^+ por iones K^+ , permitiendo así una disminución de los efectos tóxicos para el metabolismo producidos por grandes concentraciones intracelulares de sodio.
- Tercera: Requiere de varias horas, produciendo y acumulando grandes cantidades de compuestos orgánicos osmoprotectores implicados en estabilizar el potencial osmótico del citoplasma y de mantener la estructura de las proteínas y la integridad de las membranas. Además se produce la inducción de proteínas implicadas en la respuesta al estrés salino (Mikkat, Effmert et al. 1997).

Según la naturaleza de los compuestos osmoprotectores, se pueden dividir las cianobacterias en tres grupos, siendo la especie *Synechocystis* sp. PCC6803 perteneciente al grupo de tolerancia moderada, que acumula glucosilglicerol. Las especies poco tolerantes acumulan sacarosa o trehalosa, mientras que las muy tolerantes acumulan betaína glicina o betaína glutamato.

En estudios realizados con *Synechocystis* sp. PCC6803 se identificaron 57 proteínas inducibles por estrés salino, entre las que se incluían seis proteasas y diversas enzimas implicadas en la biosíntesis de la pared celular (Fulda, Huang et al. 2000). Análisis recientes realizados mediante MALDI-TOF en *Synechocystis* sp. PCC6803 durante estrés salino han descubierto un total de 55 proteínas inducibles por sal, 18 de ellas inducibles después de dos horas de tratamiento y las restantes inducidas en células aclimatadas a altas concentraciones salinas (0,684 M NaCl) durante cinco días (Huang, Fulda et al. 2006).

En 1990, Jeanjean et al. (1990) generaron varios mutantes espontáneos de este organismo que mostraban un fenotipo negativo en cuanto a respiración y tolerancia a salinidad. Posteriormente, en otro estudio se lograron generar mutantes que poseen una tolerancia a sal reducida junto con alteraciones en su pigmentación y que acumulan cianoficina (Marin, Zuther et al. 1998). Sin embargo, hasta ahora no ha sido posible conseguir el fenotipo contrario, es decir, que esta estirpe presente una tolerancia mayor a la salinidad. Cabe resaltar que esta estirpe presenta un único gen (*ppa*) que codifica para una sPPasa citosólica de Familia I (Gómez-García, Losada et al. 2003) y no posee ningún gen que codifique para mPPasas, siendo esta una característica común a todas las cianobacterias conocidas hasta ahora.

En el presente trabajo se ha conseguido la expresión funcional de distintas mPPasas en la estirpe *Synechocystis* sp. PCC6803. Las mPPasas utilizadas son de distinto tipo (dos H⁺-PPasas dependientes de K⁺, una independientes de K⁺ y una Na⁺-PPasa) y de distintos organismos (bacteria, protista, archea y plantas superiores). Se pudo comprobar que la inserción en el genoma cianobacteriano de los genes que las codifican fue correcta y que todas ellas presentaron actividad PPasa asociada a membrana, aunque los niveles de

actividad no fueron iguales para todas ellas. Las cepas transformantes que presentaron mayor actividad mPPasa fueron las que expresan SDG-AVP1 y SDG-CaPP, mientras que las otras dos cepas (SDG-TcPP y SDG-MmPP) presentaron niveles similares entre ellas y menores a los de las cepas anteriores. Los niveles de polipéptidos para mPPasas fueron similares en todas las cepas transformantes, por lo que se puede asumir que las diferencias en los niveles de actividad PPasa asociada a membrana se debieron a las distintas características catalíticas de las enzimas y no a sus niveles de expresión. También se pudo comprobar que la inserción de los genes heterólogos en el genoma y la expresión de las distintas mPPasas, no afectó a la tasa de crecimiento de las cepas en condiciones estándar de cultivo (30 °C y 0 M NaCl). Se vio una mayor abundancia de las proteínas heterólogas en las membranas tilacoidales, lo cual concuerda con una mayor abundancia de este tipo de membranas en el organismo.

El efecto más relevante producido por la expresión de las mPPasas fue la mejora de la tolerancia a salinidad en todas las cepas transformantes con respecto a la cepa silvestre. Este efecto no fue homogéneo en todas las cepas, siendo las más tolerantes a salinidad las cepas SDG-CaPP y SDG-MmPP. Como ya vimos en otros apartados de este trabajo, tanto las H⁺-PPasas independientes de K⁺ como las Na⁺-PPasa son menos sensibles a la inhibición de su actividad por el Na⁺, lo cual explicaría porque las cepas que expresan mPPasas de estos tipos son más tolerantes a la presencia de sal en el medio de cultivo. La presencia de sal en el medio de cultivo no modificó los niveles de expresión de las mPPasas ni su actividad, al encontrarse todas bajo el control de un promotor constitutivo.

La imposibilidad de intercambiar el gen que expresa la sPPasa de este organismo (*ppa*) por otro gen que expresa una proteína con actividad catalítica similar (mPPasas), pone de manifiesto la importancia crucial de la proteína sPPasa para el metabolismo celular. Esto mismo se puede decir del gen que codifica para el antiportador Na⁺/H⁺ mayoritario de esta especie (*nhaS3*), que no puede ser intercambiado por otra bomba de sodio (Na⁺-PPasa).

5. Conclusiones

1. No es posible expresar funcionalmente la sPPasa Familia II de *Moorella thermoacetica* (MtPPasa) en *Saccharomyces cerevisiae* ya que se produce un procesamiento proteolítico del dominio CBS por las proteasas de la levadura. El dominio catalítico de MtPPasa sin CBS sí produce complementación funcional. Este procesamiento proteolítico también se da en las quimeras de la sPPasa homóloga Ipp1p fusionada al dominio CBS, por lo que debe ser una característica intrínseca.
2. Las 157 pb inmediatamente anteriores al gen *IPP1* de *S. cerevisiae* son imprescindibles para la funcionalidad del promotor pIPP1. En esta región existen varias secuencias que podrían actuar como inicios de transcripción. Se necesita un nivel mínimo de expresión del gen *IPP1* para la mantener la viabilidad de la levadura, mientras que la sobreexpresión del mismo no produce una mayor tasa de proliferación celular.
3. Se ha identificado la región 74-KKGKLR-79 en la secuencia de Ipp1p como un motivo NLS endógeno (NLSe) que participa activamente en el tráfico núcleo-citoplásmico de esta sPPasa. La correcta distribución núcleo-citoplásmica de Ipp1p es imprescindible para el buen funcionamiento celular. Los niveles nucleares de Ipp1p están estrictamente regulados, y se mantiene bajos mediante su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma nuclear.
4. La expresión funcional de una H⁺-PPasa en *S. cerevisiae* confiere tolerancia a aminofungicidas y a otros compuestos que inhiben la V-ATPasa vacuolar. La presencia de H⁺-PPasa que actuaría como bomba de H⁺ alternativa en la membrana vacuolar de células vegetales explicaría su tolerancia de estos fungicidas. Es posible la coexistencia funcional de PPasas solubles y de membrana, siempre y cuando la sPPasa se encuentre confinada en algún compartimento subcelular distinto del citosol.
5. Los estudios con microalgas indican que las H⁺-PPasas independientes de K⁺ y las Na⁺-PPasas son más tolerantes a la salinidad que las H⁺-PPasas dependientes de K⁺ utilizadas por las plantas superiores y microalgas dulceacuícolas. Las microalgas marinas han desarrollado diversas estrategias evolutivas para disponer de mPPasas con mayor halotolerancia: 1) sobreexpresión de sus H⁺-PPasas dependientes de K⁺, 2) utilización de H⁺-PPasas menos sensibles al sodio como las independientes de K⁺, 3)

utilización de mPPasas que bombean sodio como sustrato (Na^+ -PPasas). El grado de tolerancia/sensibilidad al sodio de las mPPasas de una especie determinada de microalga está en relación con su capacidad para sobrevivir/proliferar en medios salinos. El tipo de metabolismo del C desarrollado por la microalga (auto-, mixo-, heterotrófico) así como la fuente de N disponible también afectan a las mPPasas, lo que evidencia sus estrechas vinculaciones con el metabolismo del PPI.

6. Las cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* con niveles reducidos de actividad mPPasa mediante silenciamiento génico presentan menores tasas de crecimiento que la cepa silvestre. El efecto de la salinidad sobre las cepas transformantes es menor que sobre la silvestre.

7. La sobreexpresión de mPPasas en las membranas de la cianobacteria dulceacuícola *Synechocystis sp.* PCC6803 permite a este microorganismo tolerar medios con alta concentración salina (hasta 1.5 M de NaCl). La sobreexpresión de una H^+ -PPasa independiente de K^+ bacteriana o de una Na^+ -PPasa de arqueas otorga mayor tolerancia a salinidad que la sobreexpresión de una H^+ -PPasa dependiente de K^+ de origen vegetal.

6. DATOS SUPLEMENTARIOS

Secuencia proteica MtPP-yEGFP

MGKEILVIGHQRPDTSIAA AIGYAA LRNKTDGGGFQA A RCGKLNGETEFVLSYFDVPVP
 PLVNDVRA RVKDVLDGGLLFIQPGA TVRQA GIFMRQHGVKTLA VVDENRHLLGLFTVGD
 LARLLLEAWDTGNVPMDEPVYKVMQSDNLVIFNQDDLITEVRRRTMLETRYRNYPVVDD
 NHCLVGLIARYHLLAMRGKR VILVDHNEKSQA VPGIEEA ETVEIIDHHRVA DIETA EPIMV
 RNEPVGSTATHIARMYKERGLDPDAA IAGVLCA AILSDTLLFKSPTTTQVDKELAA WLADI
 AGLDVA NFGREMFRAGSSLRGRSGREIILEDFKSFNFGSNRVGIGQIEIIDPDTLPVGRDEL
 QAELEKLQAEKQYDLVVLMTDLMRNGTELLFAGPQGRA VELA FNVTPEKSVFLPGV
 MSRKKQVVPPLRRLLQGGVMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATY
 GKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF
 FKDDGNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQK
 NGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKR DHM
 VLLEFVTAAGITHGMDELYK*

Secuencia proteica MtPP(Δ BS)-yEGFP

MGKEILVIGHQRPDTSIAA AIGYAA LRNKTDGGGFQA A RCGKLNGETEFVLSYFDVPVP
 PLVNDVKLAMRGKR VILVDHNEKSQA VPGIEEA ETVEIIDHHRVA DIETA EPIMVRNEPV
 GSTATHIARMYKERGLDPDAA IAGVLCA AILSDTLLFKSPTTTQVDKELAA WLADIAGLD
 VANFGREMFRAGSSLRGRSGREIILEDFKSFNFGSNRVGIGQIEIIDPDTLPVGRDELQAE
 EKLQAEKQYDLVVLMTDLMRNGTELLFAGPQGRA VELA FNVTPEKSVFLPGVMSRK
 KQVVPPLRRLLQGGVMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATY GKLT
 LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDD
 GNYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIK
 VNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKR DHM
 VLLEFVTAAGITHGMDELYK*

Secuencia proteica SmPP-yEGFP

MSKILVFGHQNPDSDAIGSSMA YALYKRQLGVDAQA VALGNPNEETA FVLDYFGIQAPP
 VVKSQAEGA KQVILTDHNEFQQSIA DIREVEVVEVVDHHRVANFETANPLYMRLEPVG
 SASSIVYRLYKENGVAIPKEIAGVMLS GLISDTLLLKSPTTHASDPA VAEDLAKIAGVDLQ
 EYGLAMLKAGTNLASKTAAQLVDIDAKTFELNGSQVRVAQVNTVDINEVLERQNEIEEAI
 KASQAANGYSDFVLMITDILNSNSEILALGNNTDKVEAAFNFTLKNNHAFLAGA VSRKK
 QVVPQLTESFNGVMSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVS GEGEGDATY GKLT LK
 FICTTGKLPVPWPTLVTTFGYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDG
 NYKTRA EVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVN
 FKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKR DHM
 VLLEFVTAAGITHGMDELYKLDK*

