

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Biológicas

“ESTUDIO FUNCIONAL DE ENZIMAS DEL
METABOLISMO DEL CARBONO Y LA ENERGÍA
EN CÉLULAS AUTO- Y HETEROTRÓFICAS DE
ORGANISMOS FOTOSINTÉTICOS Y
QUIMIOLITOTROFOS”

Lic. M. Cecilia Corregido

Director: Dr. Alberto A. Iglesias

Co-Directora: Dra. C. Vanesa Piattoni

Laboratorio de Enzimología Molecular-Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- Universidad Nacional del Litoral

2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las Instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral. A la *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral* y al *Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)*. A los organismos que financian el trabajo que se desarrolla en nuestro laboratorio: a la *Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica*, a la *Universidad Nacional del Litoral* y al *CONICET*, además por otorgarme las Becas que me permitieron la dedicación exclusiva a esta tarea.

Quiero agradecer al *Dr. Alberto Iglesias* por darme la oportunidad de realizar la formación de la cuál tanto aprendí. Gracias por transmitirme sus conocimientos, compromiso y entusiasmo. Por hacer accesible tanta bibliografía y por sus valiosas correcciones que me hicieron crecer como profesional.

Gracias a la *Dr. Vanesa Piattoni* por confiar en mi desde el primer día y ayudarme a crecer tanto académicamente. Valoro que hayamos trabajado realmente en equipo por esta pasión por las algas verdes unicelulares que nos une. Siempre supiste responder y solucionar cada consulta mía y ayudarme a ir para adelante pase lo que pase. Sos una persona que contagia un entusiasmo que es capaz de mover lo que sea. Me ayudaste, me comprendiste, me escuchaste, me acompañaste, codo a codo o a la distancia lograste que no pierda las ganas, el enfoque ni la cordura. Trabajaría una y mil veces con vos, siempre volvería a elegirte. Gracias TOTALES por nuestra hermosa amistad. Te quiero eternamente!!

Gracias al *Dr. Diego Arias* por estar siempre respondiendo detalladamente cada cosa que se me ocurría y de una manera totalmente desinteresada. Sos un manual enorme de conocimiento que agradezco compartas con nosotros. Molestarte hasta hacerte sonreír fue una de mis tareas favoritas del día. Ojala te mantengas así de feliz por siempre, porque es tu mejor versión. Te quiero!

Quiero agradecer al *Dr. Alejandro Beccaria* y la *Dra. Vanina Márquez* por su enorme predisposición y amabilidad, por responder hasta el cansancio mis consultas y por darme la oportunidad de aprender de su gran experiencia. Me enseñaron valores y conocimientos que adopté como propios desde el primer día. Siempre serán mis padres científicos.

Gracias a los *Drs Matías Asencion, Carlos Figueroa y Sergio Guerrero* por transmitir sus conocimientos, experiencias y consejos. Siempre tuvieron buena predisposición cuando necesite algo y eso es muy valioso mientras transcurrimos este camino.

Quiero agradecer enormemente a mis invaluable compañeros y amigos del laboratorio. Hicieron que los resultados positivos sean una gran fiesta y los negativos tengas una salida alternativa. Compartir tanto tiempo juntos y que nos queramos tanto hizo que seamos un gran bloque.

Ana D., la única, la madre de todos, estas presente siempre que te necesitamos. Tienes ese don especial que sabe leernos e interpretarnos sin que digamos nada. Me has engordado con tantas delicias que ni al verano le tuve miedo. Sos una persona de hierro y a la vez muy sensible. Compartir parte de nuestro estudio fue muy gratificante, te quiero y gracias!

Mati H., mi hermano, mi amigo, mi compañero. Definitivamente nada hubiese sido igual sin que seas mi compañero de mesada. Me acuerdo que el primer día me dijiste, “Yo te hice lugar en mi mesada, acá, al lado mío”, desde ese día que te amo infinitamente. Me hiciste reír, divertirme, aprender a aprender cuando me ponía de malhumor. Juntos torturamos a los demás reproduciendo cualquier video bizarro que ande dando vueltas. Me enseñaste a superar todos los programas y técnicas complicadas. Siempre dispuesto a ayudar, sos de oro. Gracias por la amistad que hemos creado y por hacer todo para que sea eterna.