Secuencia proteica Ipp1p-CBS

MTYTTRQIGA KNTLEYKVYIEKDGPVSA FHDIPLYADKKNIFNMVVEIPRW TNAKLEI
 TKEETLNPIIQDTKKGKLRFRNCFPHHGVIHNYGAFQPTWEDPNVSHPETKAVGDNDPI
 DVLEIGETIAYTGQVKQVKA LGIMALLDEGETDWKVIA IDINDPLAPKLN DIEDVEKYFPG
 LLRATNEWFRYKIPDGKPENQFAFSGEAKNKKYALDIKETHDSWKQLIAGKSSDSKPID
 LTNVTLPTPTYSKAAASDAIPPA SPKADAPIDKSIDKWWFFISGSVKLLVNDVRA RVKDVLD
 GGLLFIQPGA TVRQA GIFMRQHGVKTLA VVDENRHLLGLFTVGD LARLLLEAWDTGNV
 PMDEPVYKVMQSDNLVIFNQDDLITEVRRRTMLETRYRNYPVVDDNHCLVGLIARYHLLA
 MRGKR VILV*

Secuencia proteica CBS-Ipp1p

MLVNDVRA RVKDVLDGGLLFIQPGA TVRQA GIFMRQHGVTLA VVDENRHLLGLFTVG
DLARLLLEA WDTGNVPMDEPVYKVMQSDNLVIFNQDDLITEVRR TMLLETRYRNPVVD
DNHCLVGLIARYHLLAMRGKR VILVKLT YTTRQIGA KNTLEYKVYIEKDGKPVSAFHDIP
LYADKENNIFNMVVEIPRW TNA KLEITKEETLNPIIQDTKKGKLR FVRNCFPHHGYYHNYG
AFPQWEDPNVSHPETKA VGDNDPIDVLEIGETIA YTGQVKQVKALGIMALLDEGETDW
KVIAIDINDPLAPKLN DIEDVEKYFPGLLRATNEW FRIYKIPDGKPENQFAFSGEAKNKY
ALDIKETHDSWKQLIAGKSSDSKGIDL TNVTL PDTP TYSKASDAIPPA SPKADAPIDKSI
DKWFFISGSV*

Figura S.1: Secuencias proteicas de las quimeras utilizadas en el apartado 3.1 de resultados con sitios de corte para la proteasa de *S. cerevisiae* KEX2. En azul se muestran los residuos correspondientes al dominio CBS. En verde se muestran los residuos correspondientes a yEGFP. En rojo y morado se muestran los residuos correspondientes a los sitios de corte Sall y HindIII respectivamente. Los recuadros amarillos muestran los sitios de corte de la proteasa de *S. cerevisiae* KEX2.

MGVFTSEINPKVVASVPFFGGVLA LVMVA VLMMRVKKA PNGDGA QIFIA KQISEGA ESF
LKTEYA YLLPFVACVA AFIVGILESQDRGPLYMINGA YIQSSKKGW QTMICFLCGA ALS
ATA GWA GMKVATQTNVKTMEA ARLGLNPA LQIAFA GGA VMGFSVVA FLLGMT VLFYI
FATA QNNNSLLDMRDAIRYLSGFGFGASAIALFARVA GGIYTKAADV GADLVGKVEANI
PEDDPRNPATVADNVGDNVGDVAGMGADLFESFCGSIIACAALSSNTRELALPFWIAGFG
ILAA CIGFWTVSTKDDASQSDLLHALHRGVYSA SILVIVFSVA CVELFDGNKQGYRYFGC
IILGLVAGILIGEA TEFCTSYA YGPTKSITHAGSAGGAATVIIQGLGIGMISVFPPTVIICATV
IACFNVAGAGSSGLYGIAIAA VGMLSTLGVTLTDA YGPVADNAGGIAEMSPDVPEEVRE
RTDKLDALGNTTAAATGKGFAIGSA VLTALSLMNA YVQDVPYSMGGNDRALAAAMTLTD
PYVLSGIVFGAMLPFLFAALTMLSVRKAAAGAIIVEVQRQFRDIPGLLEGKEGVVCDHMAC
VTMCTKASVDEMILPGVIA VFTPIA VGLLIGA KCLGLLA GAISSGFMLA VMMSNAGGA
WDNSKKYIENEKVYGGKSDTHKACVVGDTVGDPFKDTS GPALNILIKLMTIFSLTMAP
VFRSDWTTWW YGVFVLC AEIFA VMVA YYYVWVRN GEK CIPPEHQK*

Figura S.2: Secuencia proteica de la putativa Na⁺-PPasa de *Ostreococcus tauri*.

A

MANPEASSSSSAEAKAEADKITTANEEGETQEALGDPA LVRDSAHTSVLLLAATAIFLGT
 VALTVLAGLIFACRIGDLCDVTDVGSQYVFRTLPLAVPIQYIWSSMTVGVLGMAVLSFY
 ALSVLREDPGTPRMIEIATYIRQGSIAFLRTEYLVLVGLVVIIFVLVGFALNWAAGCYGI
 GAVLSAVTGFLGMSIATRGNVRTAAASRKGISEGLNVAFRSGAVMGLSVVSI GLTGLSFV
 FLVFRDVRALAGFSA GASTIALFARVGGGIYTKAADV GADLVGKVEADIPEDDPRNPA TI
 ADNVDNVGDVAGMGADLFESYVGS LVA TAILGSSLPYFQGNRQALCVFNHLALDAAC
 PARDETSLSKVSFANILCSGPIAEA YPSLSIWQSN AIFIALPFMLAAAGVVVIGILGTAYVW
 VSPKLA TEKDKGKVMESLLGSLRINIYSSLLIVVAAAALCWGMFGGNSDFHEATGFGTD
 NLPRVLANEGVCPPLAFVLPTNGTILASQLRLDPLAHYEPYDSLGFQFTSPSQVWRLFL
 CILLGLWAGLLIGLTFEFTAGSYAPTLGIAAG EFGAGAVVIQGLGVGMLS VVPPLLLV
 AAVILGTYELFGTYGIALSA VGMLSTLGVTMATA D YGPVADNAGGIAEMAGLPSEVRDT
 TDALDALGNTTAAATGKGFSNGSA VLTA YALLTALVQDSGLAPNPLQLVGPAAAAAGVA
 GAHVTDGGQVSLVDIYVVVS VFIGIMLPFFFGALTMLA VSRAAQAMIVEVRRQFRDIPG
 LREGARGVQPQHVRVCNISTQSAIEMALPGAIAIMAPLIVGFGFGQRALIGLLLAGIGSGY
 MVGIMMSNAGGAWDNAKKLTESGYFGANGKGSEWHKATVAGDTVGD PFKDTSGPSM
 NILIKIMTSLSLISVGLMNRDRDPDGWIGAVLAGVTILVCPFAVWTLWMAQKTSAAARS
 EFHNTEGGVGVTA TEEAAA*

B

MATAKQYEGYEMRTVGDLPPTPGVEDPEIEVGGDVGRDGLASGESDVNPA MVKDKPKT
 SIPLLGAMTLFGATFVALAVLLGLIISCRIGDLCNVEDIGGDRYTFRTVPSLVPFQYVWGS
 LTAGILGMAVLSYYAFSVLRQDVGTDRMVEIATYIREGSVAFLFTEYL YLSVLVVALFILI
 GLALNWAAGCYAIGA VLSAATGYLGMSIATRGNVRTAAAQRGLSEGLNVAFRAGAV
 MGLSVVAIGLSGLSFVLLFRDVRALAGFSA GASTIALFARVGGGIYTKAADV GADLVGK
 VEA NIPEDDPRNPA TIADNVGDNVGDVAGMGADLFESYVGS LVA TAILGASLPFFLN SPR
 AMCVYNHLALDNQCVRDGFNGKQSLAIALCTQGGTLASAYPSLSVWQSNMFVALPF
 MLAAAGVIVGILGTLYVWVSPKLA TETDKGKIMESLLTSLRINIYASSLLIIGLAAALCWC
 LFGGPSDFTEARGFGEANLPRYTRVPGA SCPPINTPIA TNEFLQLVNDHYKPFDSLFFQFPG
 ANEVPWRLFLCIIILGLVLGILIGALTEYFTAGSYGPTIGIAGA GEYGAAGAVVIQGLGVGML
 SVVIPLMLVGA VILGTYELFGTYGIALSA VGMLSTLGVTMATA D YGPVADNAGGIAEMA
 EMPAAVRDNTDALDALGNTTAAATGKGFSNGSA VLTA YALLTALVQDSGLAPDALSLIEG
 TAHVTDADVSLVDIYVVVS VFIGIMLPYFFFGALTMLA VSRAAQAMIVEVRRQFRDIPGL
 REGAPGVRPEHVRCNISTRSAIEMVIPGALAILTPLIVGFGFGQRALIGLLLAIGSGYM
 LGIMMSNAGGAWDNAKKLTESGFFGKNHSHKSEWHKATVAGDTVGD PFKDTSGPSMNI
 LIKIMVSLSLVS VSLMEPGRDPRGWIGGILLVATLA FIVMFGGWNLWHSNRVAKLARSEF
 DNGSSDDSSSSDEDGAHDETRPLAKSALRNPPDGGEPVMVAPLVSARALGQRGQTS PFFE
 HGPRLADSPAPGSAVDVAVGAAGGPAALDA VNNPMQLPSLSDSAKLEALRTAPTE*

Figura S.3: Secuencia proteica de las Na⁺-PPasas de *Porphyra yezoensis*. A) Na⁺-PPasa1; B) Na⁺-PPasa2.

A

MMPAEAAMVPPEREGVDPADIKAVAPEAKSRKPIYDETGKLVSPNELPYEEDLPPVKM
VADPAMLKDHA TTSVFMIVLMVFFT VVLIPMIVYLGFMA VCDIEDWCTYVDVSSGPNSD
YLFKTFFFIPS VYIWAALCAGVFGLAVISYYAFTILKKDVG TARMCEISVFIREGALAFLA
MEYLCVVPLCLVLFILIGVGVNWR TAGAYGFGASFSAITGFVGLMMA TRANARTAAAAY
EGLDKGLNLA FRA GA VMGLA VVSFGLCGLSAIYMLADVRA LA GFSA GASTIALFARVG
GGIYTKAADVGADLVGKVEA GIPEDDPRNPATIA DNVGDNVGDVA GMGADLFESYVGGI
VATGILGASLPYYFNNNLALCVYQHLPIDLECGPFNYPLRLSYANYLCQRGSFFTEYPLLD
TWSSNTIFIALPFMLGVVGVISSVICTVHVFPKKA LNPESKHEVMEALLASLRLNVFAS
AILIIAGSAGLCW GFFGNSSNFLDHRGFKNADLPTFRLAPDNPNA CFPA SNPVTGQNLFIPT
VVLVDSFYEPIDIIGFDPPPDQVA WRLFITILCGLFLGHIIGLITEFFTA GTYGPTKNIALSGE
FGAGA VIIQGLGIGMLSTVLPLALVVA VIVGVYNLFGPYSIALASVAMLSTLGMTATDA
YGPVADNAGGIAEMAE LPPSSVRDTTDALDALGNTTATGKGFNSGSA ILTAYALLVA VV
FDAGLAPSPVNLVYGLGSTQAHVTDYDQVSLDIYVVASVLLGIMLPHLFGALTM LGVS
RAA QAMIVEVRRQFREIPGLREGRPGVRPEHVKCVAI STRSA IEMVLPGGVA IMSPLIIGF
GFGQKAMIGLLLA AIGSGYMMGIMMSNAGGAWDNA KKLTEGGMFGKKNA KGSEWHK
ATVAGD TVGDPFKDTSGPSMNILIKLMTAYGLVA VGLMQPDIYVEDSRGWIGLLLGV
LLVAFIFVMWNSRQAEKVRQEA KKS GDA PVRA PPKVSSYYVTAPS VPEDSIMPGSQMG
DAFQAAGGHRALRRGIIADQTRLPGLGDGASMEAAFAPELPITASTLTENPIQT*

B

MASKPPAGGMPPAGKPPTGGA KPPVQVRAPEKQGPVEETMPFGYVPRDKVYKGYEVVA
PADFPALAEAGEHVVDSEMLKDKAHNSIPLVAALFFICAFIA FVVVLAFIARCDLKA GDVE
LCNQIIDVSSQPGFYTYDTFLFYVPTVYVWAAMTAGAFGLVVICLYAFSVLRQDVGT
MVEIATYIREGAQAFLIA ELIPLLVLWLG LLLLAGLGINWRLGGSYAI GAILSYVTGYVGM
SMATRGNVRTAAAAANGLSQGLNVAFRAGA VMGLSVVSGIAGLSIVYLIFRDVRA LSGF
SAGASTIALFARVGGGIYTKAADVGADLVGKVESDIPEDDPRNPATIA DNVGDNVGDVA
GMGADLFESFVGSIVA AVILAAGLPYFFDNPYAMCVFQHLLIIDECEGSPTNPPFLVSIANTI
CAAPISPTLGLGARPLYTYYPSSGVYGSLSMFIALPFMLAMVGIVGVICTVYVHVPKSVS
GEGKKGKDVMESELLNSLRLNVFISSILVIGGAAGLCFGLFDQGTFA DQVGFKEANLPAWI
LPETDTCAPLPGSTLPRLLPVL TNYPWDATLAFVYPSANEISWRLFIA ILIGLYLGMIIGY
LTEFFTAGTYGPTQGIASSGEYGA GAVVIQGLGVGMLSTVLPLALVVA VIIGSYNLFGSYA
IALSAGMLSTLGMTATDA YGPVADNAGGIAEMAEEMPSSVRDTTDALDALGNTTAA T
GKGFNSGSA ILTAYALLSALA QDSGLAPNPRQLVAAPGIQPQVLV SARVVLDVDIYVVG
SVFVGNMLPFLFGALTMLA VSRAA QAMIVEVRRQFRDIRGLREGMSGVRPDHVKCVKIAT
TAA LFEMALPGLTAIMSPLIIGFQRA LIGLLLAGISGYMLGILMSNAGGAWDNA KK
LVESGFFGKRHA KGSQWHKATVAGD TVGDPFKDTSGPSMNILIKLMTVFGLVSPYMQP
GIENGLGWIGA IILVITLLTAA VFSLWY YLKMRLREEARA KPSKLGGEKPPPLKAKATH
YNDGGVEMTG VFKNSALYEA WEGA GGDRAFKDGNKDPLNMPGLYNGTGDYENYEQRE
EP*

C

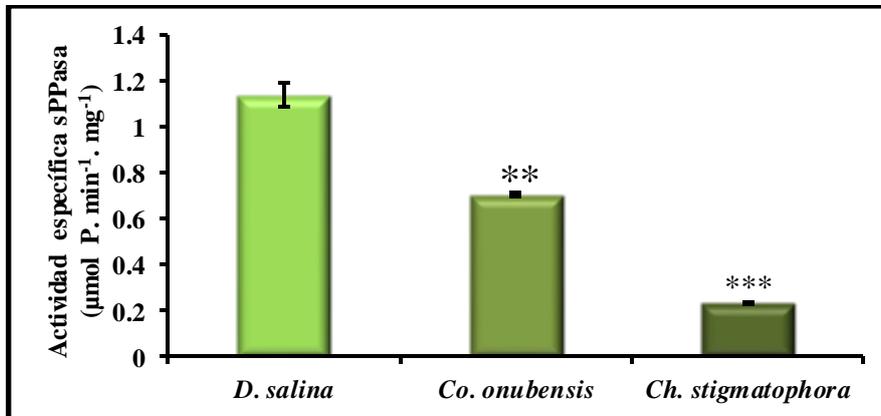
MGGADATPPVEWQGAARDVW WQEGVIVLVLFGA AVGAIIFAGLLLVWIMRQDEGSSEM
KKIANDIRTA SRTFLFCQYGWIGSLLVITAVIIW YVTSSLVIAASFLFGGCCSGISGIIALWS
SVQANVRVTASAAKNNYDYALKIAFRAGVVGSM LIISLCLLGLVFMYSVLRLTGASVHG
APYMMAGFAFGGSFVALFALQLAGGIFTKGA DIGADLVGKGEASLSEDDPRNPAMVDLV
GDNVGDCA GRGADLFESVA ENIGAMILGAAVARQVPGSPSSGVS YVLFPLVLHAGLM
CTVIGMWLVRAKRIDGIVDKPKFGEATILTADPEQTHKHLEDPMVPLRNAMGASFAVALI
ALWVCCALLRLDAYPRAWLCFAACGTLGLFISQLFVMYAFYTDYLFAPTRQVAQASA
SGAAITIRGVS LGAESSIPCLISIGGGLLSYLIGSFSGVPRYGGFLGTAMATVGLLMPSSM
QLALDIYGPISDNAGGIAEMSSCSADVRAITDRLDSVGNTTKANTKGYAVGSA GLA AFLL
FQAFRDSVNQNTTQRAFSSVNLANPMLFVSA MFGVCLVYAFSA YALRA TVAAEA VVK
EIRRQFVESPGILEGT VPPDYSQC VKILVFYAIARGMVVPLGIA VLSPIVNGLLFRYIGTQL
DKPLLGVQAAGALLSGTTS GIVLALLFNNA GGA WDNA KKYIESGRLEGGKNSEA HKA
AVGDLVGDAFKDVA GPSLHIVVKT LSTVTLVFA PLFLCPNA*

Figura S.4: Secuencia proteica de las mPPasas de *Porphyridium purpureum*. A) Na⁺-PPasa1; B) Na⁺-PPasa2; C) H⁺-PPasa independiente de K⁺.

A

Especie	Clase	mPPasas	Óptimo salinidad
<i>Dunaliella salina</i>	Clorofíceas	1 H ⁺ -PPasa dependiente de K ⁺	3 M
<i>Coccomyxa onubensis</i>	Clorofíceas	1 H ⁺ -PPasa dependiente de K ⁺ ; 1 H ⁺ -PPasa independiente de K ⁺	0 M
<i>Chlorella stigmatophora</i>	Clorofíceas	1 H ⁺ -PPasa dependiente de K ⁺ ; 1 H ⁺ -PPasa independiente de K ⁺	0,3 M

B



C

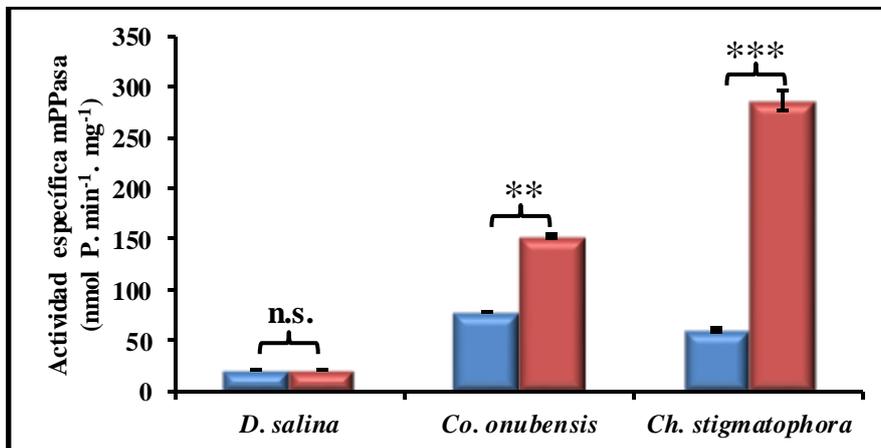
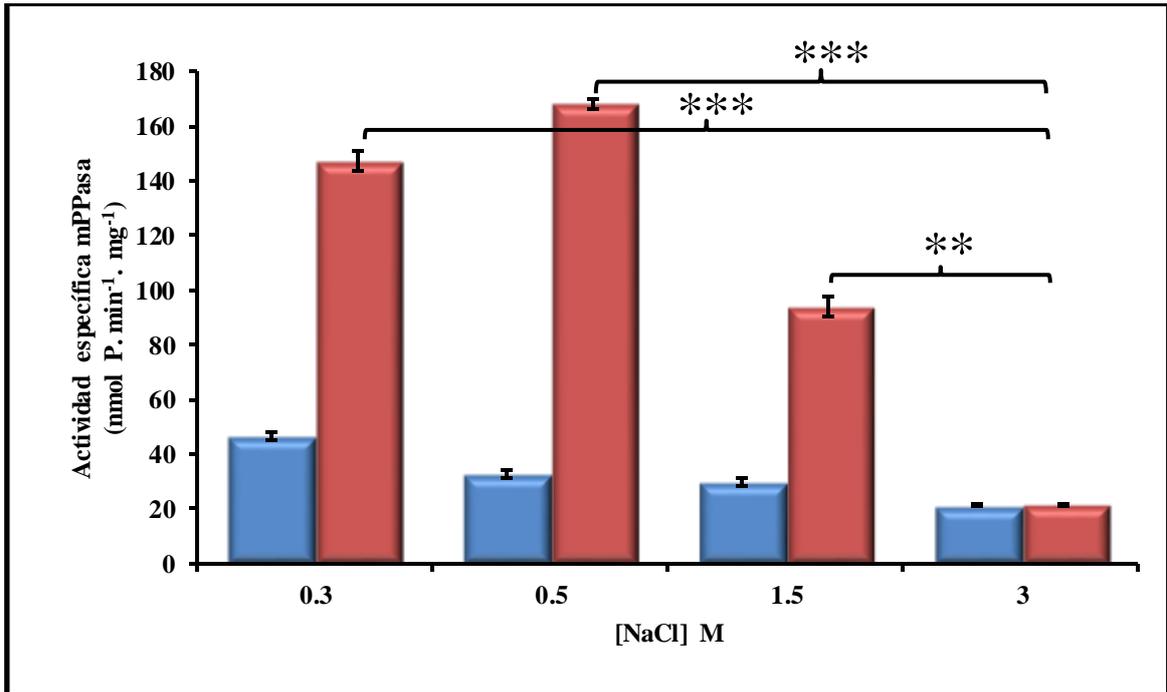


Figura S.5: Estudio de la actividad PPasa en extractos celulares de diferentes microalgas cultivadas en medios con su óptimo de salinidad. A) Tabla resumen de las especies de algas marinas utilizadas y las mPPasas que teóricamente presentan en sus membranas. **B)** Actividad PPasa soluble de cada una de las especies. **C)** Actividad PPasa asociada a membrana de cada una de las especies. Barras azules: 0 mM KCl; Barras rojas: 100 mM KCl. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001; n.s., no significativo).