Bruno R., mi pequeño. Defenderte y malcriarte fue lo que hice desde el primer día y todavía me lo critican, pero no me arrepiento. Tienes un cerebro sin fondo, sabes lo que sea, entiendes de cualquier cosa que se te pregunte. Tus conocimientos no tienen límites en tema, región, profesión, etc., es un placer hablar con vos. Tus ideas y convicciones son admirables, tienes las palabras justas para todo. Realmente tu personalidad hace que puedas lograr lo que quieras: desde que te hagan la tarea semanal hasta el infinito y más allá. Gracias por dejarme ser parte de tu vida y por nuestra amistad! Te quiero por montones!

Nati S., desde la primera vez que te vi que no hemos parado de hablar, reírnos, contarnos anécdotas, viajes, etc. Compartimos la ardua tarea de estudiar idiomas e hiciste que sea una de las actividades más divertidas y esperadas de la semana. Sos la más buena de todos nosotros y a la que todos extrañan cuando se van del laboratorio; por algo será que nunca perdiste contacto con nadie, sos única. Te agradezco por ser como sos, por tus carcajadas pegadizas y por ser mi amiga. Gracias por acompañarme en este proceso. Te quiero tantiiiiisimo!!

Anto C., tu manera perfecta de tener todo bajo control hizo que seas un pilar importantísimo en el laboratorio. Todas las dudas, consultas e inquietudes conducen a vos. Sos buena, dedicada, positiva, tus consejos hicieron que todo parezca más fácil. Cualquier cartel nuevo, organización, regla, ley o cagada a pedo tienen tu autoría y me encantan. Gracias por estar siempre, ojala nuestras charlas de

la tarde-noche se mantengan a la distancia. Gracias por dejarme ser parte de tu vida y por dejarme conocer tu ciudad hermosa. Te quiero por siempre!

Robert el magnífico. Adiegate fue una de las consecuencia de tener que entregarte a “los de al lado”, pero así y todo te quiero!! Gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme o responderme lo que sea. Haz sido desde mi técnico en computación e impresión hasta mi compañero de “iniciadores de nuevo tema”. Siempre con un chiste diseñado de manera 100% calculada. Gracias por esa paz y buena predisposición para todo. Te quiero!!

Dani, Romi, Meli y Vicky C., mil gracias por todo. Me han hecho reír a carcajadas cada vez que nos juntamos, siempre fue un excelente plan. *Dani* gracias por ayudarme con todas las técnicas y dudas, por compartirme tu vida y tu música. *Romi*, desde que entraste nada volvió a ser igual. Estas siempre dispuesta a hacer las tareas, las meriendas, las tortas, los carteles. Junto con la *Dani* forman el ministerio mejor elaborado, el de la creatividad. *Meli* gracias por tu buena energía y simpatía a pesar de tu cara de limón. Desde que te conocí tuve esa sensación de ser amigas de toda la vida y disfruté cada momento compartido. *Vicky*, la niña mosca. Tenes una bondad y alegría tan innata que se contagia fácilmente. Gracias por compartir esta etapa conmigo y alegrarme los días. A todas, las quiero mucho!!!

Rodri y Alem, el dúo protagonista de una de las historias más graciosas del lab. Si una enzima de ellos no tiene actividad puede ser por (tachar la inicial incorrecta): i) sus ojos claros la inactivaron (A/R) o ii) se equivocó de carrera (A/R). *Rodri* gracias por tu humor tan particular, tenés siempre un comentario muy gracioso y original para acotar. Sos alegre, bueno y siempre dispuesto a ayudar. No pierdas tu simpleza para ver la vida, siempre todo puede ser como lo vemos. *Alem*, como buen taurino siempre tuviste un comentario óptimo. Gracias por tu buena onda de siempre, por prenderte en cualquier chiste o cargada, por estar siempre dispuesto a ayudarme y por hacer los asados o lo que se nos haya ocurrido poner en la parrilla. Sos una persona muy adaptable, le pones mucha garra y buena onda a cualquier situación, seguí así!! (aunque ser de Boca no sea nada fácil).

Franco, Vicky F., Pili y Tomi T., hemos compartido poco pero fue suficiente para que los quiera, no soy tan difícil. Gracias por tener siempre buena onda y estar dispuestos a ayudarme.

A “los de biología”, por ser tan geniales. Hemos debatido hasta los temas más exactos y me han hecho reír muchísimo por eso. Siempre están con buena onda y dispuestos a ayudarme o responderme lo que sea. Gracias por luchar por sus derechos, los míos y los de todos. Compartimos reactivos, charlas, festejos, días del amigo, sala “muda” y en todo eso fue siempre muy divertido. No pierdan esa energía ni vendan sus ideales.

Pablo, Manu y Seba, son literalmente de otra dimensión. Miles y miles de gracias por todo lo que han hecho por mí. Ir a visitarlos ha sido de las mejores cosas del día. Me han arreglado cosas, inventado lo que se me ocurra hacer, me cebaron mates, bailamos cumbia, cantamos, jugamos, comimos asado, me ayudaron a seguir sobreviviendo matándome un grillo o simplemente logrando cambiarme el humor. Nada hubiese sido igual sin ustedes. Mil gracias. Los quiero!!

Emi, tengo una duda, cómo era que...?, Me ayudas con....? Vos podrías...? No hay nada que no hayas hecho por nosotros. Sos todo!!! Siempre explicando una y mil veces las cosas con buena onda y haciendo que todo sea posible. Gracias por ser como sos, por tu simpleza, tu amabilidad, tus abrazos y por saber escuchar. Te quiero mil!!

Cuando la vida parece que sólo es el doctorado, salís y te encontras con personas maravillosas que tienen una gran sonrisa y un abrazo de oso para darte; los amigos *extralab*:

Anita, mi gran hermana desde el primer día en Santa Fe. Una vez me dijiste, “corre sin mirar para atrás” y yo no te hice caso y por ese motivo estoy escribiendo estos agradecimientos. Me ayudaste en los comienzos de este tramo tan difícil e importante de mi vida. Nos reimos y divertimos tanto que hacia que todo se vea siempre de una manera feliz. Tus consejos y abrazos siempre fueron los justos en cada momento y me ayudaron a seguir para adelante. Te extraño y te extraño cada día de mi vida. Gracias por existir, por permitirme estar a tu lado, y sobretodo por quererme tanto. Te amo muchísimo!

Jesi, otra de las hermanas que me dio la vida. Me ayudaste, me acompañaste, me aconsejaste e hiciste de cada momento juntas algo super divertido y especial. Sos de esas personas que se preocupan y ocupan hasta asegurarse que el otro esta bien, sos dulce, buena, dedicada y persistente. Sos una soñadora hermosa que me permite ver la vida desde otro lado. Gracias por dejarme ser parte de tu vida y de tu familia. Te amo muchísimo. Una persona tan especial no podía no tener un novio que no lo sea. *Fede*, gracias totales por ser como sos, has tenido de las ocurrencias más graciosas que me han hecho reír y divertir. Sos una persona que siempre mira el lado bueno de las cosas y puede transmitirlo. Sos de esas personas que siempre van a tener lo que quieren porque sos perseverante y libre de penamientos contradictorios. Gracias por incluirme en tu familia y en tu vida. Aunque nunca hayamos elegido una película buena, siempre la pasamos bien y nos supimos reír por eso los tres. Gracias por hacer feliz a mi hermana del alma. Te quiero muchísimo!!