A



B

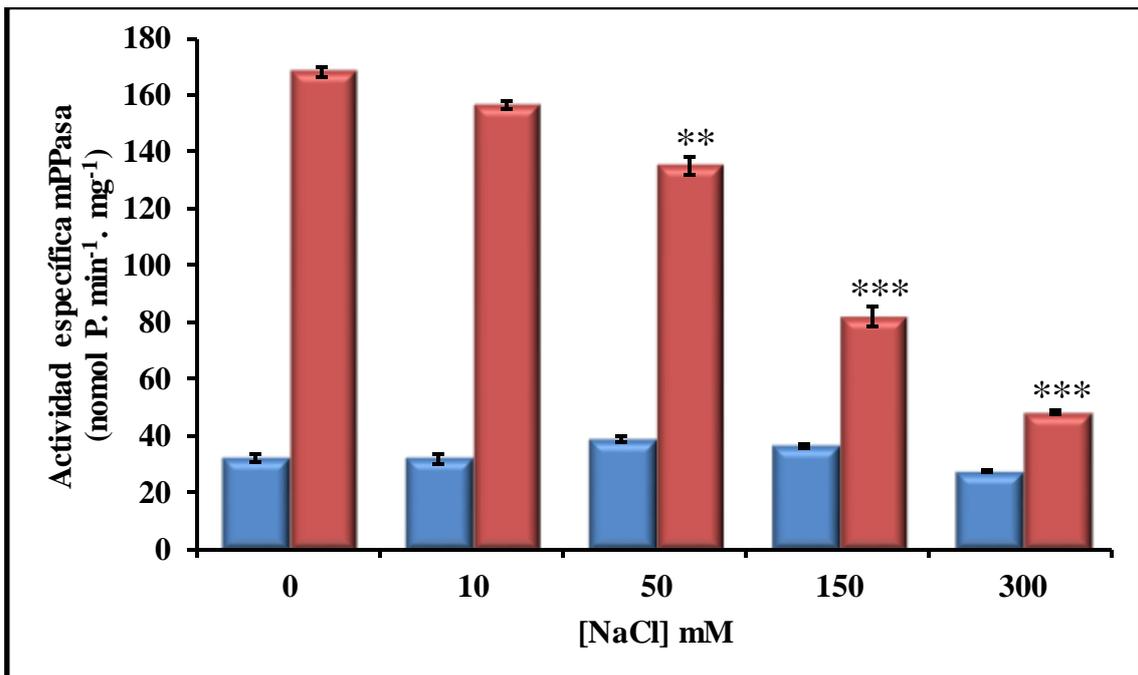
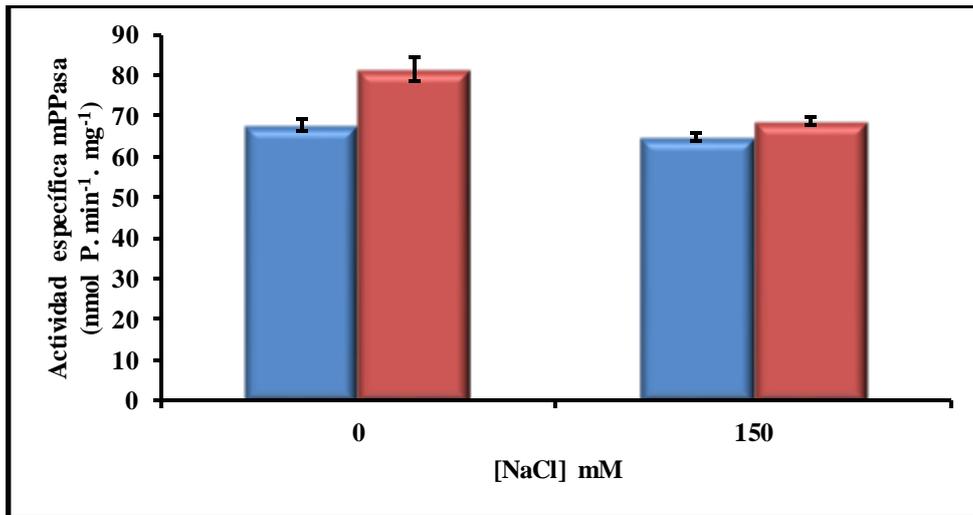
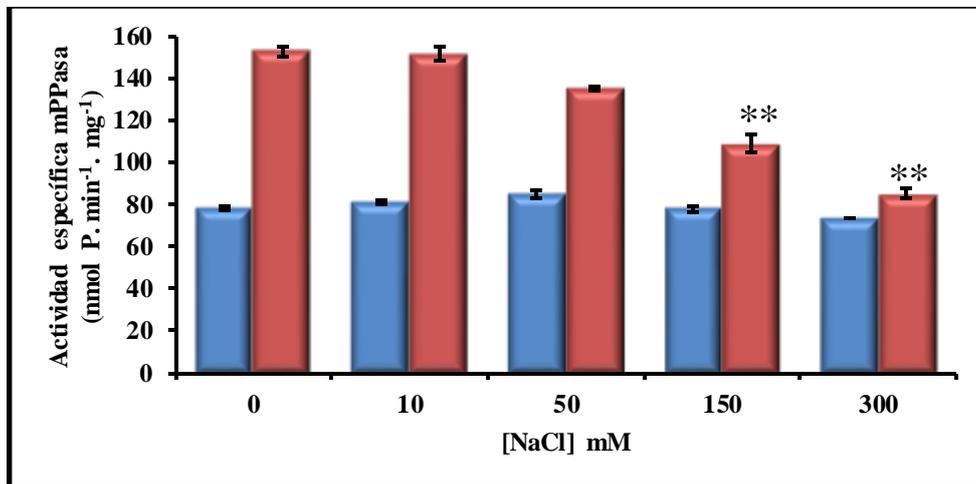


Figura S.6: Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa en extractos celulares de *Dunaliella salina*. **A)** Efecto de la salinidad en el medio de cultivo. **B)** Efecto de la salinidad en la mezcla de ensayo sobre la actividad PPasa asociada a membrana de un extracto celular de un cultivo crecido en medio con 0,5 M de NaCl. Barras azules: 0 mM KCl; Barras rojas: 100 mM KCl. Las barras de error representan error estándar (n = 3; **, P<0,01; ***, P<0,001).

A



B



C

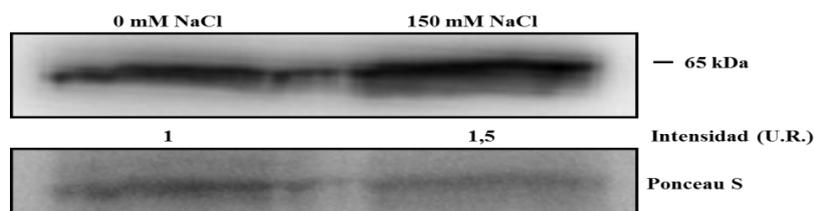
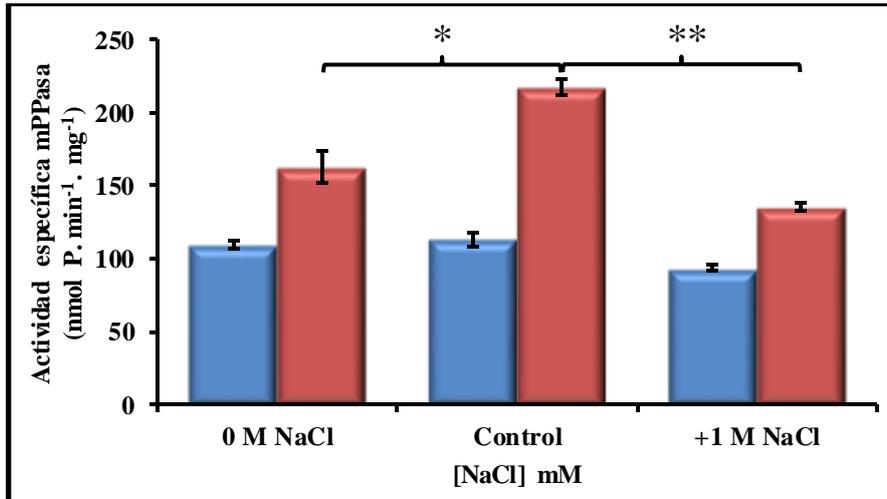
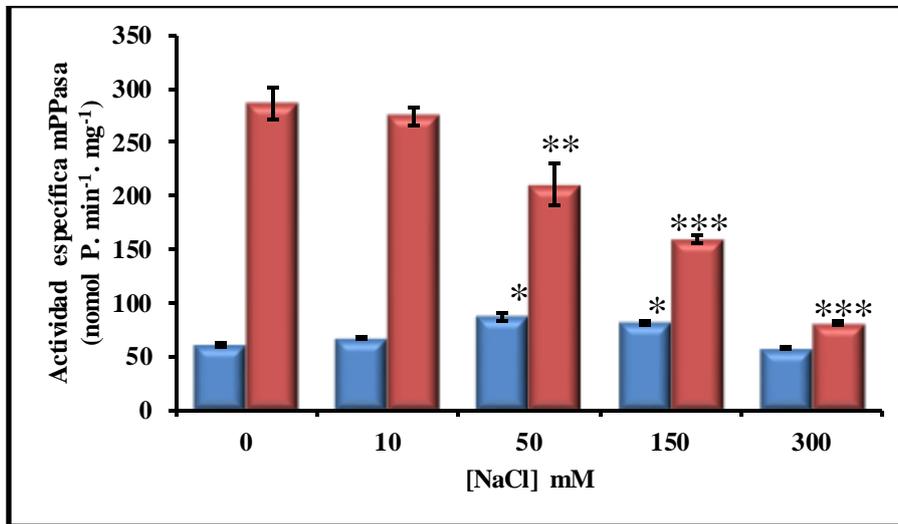


Figura S.7: Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa en extractos celulares de *Coccomyxa onubensis*. A) Efecto de la salinidad en el medio de cultivo. B) Efecto de la salinidad en la mezcla de ensayo sobre la actividad PPasa asociada a membrana de un extracto celular de un cultivo crecido en medio con 0,5 M de NaCl. Barras azules: 0 mM KCl; Barras rojas: 100 mM KCl. C) Detección de polipéptidos de PPases en las distintas condiciones de cultivo. Se muestra tinción de Ponceau como control de carga. Las barras de error representan error estándar (n = 3; **, P<0,01).

A



B



C

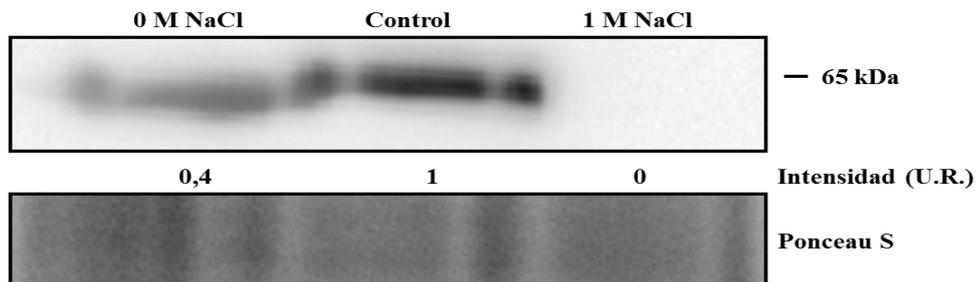


Figura S.8: Efecto del sodio sobre la actividad mPPasa en extractos celulares de *Chlorella stigmatophora*. A) Efecto de la salinidad en el medio de cultivo. B) Efecto de la salinidad en la mezcla de ensayo sobre la actividad PPasa asociada a membrana de un extracto celular de un cultivo crecido en medio con 0,5 M de NaCl. Barras azules: 0 mM KCl; Barras rojas: 100 mM KCl. C) Detección de polipéptidos de PPasas en las distintas condiciones de cultivo. Se muestra tinción de Ponceau como control de carga. Las barras de error representan error estándar (n = 3; *, P<0,05; **, P<0,01; ***, P<0,001).