Joha, gracias por dejarme ser parte de tu mundo. Siempre recuendo el día que te conocí y bailamos toda la noche como si nos conociéramos de antes. Desde ese día que sos mi hermanita hermosa! Sos una persona que siempre mira para adelante, dedicada, persistente, capaz de todo lo que quiera, gracias por transmitirme eso. Gracias por todo lo que has hecho por mi, por acompañarme,

escucharme, aconsejarme. Gracias por malcriarme cuando voy de visita, amo pasar tiempo con vos. Gracias por esos momentos graciosos que me gustaría que sean eternos.. Nunca voy a olvidar nuestro año nuevo 2018 y el viaje al río Bermejito, me hiciste muy muy feliz. Te amo con locura sojaaaaa mia!!!!

Juli S., amigas perfectas si las hay. Nos hemos conocido gracias a tu marido ideal, pero estoy segura que nos habíamos visto en otra vida, yo ya te conocía. Tu amistad fue de las cosas más bellas y gananciosas que me llevo. Sos una personita especial, de esas que son capaces de cambiar el mundo, tener la visión, las ganas y la persistencia perfecta para eso. Gracias por ser como sos porque eso me hace amarte infinitamente y gracias por dejarme ser parte de tu familia.

Gustavo, Ivan y el *Chino*, amigos hermosos que me ha dado la vida. Cada uno de ustedes me ha acompañado a su manera. *Gustavo*, me has hecho reír como ningún otro, tus ocurrencias y comentarios son geniales. Me acompañaste hasta el último día, siempre ayudándome y haciendo de todo lo difícil algo más fácil. Gracias por seguir existiendo pese a la distancia, te quierooo. *Ivan* sos una persona muy muy graciosa, amo escucharte y pasar momentos con vos. Me has cocinado zarpadoooo. A parte de gran cheff sos una grandísima persona incapás de generar maldad y sobretodo, un excelente Investigador del que me enorgullezco siempre, te quieroooo. *Chinex* gracias por sacarme siempre todas las dudas que se me ocurran y ayudarme en lo que te pida. Sos uno de los que me banca desde el día cero y agradezco a la vida por eso. Gracias por déjame estar en tu vida, que sé que no le toca a cualquiera. Gracias por cada hora que pasamos juntos, aunque me haya gustado que sean mas. Te quiero muchísimo!

A mis amigos *Martín, Inés, Lautaro, Pablo* y *Silvia*, GRACIAS!!!! Ustedes si que me han cambiado la vida, se han preocupado y ocupado por la optimización de cada parte y aspecto de ella. Siempre empujando para arriba, exigiéndome que sea aún mejor. Que grupo hermoso que somos, desde los primeros tiempos de nuestra historia, allá por el año 1 antes de la tierra. Al mundo entero le deseo amigos como ustedes. Gracias y mil gracias por permitirme formar parte y por seguir queriendo que lo sea. Los amo ayer, hoy y siempre.

La palabra "familia" viene del latín *famulus* que significa sirviente o esclavo. La palabra familia era equivalente a patrimonio e incluía no sólo a los parientes sino también a los sirvientes de la casa del amo. A continuación, mis esclavos:

A mi familia completa, abuelos, padres, hermanos, tios y primos, gracias a cada uno por decidir día a día que juntos todo es mejor, más fácil y posible. Siempre digo que en otra vida tuve que haber hecho todo perfecto porque la familia que tengo es indiscutible. Me han inculcado los mejores valores, creencias e ideales. Me enseñaron desde un comienzo que ser mujer no es una desventaja y