7. Bibliografía

- Albi-Rodríguez, T. and A. Serrano (2008). Identification of genes and functional characterization of proteins involved in polyphosphate metabolism in photosynthetic organisms. Photosynthesis. Energy from the Sun, Springer: 957-963.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic acids research **25**(17): 3389-3402.
- Andersen, R. A., R. W. Brett, et al. (1998). "Phylogeny of the Eustigmatophyceae based upon 18S rDNA, with emphasis on Nannochloropsis." Protist **149**(1): 61-74.
- Asaoka, M. M. A., S. Segami, et al. (2016). "Contribution of P_{Pi}-hydrolyzing function of vacuolar H⁺-pyrophosphatase in vegetative growth of Arabidopsis: evidenced by expression of uncoupling mutated enzymes." Frontiers in plant science **7**.
- Atwell, B. J., H. Greenway, et al. (2015). "Efficient use of energy in anoxia-tolerant plants with focus on germinating rice seedlings." New Phytologist **206**(1): 36-56.
- Baltscheffsky, M. (1967). "Inorganic pyrophosphate as an energy donor in photosynthetic and respiratory electron transport phosphorylation systems." Biochemical and biophysical research communications **28**(2): 270-276.
- Baltscheffsky, M., H. Baltscheffsky, et al. (1966). Light-induced energy conversion and the inorganic pyrophosphatase reaction in chromatophores from Rhodospirillum rubrum. Brookhaven symposia in biology.
- Ballesteros, E., J. P. Donaire, et al. (1996). "Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots." Physiologia Plantarum **97**(2): 259-268.
- Barrada, A., M.-H. Montané, et al. (2015). "Spatial regulation of root growth: placing the plant TOR pathway in a developmental perspective." International journal of molecular sciences **16**(8): 19671-19697.
- Bateman, A. (1997). "The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein." Trends in biochemical sciences **22**(1): 12-13.
- Baykov, A. A., V. Y. Dudarenkov, et al. (1995). "Dissociation of hexameric Escherichia coli inorganic pyrophosphatase into trimers on His-136→Gln or His-140→Gln substitution and its effect on enzyme catalytic properties." Journal of Biological Chemistry **270**(51): 30804-30812.
- Baykov, A. A., A. M. Malinen, et al. (2013). "Pyrophosphate-fueled Na⁺ and H⁺ transport in prokaryotes." Microbiology and Molecular Biology Reviews **77**(2): 267-276.
- Baykov, A. A. and A. S. Shestakov (1992). "Two pathways of pyrophosphate hydrolysis and synthesis by yeast inorganic pyrophosphatase." European journal of biochemistry **206**(2): 463-470.
- Beard, W. A. and S. H. Wilson (2014). "Structure and mechanism of DNA polymerase β." Biochemistry **53**(17): 2768-2780.
- Belogurov, G. A. and R. Lahti (2002). "A lysine substitute for K⁺ A460K mutation eliminates K⁺ dependence in H⁺-pyrophosphatase of Carboxydotherrmus hydrogenoformans." Journal of Biological Chemistry **277**(51): 49651-49654.

- Belogurov, G. A., A. M. Malinen, et al. (2005). "Membrane-bound pyrophosphatase of *Thermotoga maritima* requires sodium for activity." Biochemistry **44**(6): 2088-2096.
- Berla, B. M. and H. B. Pakrasi (2012). "Upregulation of plasmid genes during stationary phase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, a cyanobacterium." Applied and Environmental Microbiology **78**(15): 5448-5451.
- Bhandari, R., A. Chakraborty, et al. (2007). "Inositol pyrophosphate pyrotechnics." Cell metabolism **5**(5): 321-323.
- Blaby, I. K., C. E. Blaby-Haas, et al. (2014). "The *Chlamydomonas* genome project: a decade on." Trends in plant science **19**(10): 672-680.
- Blumwald, E., J. M. Wolosin, et al. (1984). "Na⁺ H⁺ exchange in the cyanobacterium *Synechococcus* 6311." Biochemical and biophysical research communications **122**(1): 452-459.
- Bock, C., L. Krienitz, et al. (2011). "Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species." Fottea **11**(2): 293-312.
- Bornefeld, T. (1981). "Is light-dependent formation of inorganic pyrophosphate in *Anacystis* a photosynthetic process?" Archives of Microbiology **129**(5): 371-373.
- Bowman, E. J., L. A. Graham, et al. (2004). "The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*." Journal of Biological Chemistry **279**(32): 33131-33138.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- Cadoret, J.-P., M. Garnier, et al. (2012). "Microalgae, functional genomics and biotechnology." Advances in Botanical Research **64**: 285-341.
- Cai, Y. and C. P. Wolk (1990). "Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences." Journal of bacteriology **172**(6): 3138-3145.
- Carnal, N. W. and C. C. Black (1979). "Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves." Biochemical and biophysical research communications **86**(1): 20-26.
- Cohen, Y., B. B. Jørgensen, et al. (1986). "Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria." Applied and Environmental Microbiology **51**(2): 398-407.
- Cooperman, B. S., A. A. Baykov, et al. (1992). "Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase." Trends in biochemical sciences **17**(7): 262-266.
- Cori, G. T., S. Ochoa, et al. (1951). "The metabolism of fructose in liver. Isolation of fructose-1-phosphate and inorganic pyrophosphate." Biochimica et biophysica acta **7**: 304-317.
- Cormack, B. P., G. Bertram, et al. (1997). "Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*." Microbiology **143**(2): 303-311.
- Courties, C., R. Perasso, et al. (1998). "Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri* (Chlorophyta, Prasinophyceae)." Journal of Phycology **34**(5): 844-849.

- Chan, C. X., N. A. Blouin, et al. (2012). "Porphyra (Bangiophyceae) transcriptomes provide insights into red algal development and metabolism." Journal of Phycology **48**(6): 1328-1342.
- Chauvat, F., L. Vries, et al. (1986). "A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." Molecular and General Genetics MGG **204**(1): 185-191.
- Chen, J., A. Brevet, et al. (1990). "Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **172**(10): 5686-5689.
- Choong, W. P., C. H. Tan, et al. (2016). "Efficient enzyme-catalysed transesterification of microalgal biomass from *Chlamydomonas* sp." Energy **116**: 1370-1373.
- Chrétiennot-Dinet, M., C. Courties, et al. (1995). "A new marine picoeucaryote: *Ostreococcus tauri* gen. et sp. nov.(Chlorophyta, Prasinophyceae)." Phycologia **34**(4): 285-292.
- Dangeard, P.-A. (1888). Recherches sur les algues inférieures.
- Davies, J. M., R. J. Poole, et al. (1992). "Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(24): 11701-11705.
- Davies, J. M., P. A. Rea, et al. (1991). "Vacuolar proton-pumping pyrophosphatase in *Beta vulgaris* shows vectorial activation by potassium." FEBS letters **278**(1): 66-68.
- de Meis, L. (1984). "Pyrophosphate of high and low energy. Contributions of pH, Ca²⁺, Mg²⁺, and water to free energy of hydrolysis." Journal of Biological Chemistry **259**(10): 6090-6097.
- Derelle, E., C. Ferraz, et al. (2006). "Genome analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(31): 11647-11652.
- Dettmer, J., A. Hong-Hermesdorf, et al. (2006). "Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*." The Plant Cell **18**(3): 715-730.
- Deutscher, M. P. and A. Kornberg (1969). "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid XXVIII. THE PYROPHOSPHATE EXCHANGE AND PYROPHOSPHOROLYSIS REACTIONS OF DEOXYRIBONUCLEIC ACID POLYMERASE." Journal of Biological Chemistry **244**(11): 3019-3028.
- Dignam, J. D., D. G. Rhodes, et al. (1980). "Purification and structural characterization of rat liver threonyl transfer ribonucleic acid synthetase." Biochemistry **19**(22): 4978-4984.
- Doyle, J. J. (1990). "Isolation of plant DNA from fresh tissue." Focus **12**: 13-15.
- Drake, H. L. and S. L. Daniel (2004). "Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*." Research in microbiology **155**(10): 869-883.
- Drake, R., A. Serrano, et al. (2010). "N-terminal chimaeras with signal sequences enhance the functional expression and alter the subcellular localization of heterologous membrane-bound inorganic pyrophosphatases in yeast." Biochemical Journal **426**(2): 147-157.
- Earley, K. W., J. R. Haag, et al. (2006). "Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics." The Plant Journal **45**(4): 616-629.

- Edwards, J., T. a. Rees, et al. (1984). "Measurement of the inorganic pyrophosphate in tissues of *Pisum sativum* L." *Planta* **162**(2): 188-191.
- Elanskaya, I., I. Karandashova, et al. (2002). "Functional analysis of the Na⁺/H⁺ antiporter encoding genes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803." *Biochemistry (Moscow)* **67**(4): 432-440.
- Elhai, J. and C. P. Wolk (1988). "[83] Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria." *Methods in enzymology* **167**: 747-754.
- Engel, B. D., M. Schaffer, et al. (2015). "Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography." *Elife* **4**: e04889.
- Ettl, H. (1976). "Gattung *Chlamydomonas* Ehrenberg (*Chlamydomonas* und die nächstverwandten Gattungen II)." *Beih Nova Hedwig*.
- Fabrichniy, I., L. Lehtiö, et al. "Family II Inorganic Pyrophosphatases." *Reflections* **1425015**(1391579): 263897.
- Fabrichniy, I. P., L. Lehtiö, et al. (2004). "Structural Studies of Metal Ions in Family II Pyrophosphatases: The Requirement for a Janus Ion[†]." *Biochemistry* **43**(45): 14403-14411.
- Farré, E. M., A. Bachmann, et al. (2001). "Acceleration of potato tuber sprouting by the expression of a bacterial pyrophosphatase." *Nature biotechnology* **19**(3): 268-272.
- Ferjani, A., S. Segami, et al. (2014). Regulation of PPi levels through the vacuolar membrane H⁺-pyrophosphatase. *Progress in Botany*, Springer: 145-165.
- Ferjani, A., S. Segami, et al. (2011). "Keep an eye on PPi: the vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase regulates postgerminative development in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **23**(8): 2895-2908.
- Ferjani, A., S. Segami, et al. (2012). "Regulation of pyrophosphate levels by H⁺-PPase is central for proper resumption of early plant development." *Plant signaling & behavior* **7**(1): 38-42.
- Ferrer-Orta, C., R. Agudo, et al. (2009). "Structural insights into replication initiation and elongation processes by the FMDV RNA-dependent RNA polymerase." *Current opinion in structural biology* **19**(6): 752-758.
- Flowers, J. M., K. M. Hazzouri, et al. (2015). "Whole-genome resequencing reveals extensive natural variation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *The Plant Cell* **27**(9): 2353-2369.
- Fott, B. and M. Nováková (1969). "A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species." *Studies in phycology* **50**: 10-74.
- Fukuda, M., S. Segami, et al. (2016). "Lack of H⁺-pyrophosphatase prompts developmental damage in *Arabidopsis* leaves on ammonia-free culture medium." *Frontiers in plant science* **7**.
- Fulda, S., F. Huang, et al. (2000). "Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *European journal of biochemistry* **267**(19): 5900-5907.
- Gaczynska, M. and P. A. Osmulski (2005). "Small-molecule inhibitors of proteasome activity." *Ubiquitin-Proteasome Protocols*: 1-22.
- Gao, F., Q. Gao, et al. (2006). "Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance." *Journal of Experimental Botany* **57**(12): 3259-3270.