que debemos luchar contra el que así lo crea. Me enseñaron a respetar la decisión de cada persona por más diferente que sea a la mía. Me enseñaron que el lenguaje inclusivo no es solo palabras escritas con x, es vivir con amor, dar amor y permitir que otros lo den, es vivir y dejar vivir. Gracias por desconstruirme y construirme constantemente. Los amo de esa manera en la que da la sensación de que no entra en uno mismo. Puntualmente gracias a *mis padres y hermanos*, gracias por escucharme, acompañarme y aconsejarme. Antes creía que era común la relación que teníamos, que todas las familias eran iguales pero no, definitivamente somos especiales el uno para el otro. No es común no poder estar separados mucho tiempo, extrañarnos, dar lo que sea o hacer lo que sea por el otro y que los problemas de uno sean el de todos. No es común querer con locura que llegue el verano para poder vernos y disfrutarlos mucho tiempo. Gracias por hacer de cada momento que compartimos algo único, los voy a amar en esta y todas las vidas que vengan. Y si hay un personaje único en este grupo, capaz de unir a las partes más diferentes, capaz de crear amor en el infierno, capaz de ver la vida como algo bello y lleno de lo que querramos, esa es mi GRAN abuela *Malu*. Si existiera el premio a las personas más especiales del mundo con toda seguridad afirmaré que tenés uno. A veces pienso que las palabras y acciones que uno puede hacer por vos son escasas y nunca igualarán a lo que hacés por nosotros. Sos, junto con el Tete, la creadora de una familia libre, capaz de pensar por uno mismo y luchar por eso, de respetar a los demás y siempre considerar, antes de enojarse, que todos somos básicamente buenos. Un gran ejemplo de vida para cualquier persona que te conozca. Yo creo que a penas comenzaste esta vida decidiste ser especial y cambiar el mundo y te aviso que lo lograste y lo transmitiste. Has creado un grupo de personas con las mismas ambiciones, personas que quieren ser mejores cada día y que lucharían por el otro sin pedir nada a cambio. Nos enseñaste a considerar que somos parte de un todo y sólo como un todo funcionamos. Te amo tan inmensamente que no hay abrazo que lo represente.

Mariano, gracias por amarme por casi 13 años y compartir toda esta locura de vida conmigo. Me acuerdo cuando te conte sobre lo del doctorado, te pregunté si te bancabas que estemos 5 años más separados y no dudaste un segundo en decir que sí y me acompañaste en todo el proceso. Gracias por cada colectivo que te tomaste, por soportar mi mal humor en el teléfono, por ir un finde al laboratorio. Gracias por ser comprensivo, amoroso, atento, gracioso y lo más importante, por ser tan bueno. Tenés una familia hermosa que me cuidó y acompañó siempre. Te amo tanto como esos amores que parecen eternos.

PUBLICACIONES

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Enzimología Molecular, del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral y la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, bajo la dirección del Dr. Alberto Iglesias y la Co-Dirección de la Dra. C. Vanesa Piattoni.

Parte de los resultados de esta Tesis fueron publicados en:

María Cecilia Corregido, Matías Damián Asención Diez, Alberto Álvaro Iglesias y Claudia Vanesa Piattoni. “New Pieces to the Carbon Metabolism Puzzle of *Nitrosomonas europaea*: Kinetic characterization of glyceraldehyde-3phosphate and succinate semialdehyde dehydrogenases”. *Biochimie* 2019, Mar; 158:238-245.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
PUBLICACIONES.....	vii
ÍNDICE	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	10
La célula.....	10
Metabolismo celular.....	12
Modelos celulares estudiados en esta tesis:	14
<i>Chlorella</i> : célula eucariota fotosintética	14
<i>Nitrosomonas europaea</i> : célula procariota quimiosintética.....	16
Procesos acoplados: “la energía no se crea ni se destruye, se transforma”	17
Conversión de energía física o química en energía biológica	19
Fase luminosa de la fotosíntesis	19
Quimiosíntesis	21
Conversión del CO ₂ atmosférico en moléculas orgánicas	23
Metabolismo de los hidratos de carbono	25
Glucólisis	26
Pasos alternativos de la vía glucolítica.....	27
Ciclo del TCA.....	31
OBJETIVOS.....	34
Objetivo general	34
Objetivos particulares	34
Capítulo 1: <i>Chlorella</i> spp.....	36
Introducción	36
<i>Chlorophyta</i>	38
Metabolismo: de la comprensión a la aplicación	39