- Gao, F., F. Nan, et al. (2016). "Identification of conserved and novel microRNAs in *Porphyridium purpureum* via deep sequencing and bioinformatics." *BMC genomics* **17**(1): 612.
- Gao, L., J. Wang, et al. (2015). "Toward the complete proteome of *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Photosynthesis research* **126**(2-3): 203-219.
- Gaxiola, R. A., J. Li, et al. (2001). "Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(20): 11444-11449.
- Gaxiola, R. A., K. Regmi, et al. (2016). "Moving on up: H⁺-PPase mediated crop improvement." *Trends in biotechnology* **34**(5): 347-349.
- Gietz, R. D. and R. A. Woods (2002). "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method." *Methods in enzymology* **350**: 87-96.
- Gimpel, J. A., V. Henríquez, et al. (2015). "In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity." *Frontiers in microbiology* **6**: 1376.
- Goldfarb, D. S., A. H. Corbett, et al. (2004). "Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor." *Trends in cell biology* **14**(9): 505-514.
- Goldman, A., a. G. G. Boije, et al. (2016). "Pyrophosphate in medicine." *Duodecim; lääketieteellinen aikakauskirja* **132**(12): 1111.
- Gómez-García, M. a. R., M. Losada, et al. (2003). "Concurrent transcriptional activation of ppa and ppx genes by phosphate deprivation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *Biochemical and biophysical research communications* **302**(3): 601-609.
- Gómez-García, M. a. R., L. M. Ruiz-Pérez, et al. (2004). "A novel calcium-dependent soluble inorganic pyrophosphatase from the trypanosomatid *Leishmania major*." *FEBS letters* **560**(1-3): 158-166.
- Gómez-García, M. R., M. Losada, et al. (2006). "A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes." *Biochemical Journal* **395**(1): 211-221.
- Gross, W. and C. Oesterhelt (1999). "Ecophysiological studies on the red alga *Galdieria sulphuraria* isolated from southwest Iceland." *Plant Biology* **1**(06): 694-700.
- Gross, W. and C. Schnarrenberger (1995). "Heterotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*." *Plant and Cell Physiology* **36**(4): 633-638.
- Guarente, L., B. Lalonde, et al. (1984). "Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the CYC1 gene of *S. cerevisiae*." *Cell* **36**(2): 503-511.
- Guillard, R. R. and J. H. Ryther (1962). "Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella Nana* Hustedt, and *Detonula Confervacea* (CLEVE) Gran." *Canadian journal of microbiology* **8**(2): 229-239.
- Guillory, R. J. and R. R. Fisher (1972). "Studies on the light-dependent synthesis of inorganic pyrophosphate by *Rhodospirillum rubrum* chromatophores." *Biochemical Journal* **129**(2): 471-481.
- Hagemann, M. (2011). "Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation." *FEMS microbiology reviews* **35**(1): 87-123.
- Hahn, S., E. T. Hoar, et al. (1985). "Each of three "TATA elements" specifies a subset of the transcription initiation sites at the CYC-1 promoter of

- Saccharomyces cerevisiae." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(24): 8562-8566.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." Journal of molecular biology **166**(4): 557-580.
- Hanjagi, P. S., V. Sashidhar, et al. (2011). "Improvement of salt tolerance in putatively transgenic rice plants overexpressing AVP1, a vacuolar H⁺-pyrophosphatase." Transgenic Plant Journal **5**(1): 43-49.
- Hao, Q., W. Shang, et al. (2016). "Identification and Comparative Analysis of CBS Domain-Containing Proteins in Soybean (Glycine max) and the Primary Function of GmCBS21 in Enhanced Tolerance to Low Nitrogen Stress." International journal of molecular sciences **17**(5): 620.
- Harris, E. (2009). "The genus Chlamydomonas." The Chlamydomonas sourcebook: introduction to Chlamydomonas and its laboratory use. Volume 2009 **2**: 1-18.
- Harris, E. H. (2013). The Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use, Elsevier.
- He, L., X. Han, et al. (2014). "A rare Phaeodactylum tricornutum cruciform morphotype: Culture conditions, transformation and unique fatty acid characteristics." PloS one **9**(4): e93922.
- He, L., Z. Shen, et al. (1998). "The responses of ATPase and PPase activities and lipid composition of tonoplast in roots of two wheat cultivars to aluminium stress." Acta Phytophysiologica Sinica **25**(4): 350-356.
- Hemaiswarya, S., R. Raja, et al. (2013). "Microalgae taxonomy and breeding." Biofuel Crops: Production, Physiology and Genetics **44**.
- Hernández-Pérez, A. and J. I. Labbé (2014). "Microalgas, cultivo y beneficios." Revista de biología marina y oceanografía **49**(2): 157-173.
- Hernández, A., R. Herrera-Palau, et al. (2016). "Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase AVP1 is Involved in Amine Fungicide Tolerance in Arabidopsis thaliana and Provides Tridemorph Resistance in Yeast." Frontiers in plant science **7**.
- Hernández, A., G. López-Lluch, et al. (2011). "8-Dehydrosterols induce v-atpase dysfunction in yeast. Protective effect of an alternative H⁺-PUMP."
- Hernández, A., G. Serrano-Bueno, et al. (2015). "8-Dehydrosterols induce membrane traffic and autophagy defects through V-ATPase dysfunction in Saccharomyces cerevisiae." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1853**(11): 2945-2956.
- Hirooka, S. and S.-y. Miyagishima (2016). "Cultivation of Acidophilic Algae Galdieria sulphuraria and Pseudochlorella sp. YKT1 in Media Derived from Acidic Hot Springs." Frontiers in microbiology **7**.
- Hoffman, C. S. and F. Winston (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformiaon of Escherichia coli." Gene **57**(2): 267-272.
- Huang, A., L. He, et al. (2011). "Identification and characterization of microRNAs from Phaeodactylum tricornutum by high-throughput sequencing and bioinformatics analysis." BMC genomics **12**(1): 337.
- Huang, F., S. Fulda, et al. (2006). "Proteomic screening of salt- stress- induced changes in plasma membranes of Synechocystis sp. strain PCC 6803." Proteomics **6**(3): 910-920.

- Jämsen, J., A. A. Baykov, et al. (2010). "Nucleotide- and substrate-induced conformational transitions in the CBS domain-containing pyrophosphatase of *Moorella thermoacetica*." *Biochemistry* **49**(5): 1005-1013.
- Jämsen, J., H. Tuominen, et al. (2007). "A CBS domain-containing pyrophosphatase of *Moorella thermoacetica* is regulated by adenine nucleotides." *Biochemical Journal* **408**(3): 327-333.
- Javahery, R., A. Khachi, et al. (1994). "DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells." *Molecular and Cellular Biology* **14**(1): 116-127.
- Jeanjean, R., B. Onana, et al. (1990). "Mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 impaired in respiration and unable to tolerate high salt concentrations." *FEMS microbiology letters* **68**(1-2): 125-129.
- Jelitto, T., U. Sonnewald, et al. (1992). "Inorganic pyrophosphate content and metabolites in potato and tobacco plants expressing *E. coli* pyrophosphatase in their cytosol." *Planta* **188**(2): 238-244.
- John, J. S. (1970). "Determination of ATP in *Chlorella* with the luciferin-luciferase enzyme system." *Analytical biochemistry* **37**(2): 409-416.
- Joset, F., R. Jeanjean, et al. (1996). "Dynamics of the response of cyanobacteria to salt stress: deciphering the molecular events." *Physiologia Plantarum* **96**(4): 738-744.
- Ju, X., K. Igarashi, et al. (2016). "Effective and selective recovery of gold and palladium ions from metal wastewater using a sulfothermophilic red alga, *Galdieria sulphuraria*." *Bioresource technology* **211**: 759-764.
- Kalderon, D., W. D. Richardson, et al. (1984). "Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen."
- Kaneko, T. and S. Tabata (1997). "Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." *Plant and Cell Physiology* **38**(11): 1171-1176.
- Kankare, J., G. S. Neal, et al. (1994). "The structure of *E. coli* soluble inorganic pyrophosphatase at 2.7 Å resolution." *Protein engineering* **7**(7): 823-830.
- Karakashian, S. J. and M. W. Karakashian (1965). "Evolution and symbiosis in the genus *Chlorella* and related algae." *Evolution*: 368-377.
- Karandashova, I., I. Elanskaya, et al. (2002). "Identification of genes essential for growth at high salt concentrations using salt-sensitive mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." *Current microbiology* **44**(3): 184-188.
- Kellosalo, J., T. Kajander, et al. (2012). "The structure and catalytic cycle of a sodium-pumping pyrophosphatase." *Science* **337**(6093): 473-476.
- Kemp, B. E. (2004). "Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract." *The Journal of clinical investigation* **113**(2): 182-184.
- Khandelwal, R. L. (1978). "The regulation of liver phosphoprotein phosphatase by inorganic pyrophosphate and cobalt." *Archives of biochemistry and biophysics* **191**(2): 764-773.
- Kim, E. J., R.-G. Zhen, et al. (1994). "Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding subunit for proton transport." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**(13): 6128-6132.

- Kindle, K. L. (1990). "High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(3): 1228-1232.
- Kinoshita, T. and K. i. Shimazaki (1999). "Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells." The EMBO Journal **18**(20): 5548-5558.
- Klemme, J.-H. and H. Gest (1971). "Regulatory properties of an inorganic pyrophosphatase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*." Proceedings of the National Academy of Sciences **68**(4): 721-725.
- Kolakowski, L. F., M. Schloesser, et al. (1988). "Cloning, molecular characterization and chromosome localization of the inorganic pyrophosphatase (PPA) gene from *S. cerevisiae*." Nucleic acids research **16**(22): 10441-10452.
- Kong, F., Y. Mao, et al. (2009). "Genetic analysis of *Porphyra yezoensis* using microsatellite markers." Plant molecular biology reporter **27**(4): 496-502.
- Kornberg, A. and O. Lindberg (1948). "Diphosphopyridine nucleotide pyrophosphatase." Journal of Biological Chemistry **176**(2): 665-677.
- Kuge, S., T. Toda, et al. (1998). "Crml (XpoI) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress." Genes to Cells **3**(8): 521-532.
- Kukko-Kalske, E., M. Lintunen, et al. (1989). "Intracellular PPi concentration is not directly dependent on amount of inorganic pyrophosphatase in *Escherichia coli* K-12 cells." Journal of bacteriology **171**(8): 4498-4500.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lahti, R. (1983). "Microbial inorganic pyrophosphatases." Microbiological reviews **47**(2): 169.
- Lahti, R., T. Pitkäranta, et al. (1988). "Cloning and characterization of the gene encoding inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli* K-12." Journal of bacteriology **170**(12): 5901-5907.
- Lanford, R. E., P. Kanda, et al. (1986). "Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal." Cell **46**(4): 575-582.
- Lange, A., R. E. Mills, et al. (2007). "Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin α ." Journal of Biological Chemistry **282**(8): 5101-5105.
- Lau, N.-S., M. Matsui, et al. (2015). "Cyanobacteria: photoautotrophic microbial factories for the sustainable synthesis of industrial products." BioMed Research International **2015**.
- Lauersen, K. J., O. Kruse, et al. (2015). "Targeted expression of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii* with a versatile, modular vector toolkit." Applied microbiology and biotechnology **99**(8): 3491-3503.
- Lee, H. S., Y. Cho, et al. (2009). "A novel inorganic pyrophosphatase in *Thermococcus onnurineus* NA1." FEMS microbiology letters **300**(1): 68-74.
- Lee, J., K. M. Kim, et al. (2016). "Reconstructing the complex evolutionary history of mobile plasmids in red algal genomes." Scientific reports **6**.