Objetivos	42
Materiales y Métodos	42
Reactivos	42
Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y antibiótico	43
Plásmidos	43
Cepas y antibióticos.....	43
Cepas bacterianas.....	43
Cepas de algas verdes unicelulares	43
Medios de cultivo	44
Mantenimiento de cultivo y obtención de biomasa	44
Cultivo de bacterias	44
Cultivo de algas verdes unicelulares	45
Cinética de proliferación celular	45
Métodos bioquímicos básicos	46
Electroforesis en geles de agarosa	46
Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	46
Cuantificación del contenido proteico.....	47
Desalado y concentración de proteínas.....	47
Electrotransferencia seguida de inmunodetección (WB)	47
Anticuerpos	47
Determinación de lípidos.....	48
Determinación de almidón	49
Tinción con Rojo Nilo.....	50
Metodología utilizada en biología molecular	51
Extracción del ARNm	51
Extracción de ADN genómico	52
Transcripción reversa: obtención del ADN copia.....	52
Cuantificación de ácidos nucleicos	53
Oligonucleótidos.....	53
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
Clonado	54
Subclonado.....	54

Extracción de ADN plasmídico	55
Corte con enzimas de restricción	55
Construcciones plasmídicas para la expresión de las enzimas recombinantes.....	55
Transformación de células.....	56
Cepas bacterianas.....	56
Cepas de algas verdes unicelulares	56
Purificación de las enzimas recombinantes	59
Filtración por gel.....	60
Disrupción y extracción protéica en células de <i>Chlorella</i> spp.....	60
Metodología de análisis enzimático	60
Medida de actividad de las deshidrogenasas (DHasas)	60
Medida de actividad Ga3PDHasa.....	61
Medida de actividad np-Ga3PDHasa	61
Medida de actividad Ga3PDHasa A y B.....	61
Medida de actividad ADP-Glc PPasa	61
Caracterización cinética de las enzimas en estudio	62
Análisis cinético	63
Resultados.....	63
Cultivo de distintas especies de <i>Chlorella</i> en condiciones autotróficas y heterotróficas.....	63
Caracterización de los cultivos de <i>Chlorella</i> sp.	64
Caracterización comparativa de los cultivos de <i>Chlorella</i> sp., <i>C. protothecoides</i> , <i>C. saccharophila</i> y <i>C.vulgaris</i>	66
Determinación de la actividad de distintas enzimas de <i>Chlorella</i> spp.	71
Determinación de la actividad de enzimas en extractos de <i>Chlorella</i> spp.	71
Clonado, expresión heteróloga, producción recombinante y caracterización de enzimas de <i>Chlorella</i> sp. involucradas en el metabolismo del carbono.	75
Extracción de RNA	75
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante (np-Ga3PDHasa; GapN)	77
Búsqueda de la secuencia que codifica para la np-Ga3PDHasa	77
Expresión recombinante de np-Gap3PDHasa en <i>E. coli</i>	77
ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGlc-PPasa)	79
Búsqueda de las secuencias de los genes que codifican para la ADP-Glc PPasa.....	79
Expresión recombinante de la ADP-Glc PPasa de <i>Chlorella variabilis</i>	81

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante cloroplastídica (Ga3PDHasaA; GapA)	85
Búsqueda de la secuencia que codifica la Ga3PDHasaA	85
Expresión recombinante de Ga3PDHasaA de <i>C. variabilis</i> y de Ga3PDHasaA y Ga3PDHasaB de <i>A. thaliana</i> en <i>E. coli</i>	87
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante citosólica (Ga3PDHasa; GapC)	92
Búsqueda de la secuencia que codifica para la Ga3PDHasa	92
Expresión recombinante de la Ga3PDHasa de <i>C. variabilis</i>	93
Caracterización cinética de las dos isoformas de la Ga3PDHasa de <i>C. variabilis</i> producidas en forma recombinante.....	97
Modificación genética de <i>Chlorella</i> sp.	98
Evaluación de diferentes metodologías de transformación de <i>Chlorella</i> sp.	99
Electroporación de protoplastos	100
Transformación de protoplastos empleando PEG	101
Transformación de células intactas con <i>A. tumefaciens</i>	101
Electroporación de células intactas	102
Transfección de <i>Chlorella</i> sp. y selección de los clones que contienen el gen de interés	102
Caracterización bioquímica de los clones de <i>Chlorella</i> sp. CPRasa ⁺	103
Discusión	108
Conclusiones	113
Capítulo 2: <i>Nitrosomonas europaea</i>	116
Introducción	116
Objetivos	119
Materiales y Métodos	119
Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y antibiótico	119
Plásmidos	119
Cepas bacterianas y antibióticos	119
Medios de cultivo	120
Obtención de biomasa bacteriana.....	120
Métodos bioquímicos básicos	120
Electroforesis en geles de agarosa	120
Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	120
Cuantificación del contenido proteico.....	121
Electrotransferencia seguida de inmunodetección (WB)	121