- Lee, M. K., I. H. Kim, et al. (2015). "A peptide from *Porphyra yezoensis* stimulates the proliferation of IEC-6 cells by activating the insulin-like growth factor I receptor signaling pathway." International journal of molecular medicine **35**(2): 533-538.
- Lee, S.-H. and J. Hurwitz (1990). "Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen, and activator 1." Proceedings of the National Academy of Sciences **87**(15): 5672-5676.
- Lelandais, G., I. Scheiber, et al. (2016). "*Ostreococcus tauri* is a new model green alga for studying iron metabolism in eukaryotic phytoplankton." BMC genomics **17**(1): 319.
- Lewin, R. A. (1957). "Four new species of *Chlamydomonas*." Canadian Journal of Botany **35**(3): 321-326.
- Li, J., H. Yang, et al. (2005). "Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development." Science **310**(5745): 121-125.
- Lin, P.-Y., C.-T. Tsai, et al. (2017). "*Chlorella sorokiniana* induces mitochondrial-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells and inhibits xenograft tumor growth in vivo." BMC Complementary and Alternative Medicine **17**(1): 88.
- Littauer, U. Z. and A. Kornberg (1957). "Reversible synthesis of polyribonucleotides with an enzyme from *Escherichia coli*." Journal of Biological Chemistry **226**(2): 1077-1092.
- Lo, K. and S. T. Smale (1996). "Generality of a functional initiator consensus sequence." Gene **182**(1): 13-22.
- López-Juez, E. (2007). "Plastid biogenesis, between light and shadows." Journal of Experimental Botany **58**(1): 11-26.
- Losada, M., F. J. F. Bellido, et al. (1999). Los elementos y moléculas de la vida: introducción a la química biológica y biología molecular.
- Lubián, L. M. (1982). "*Nannochloropsis gaditana* spec. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina." Lazaroa **4**: 287-293.
- Lubián, L. M., O. Montero, et al. (2000). "Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments." Journal of Applied Phycology **12**(3): 249-255.
- Lucas-Reina, E., F. J. Romero-Campero, et al. (2015). "An evolutionarily conserved DOF-CONSTANS module controls plant photoperiodic signaling." Plant physiology **168**(2): 561-574.
- Lundin, M., H. Baltscheffsky, et al. (1991). "Yeast PPA2 gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function." Journal of Biological Chemistry **266**(19): 12168-12172.
- Luoto, H. H., A. A. Baykov, et al. (2013). "Membrane-integral pyrophosphatase subfamily capable of translocating both Na⁺ and H⁺." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(4): 1255-1260.
- Luoto, H. H., E. Nordbo, et al. (2013). "Membrane Na⁺-pyrophosphatases can transport protons at low sodium concentrations." Journal of Biological Chemistry **288**(49): 35489-35499.
- Mackinney, G. (1941). "Absorption of light by chlorophyll solutions." J. biol. Chem **140**(2): 315-322.
- Maeshima, M. (2000). "Vacuolar H⁺-pyrophosphatase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1465**(1): 37-51.

- Maeshima, M. and S. Yoshida (1989). "Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean." Journal of Biological Chemistry **264**(33): 20068-20073.
- Malinen, A. M., G. A. Belogurov, et al. (2007). "Na⁺-pyrophosphatase: a novel primary sodium pump." Biochemistry **46**(30): 8872-8878.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, et al. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring harbor laboratory Cold Spring Harbor, NY.
- Mao, P. and M. J. Smerdon (2010). "Yeast deubiquitinase Ubp3 interacts with the 26 S proteasome to facilitate Rad4 degradation." Journal of Biological Chemistry **285**(48): 37542-37550.
- Marfori, M., A. Mynott, et al. (2011). "Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1813**(9): 1562-1577.
- Margulis, L. (1970). "Origin of eukaryotic cells: evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth."
- Margulis, L. and D. Sagan (1990). Origins of sex: three billion years of genetic recombination, Yale University Press.
- Marin, K., E. Zuther, et al. (1998). "The ggpS gene from *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 encoding glucosyl-glycerol-phosphate synthase is involved in osmolyte synthesis." Journal of bacteriology **180**(18): 4843-4849.
- Martinez-Garcia, M. and M. J. van der Maarel (2016). "Floridoside production by the red microalga *Galdieria sulphuraria* under different conditions of growth and osmotic stress." AMB Express **6**(1): 71.
- Martinez, M. J. M., M. J. M. Ramos, et al. (2017). "Sacroilitis por pirofosfato cálcico." Reumatología Clínica.
- Matsuo, T. and M. Ishiura (2010). "New insights into the circadian clock in *Chlamydomonas*." International review of cell and molecular biology **280**: 281-314.
- Maurer, P., M. Redd, et al. (2001). "The nuclear export receptor Xpo1p forms distinct complexes with NES transport substrates and the yeast Ran binding protein 1 (Yrb1p)." Molecular biology of the cell **12**(3): 539-549.
- McCormick, A. J. (2004). Expression behaviour of primary carbon metabolism genes during sugarcane culm development, Stellenbosch: University of Stellenbosch.
- Melis, A. and T. Happe (2001). "Hydrogen production. Green algae as a source of energy." Plant physiology **127**(3): 740-748.
- Merckel, M. C., I. P. Fabrichniy, et al. (2001). "Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: a new fold for an old mechanism." Structure **9**(4): 289-297.
- Merchant, S. S., S. E. Prochnik, et al. (2007). "The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions." Science **318**(5848): 245-250.
- Mereschkowsky, C. (1905). Über natur und ursprung der chromatophoren im pflanzenreiche.
- Mikkat, S., U. Effmert, et al. (1997). "Uptake and use of the osmoprotective compounds trehalose, glucosylglycerol, and sucrose by the

- cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803." Archives of Microbiology **167**(2): 112-118.
- Mohanty, N., D. Bruce, et al. (1991). "Dark ammonium assimilation reduces the plastoquinone pool of photosystem II in the green alga *Selenastrum minutum*." Plant physiology **96**(2): 513-517.
- Molnár, A., F. Schwach, et al. (2007). "miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Nature **447**(7148): 1126-1129.
- Mumberg, D., R. Müller, et al. (1995). "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." Gene **156**(1): 119-122.
- Muñoz-García, J. and S. Ares (2016). "Formation and maintenance of nitrogen-fixing cell patterns in filamentous cyanobacteria." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(22): 6218-6223.
- Mynott, A. V., S. J. Harrop, et al. (2011). "Crystal structure of importin- α bound to a peptide bearing the nuclear localisation signal from chloride intracellular channel protein 4." FEBS journal **278**(10): 1662-1675.
- Nakahata, Y. and Y. Bessho (2016). "The Circadian NAD." BioMed Research International **2016**.
- Nitschmann, W. H. and L. Packer (1992). "NMR studies on Na⁺ transport in *Synechococcus* PCC 6311." Archives of biochemistry and biophysics **294**(2): 347-352.
- Nore, B. F., Y. Sakai-Nore, et al. (1991). "Immunological cross-reactivity between proton-pumping inorganic pyrophosphatases of widely phylogenetic separated species." Biochemical and biophysical research communications **181**(3): 962-967.
- O'Sullivan, W. J. and G. W. Smithers (1979). "[12] Stability constants for biologically important metal-ligand complexes." Methods in enzymology **63**: 294-336.
- Oei, S. L., C. Keil, et al. (2005). "Poly (ADP-ribosylation) and genomic stability." Biochemistry and cell biology **83**(3): 263-269.
- Oren, A. (2014). "The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments." Journal of Biological Research-Thessaloniki **21**(1): 23.
- Pang, A. H., A. Garzan, et al. (2016). "Discovery of allosteric and selective inhibitors of inorganic pyrophosphatase from *Mycobacterium tuberculosis*." ACS Chemical Biology **11**(11): 3084-3092.
- Pérez-Castiñeira, J. R., R. Gómez-García, et al. (2001). "Enzymatic systems of inorganic pyrophosphate bioenergetics in photosynthetic and heterotrophic protists: remnants or metabolic cornerstones?" International Microbiology **4**(3): 135-142.
- Pérez-Castiñeira, J. R., A. Hernández, et al. (2011). "A plant proton-pumping inorganic pyrophosphatase functionally complements the vacuolar ATPase transport activity and confers bafilomycin resistance in yeast." Biochemical Journal **437**(2): 269-278.
- Pérez-Castiñeira, J. R., R. L. López-Marqués, et al. (2001). "A thermostable K⁺- stimulated vacuolar-type pyrophosphatase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*." FEBS letters **496**(1): 6-11.
- Pérez-Castiñeira, J. R., R. L. López-Marqués, et al. (2002). "Functional complementation of yeast cytosolic pyrophosphatase by bacterial and

- plant H⁺-translocating pyrophosphatases." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(25): 15914-15919.
- Perrineau, M.-M., D. C. Price, et al. (2015). "Recent mobility of plastid encoded group II introns and twintrons in five strains of the unicellular red alga *Porphyridium*." PeerJ **3**: e1017.
- Perrotte-Piquemal, M., A. Danchin, et al. (1999). "Pyrophosphate increases the efficiency of enterobactin-dependent iron uptake in *Escherichia coli*." Biochimie **81**(3): 245-253.
- Pierce, E., G. Xie, et al. (2008). "The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*)." Environmental microbiology **10**(10): 2550-2573.
- Pimkin, M. and G. D. Markham (2008). "The CBS subdomain of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase regulates purine nucleotide turnover." Molecular microbiology **68**(2): 342-359.
- Pizzio, G. A., J. Paez-Valencia, et al. (2015). "Arabidopsis type I proton-pumping pyrophosphatase expresses strongly in phloem, where it is required for pyrophosphate metabolism and photosynthate partitioning." Plant physiology **167**(4): 1541-1553.
- Pohl, P. and F. Zurheide (1979). "Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors." Marine algae in pharmaceutical science, editors, Heinz A. Hoppe, Tore Levring, Yukio Tanaka.
- Price, D. C., C. X. Chan, et al. (2012). "Cyanophora paradoxa genome elucidates origin of photosynthesis in algae and plants." Science **335**(6070): 843-847.
- Pröschold, T., B. Marin, et al. (2001). "Molecular Phylogeny and Taxonomic Revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas Ehrenberg* and *Chloromonas Gobi*, and Description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov.** In memory of Hanus Ettl (1931-1997), promoter of the systematics of the genus." Protist **152**(4): 265-300.
- Rao, N., M. Roberts, et al. (1985). "Amount and chain length of polyphosphates in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions." Journal of bacteriology **162**(1): 242-247.
- Ratajczak, R. (2000). "Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1465**(1): 17-36.
- Rathbun, W. B. and M. V. Betlach (1969). "Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate." Analytical biochemistry **28**: 436-446.
- Raven, J. and P. Falkowski (1999). "Oceanic sinks for atmospheric CO₂." Plant, Cell & Environment **22**(6): 741-755.
- Ravid, T. and M. Hochstrasser (2008). "Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(9): 679-689.
- Rea, P. A. and R. J. Poole (1993). "Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase." Annual review of plant biology **44**(1): 157-180.
- Reeb, V. and D. Bhattacharya (2010). The thermo-acidophilic cyanidiophyceae (Cyanidiales). Red Algae in the Genomic Age, Springer: 409-426.

- Reynolds, C. S. (1987). "Cyanobacterial water-blooms." Advances in Botanical Research **13**: 67-143.
- Rippka, R., J. Deruelles, et al. (1979). "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." Microbiology **111**(1): 1-61.
- Roberts, C. J., C. K. Raymond, et al. (1991). "[44] Methods for studying the yeast vacuole." Methods in enzymology **194**: 644-661.
- Rojas-Beltrán, J. A., F. Dubois, et al. (1999). "Identification of cytosolic Mg²⁺-dependent soluble inorganic pyrophosphatases in potato and phylogenetic analysis." Plant molecular biology **39**(3): 449-461.
- Rout, M. P., J. D. Aitchison, et al. (2000). "The yeast nuclear pore complex." The Journal of cell biology **148**(4): 635-652.
- Salminen, A., V. A. Anashkin, et al. (2014). "Cystathionine β -synthase (CBS) domains confer multiple forms of Mg²⁺-dependent cooperativity to family II pyrophosphatases." Journal of Biological Chemistry **289**(33): 22865-22876.
- Salminen, A., A. N. Parfenyev, et al. (2002). "Modulation of dimer stability in yeast pyrophosphatase by mutations at the subunit interface and ligand binding to the active site." Journal of Biological Chemistry **277**(18): 15465-15471.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold spring harbor laboratory press.
- Samygina, V., A. Popov, et al. (2001). "The structures of Escherichia coli inorganic pyrophosphatase complexed with Ca²⁺ or CaPP_i at atomic resolution and their mechanistic implications." Journal of molecular biology **314**(3): 633-645.
- Sarafian, V., Y. Kim, et al. (1992). "Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of Arabidopsis thaliana." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(5): 1775-1779.
- SCOTT, D. A., L. Shuhong, et al. (2000). "Cloning and functional expression of a gene encoding a vacuolar-type proton-translocating pyrophosphatase from Trypanosoma cruzi." Biochemical Journal **351**(1): 281-288.
- Schlenstedt, G., E. Smirnova, et al. (1997). "Yrb4p, a yeast Ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus." The EMBO Journal **16**(20): 6237-6249.
- Schmollinger, S., D. Strenkert, et al. (2010). "An inducible artificial microRNA system for Chlamydomonas reinhardtii confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance." Current genetics **56**(4): 383-389.
- Scholz, F., J. McManus, et al. (2014). "The impact of ocean deoxygenation on iron release from continental margin sediments." Nature Geoscience **7**(6): 433-437.
- Segami, S., S. Makino, et al. (2014). "Dynamics of vacuoles and H⁺-pyrophosphatase visualized by monomeric green fluorescent protein in Arabidopsis: artifactual bulbs and native intravacuolar spherical structures." The Plant Cell **26**(8): 3416-3434.
- Segami, S., Y. Nakanishi, et al. (2010). "Quantification, organ-specific accumulation and intracellular localization of type II H⁺-

- pyrophosphatase in *Arabidopsis thaliana*." Plant and Cell Physiology **51**(8): 1350-1360.
- Sen, S., N. Bhuyan, et al. (2009). "Characterization of plasma membrane bound inorganic pyrophosphatase from *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes." African health sciences **9**(4).
- Serrano-Bueno, G., A. Hernández, et al. (2013). "Inorganic pyrophosphatase defects lead to cell cycle arrest and autophagic cell death through NAD⁺ depletion in fermenting yeast." Journal of Biological Chemistry **288**(18): 13082-13092.
- Serrano, A., J. R. Pérez- Castiñeira, et al. (2007). "H⁺- PPases: yesterday, today and tomorrow." IUBMB life **59**(2): 76-83.
- Serrano, R. and J.-M. Villalba (1995). "Expression and localization of plant membrane proteins in *Saccharomyces*." Methods in cell biology **50**: 481-496.
- Sherman, F. (1991). "[1] Getting started with yeast." Methods in enzymology **194**: 3-21.
- Sherman, F., G. Fink, et al. (1987). Methods in yeast genetics: a laboratory course manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shintani, T., T. Uchiumi, et al. (1998). "Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes." FEBS letters **439**(3): 263-266.
- Sieburth, J. M. (1979). Sea microbes: a survey of the habitats, field and laboratory methods, morphology, nutrition, taxonomy, and ecology of marine bacteria, fungi, microalgae, and protozoa.
- Silverman, M. P. and D. G. Lundgren (1959). "Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *ferrobacillusferrooxidans* II.: Manometric Studies." Journal of bacteriology **78**(3): 326.
- Sizova, I., M. Fuhrmann, et al. (2001). "A *Streptomyces rimosus* saphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*." Gene **277**(1): 221-229.
- Smale, S. T. and D. Baltimore (1989). "The "initiator" as a transcription control element." Cell **57**(1): 103-113.
- Smyth, D. A. and C. C. Black (1984). "Measurement of the pyrophosphate content of plant tissues." Plant physiology **75**(3): 862-864.
- Sobreira, A. C. M., Y. Maia, et al. (2014). "Vacuolar proton pumps regulation during development of *Vigna unguiculata* seedlings under salt stress." Theoretical and Experimental Plant Physiology **26**(3-4): 167-175.
- Starita, L. M., R. S. Lo, et al. (2012). "Sites of ubiquitin attachment in *Saccharomyces cerevisiae*." Proteomics **12**(2): 236-240.
- Sueoka, N., K. Chiang, et al. (1967). "Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*: I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores." Journal of molecular biology **25**(1): 47-66.
- Swingley, W. D., M. Chen, et al. (2008). "Niche adaptation and genome expansion in the chlorophyll d-producing cyanobacterium *Acaryochloris marina*." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(6): 2005-2010.
- Tedeschi, P. M., E. K. Markert, et al. (2013). "Contribution of serine, folate and glycine metabolism to the ATP, NADPH and purine requirements of cancer cells." Cell death & disease **4**(10): e877.

- Thota, S. G. and R. Bhandari (2015). "The emerging roles of inositol pyrophosphates in eukaryotic cell physiology." Journal of biosciences **40**(3): 593-605.
- Toone, W. M., S. Kuge, et al. (1998). "Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1." Genes & development **12**(10): 1453-1463.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences **76**(9): 4350-4354.
- Treco, D. A. and V. Lundblad (2001). "Preparation of yeast media." Current protocols in molecular biology: 13.11. 11-13.11. 17.
- Tsai, J.-Y., J. Kelloso, et al. (2014). "Proton/sodium pumping pyrophosphatases: the last of the primary ion pumps." Current opinion in structural biology **27**: 38-47.
- Tuominen, H., A. Salminen, et al. (2010). "Crystal structures of the CBS and DRTGG domains of the regulatory region of *Clostridium perfringens* pyrophosphatase complexed with the inhibitor, AMP, and activator, diadenosine tetraphosphate." Journal of molecular biology **398**(3): 400-413.
- Upton, R. H., R. P. Haugland, et al. (1996). "A spectrophotometric method to measure enzymatic activity in reactions that generate inorganic pyrophosphate." Analytical biochemistry **243**(1): 41-45.
- Vaisman, A., H. Ling, et al. (2005). "Fidelity of Dpo4: effect of metal ions, nucleotide selection and pyrophosphorolysis." The EMBO Journal **24**(17): 2957-2967.
- Veluchamy, A., X. Lin, et al. (2013). "Insights into the role of DNA methylation in diatoms by genome-wide profiling in *Phaeodactylum tricorutum*." Nature communications **4**.
- Villalba, J., M. Palmgren, et al. (1992). "Functional expression of plant plasma membrane H (+)-ATPase in yeast endoplasmic reticulum." Journal of Biological Chemistry **267**(17): 12341-12349.
- Von Heijne, G. (1985). "Signal sequences: the limits of variation." Journal of molecular biology **184**(1): 99-105.
- Wang, H. L., B. L. Postier, et al. (2002). "Polymerase chain reaction- based mutageneses identify key transporters belonging to multigene families involved in Na⁺ and pH homeostasis of *Synechocystis* sp. PCC 6803." Molecular microbiology **44**(6): 1493-1506.
- Wang, J.-K. and M. Seibert (2017). "Prospects for commercial production of diatoms." Biotechnology for Biofuels **10**(1): 16.
- Weiner, H., M. Stitt, et al. (1987). "Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **893**(1): 13-21.
- Wilson, K. J., A. Sessitsch, et al. (1995). "β-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria." Microbiology **141**(7): 1691-1705.
- Williams, J. G. (1988). "[85] Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803." Methods in enzymology **167**: 766-778.

- Wong, P. and K.-Y. Chan (1990). "Growth and value of *Chlorella salina* grown on highly saline sewage effluent." *Agriculture, ecosystems & environment* **30**(3-4): 235-250.
- Wu, H., Y. Huo, et al. (2015). "Bioremediation efficiency of the largest scale artificial *Porphyra yezoensis* cultivation in the open sea in China." *Marine pollution bulletin* **95**(1): 289-296.
- Xing, C., W. YanWen, et al. (2010). "Overexpression of AVP1 gene enhanced salt and drought tolerance of transgenic *Lotus corniculatus*." *Plant Physiology Communications* **46**(8): 808-816.
- Yang, Z. and T. Wensel (1992). "Inorganic pyrophosphatase from bovine retinal rod outer segments." *Journal of Biological Chemistry* **267**(34): 24634-24640.
- Yao, M., Y. Zeng, et al. (2012). "Overexpression of the halophyte *Kalidium foliatum* H⁺-pyrophosphatase gene confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*." *Molecular biology reports* **39**(8): 7989-7996.
- Yau, S., C. Hemon, et al. (2016). "A viral immunity chromosome in the marine picoeukaryote, *Ostreococcus tauri*." *PLoS Pathog* **12**(10): e1005965.
- Yi, Y.-J., M. Sutovsky, et al. (2012). "Identification of the inorganic pyrophosphate metabolizing, ATP substituting pathway in mammalian spermatozoa." *PloS one* **7**(4): e34524.
- Zenzie-Gregory, B., A. Khachi, et al. (1993). "Mechanism of initiator-mediated transcription: evidence for a functional interaction between the TATA-binding protein and DNA in the absence of a specific recognition sequence." *Molecular and Cellular Biology* **13**(7): 3841-3849.
- Zhang, D., P. Dechatiwongse, et al. (2015). "Analysis of the cyanobacterial hydrogen photoproduction process via model identification and process simulation." *Chemical Engineering Science* **128**: 130-146.
- Zhang, H., G. Shen, et al. (2011). "Creating drought-and salt-tolerant cotton by overexpressing a vacuolar pyrophosphatase gene." *Plant signaling & behavior* **6**(6): 861-863.
- Zhang, Y.-Q., S. Gamarra, et al. (2010). "Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs." *PLoS Pathog* **6**(6): e1000939.
- Zhang, Y. and R. Rao (2010). "Beyond ergosterol: linking pH to antifungal mechanisms." *Virulence* **1**(6): 551-554.
- Zhang, Z. and J. C. Reese (2006). "Isolation of yeast nuclei and micrococcal nuclease mapping of nucleosome positioning." *Yeast Protocol*: 245-255.
- Zhao, T., W. Wang, et al. (2009). "Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*." *The Plant Journal* **58**(1): 157-164.
- Zyryanov, A. B., A. S. Shestakov, et al. (2002). "Mechanism by which metal cofactors control substrate specificity in pyrophosphatase." *Biochemical Journal* **367**(3): 901-906.
- Zyryanov, A. B., A. V. Vener, et al. (2004). "Rates of elementary catalytic steps for different metal forms of the family II pyrophosphatase from *Streptococcus gordonii*." *Biochemistry* **43**(4): 1065-1074.

..