Anticuerpos	121
Metodología utilizada en biología molecular	122
Extracción del ARNm	122
Transcripción reversa: obtención del ADN copia.....	122
Cuantificación de ácidos nucleicos	123
Oligonucleótidos.....	123
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	123
Clonado	124
Subclonado.....	124
Extracción de ADN plasmídico.....	124
Corte con enzimas de restricción	125
Construcciones plasmídicas para la expresión de las enzimas recombinantes.....	125
Transformación de células bacterianas	126
Purificación de las enzimas recombinantes	126
Filtración por gel.....	127
Metodología de análisis enzimático	127
Medida de actividad de la la SSADHasa	127
Caracterización cinética de las enzimas en estudio.....	128
Análisis cinético.....	128
Resultados.....	128
Identificación y expresión recombinante de genes de <i>N. europaea</i> que codifican para aldehído deshidrogenasas (DHasas).....	128
CbbG.....	130
GabD.....	132
Caracterización de la actividad y la estructura cuaternaria de las dos aldehído-deshidrogenasas de <i>N. europaea</i> obtenidas en forma recombinante.....	134
Caracterización cinética de CbbG, la Ga3PDHasa de <i>N. europaea</i>	136
Caracterización cinética de la SSADHasa de <i>N. europaea</i> ; GabD	138
Discusión	142
Conclusiones	147
CONCLUSIONES GENERALES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	150

LISTA DE ABREVIATURAS

1,3bisPGA	1,3-bisfosfoglicerato
2PGA	2-fosfoglicerato
3PGA	3-fosfoglicerato
6PGDHasa	6-P gluconato deshidrogenasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
ADP	adenosina-5'-difosfato
ADPGlc	ADP-glucosa
ADPGlcPPasa	ADPGlc pirofosforilasa
AMP	adenosina-5'-monofosfato
AMPK	proteínas quinasas de mamíferos dependientes de AMP
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosina-5'-trifosfato
CO ₂	dióxido de carbono
DHAP	dihidroxiacetona-P
dNTPs	mezcla equimolecular de desoxinucleótidos
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
Eri4P	eritrosa-4-P
FBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa
Fru	fructosa
Fru1,6bisP	fructosa-1,6-bisP
Fru2,6bisP	fructosa-2,6-bisP
Fru6P	fructosa-6-P
Ga3P	gliceraldehído-3-P
Ga3PDHasa (A/B)	Ga3P deshidrogenasa fosforilante dependiente de NADPH
Ga3PDHasa	Ga3P deshidrogenasa fosforilante dependiente de NAD ⁺
Glc	glucosa
Glc1P	glucosa-1-P
Glc6P	glucosa-6-P
Glc6PDHasa	Glc6P deshidrogenasa
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico
IMAC	cromatografía de afinidad por metal inmovilizado
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
Mann6P	manosa-6-P
MDHasa	malato deshidrogenasa
ME	enzima mállica
βME	β-mercaptoetanol
MMM	marcador de masa molecular
MOPS	ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
NAD(H)	nicotinamida adenina dinucleótido (reducida)
NADP(H)	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducida)
np-Ga3PDHasa	Ga3P deshidrogenasa no-fosforilante dependiente de NADP ⁺
OAA	ácido oxalacético
OPPP	ciclo oxidativo de las pentosas-P
-P -	fosfato
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PEP	fosfoenolpiruvato
PEPCasa	PEP carboxilasa
PEPCKasa	PEP carboxiquinasa
PFKasa	fosfofructoquinasa dependiente de ATP
PFPasa	fosfofructoquinasa dependiente de PPI
PGKasa	fosfoglicerato quinasa
Pi	ortofosfato inorgánico
PKasa	piruvato quinasa
PMSF	fenilmetilfulfomilfluoruro
PPi	pirofosfato inorgánico
PRKasa	fosforribuloquinasa
Rib5P	ribosa-5-P
RNS	especies reactivas del nitrógeno
ROS	especies reactivas del oxígeno
RuBisCO	Rul1,5bisP carboxilasa/oxigenasa
Rul1,5bisP	ribulosa-1,5-bisP
Rul5P	ribulosa-5-P
SBPasa	sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa
SDS	dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
SPSasa	sacarosa-P sintasa
-S-S-	puente disulfuro
Suc	sacarosa
SuSy	sacarosa sintasa
<i>Ta</i>	<i>Triticum aestivum</i>
TBS	solución TRIS salino
TCA	ciclo de los ácidos tricarbónicos
THP	proteína intercambiadora de hexosas-P/Pi
TPIasa	triosa-P isomerasa
Tre6P	trehalosa-6-P
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TTP	proteína intercambiadora de triosas-P/Pi
TXP	proteína intercambiadora de Xul5P/Pi
UDPGlc	UDP-glucosa
UDPGlcPPasa	UDPGlc pirofosforilasa
UTP	uridina-5'-trifosfato
Xul5P	xilulosa-5-P

RESUMEN

Las microalgas son un grupo de microorganismos, eucariotas y procariotas, mayormente fotosintéticos, con diversos roles en los ecosistemas acuáticos y terrestres. Son actualmente muy reconocidas debido a sus potencialidades en salud, ambiente y energía, debido a que producen sustancias de interés terapéutico, como antitumorales y antivirales, y nutraceútico, como ácidos grasos poliinsaturados tipo ω -3, de cadena larga. Relacionados al aspecto medioambiental, está descrito su empleo en la biorremediación de zonas contaminadas con metales pesados o su uso en la reducción de la carga orgánica de ciertos efluentes. Se destacan además algunas cepas de microalgas por su capacidad de sintetizar y acumular elevadas cantidades de aceites, propiedad que se aprovecha para obtener la materia prima necesaria para la producción de biodiesel. La naturaleza fotosintética de estos microorganismos, vinculada a la acumulación de almidón, permite proyectar su empleo en la producción de etanol u otros alcoholes apreciados como biocombustibles. La acumulación de tales materiales de reserva en las células de microalgas, está asociada a diferentes factores tales como el estrés salino y la depleción de la fuente de nitrógeno. Los mecanismos moleculares asociados a este fenómeno comienzan a ser dilucidados, especialmente en organismos modelos como *Chlamydomonas reinhardtii*. Además de la capacidad fotosintética (autotrófica) de las microalgas, muchas especies son capaces de crecer en condiciones mixotróficas (en presencia simultánea de luz y fuentes de carbono-energía orgánica) o heterotróficas (en oscuridad y sólo con fuentes de carbono-energía orgánica). El poder variar las condiciones de cultivo, permite maximizar los rendimientos de los bioproductos según las condiciones metabólicas que favorezcan su producción. A su vez, permite simplificar los procesos de cultivo ya que en condiciones heterotróficas se pueden emplear sistemas de cultivo tradicionales, mejor caracterizados y de los cuales existe mayor experiencia para su escalamiento.

En la naturaleza existen también microorganismos denominados quimiolitautótrofos que, como los organismos fotosintéticos, asimilan el CO₂ atmosférico para cubrir la demanda de carbono que precisan para su crecimiento, obteniendo en este caso la energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos en presencia de oxígeno. Estos microorganismos son relevantes en los ciclos biogeoquímicos donde cumplen un rol fundamental en el movimiento de nitrógeno, oxígeno, hidrógeno, calcio, sodio, azufre, fósforo, potasio, carbono y otros elementos entre los seres vivos y el ambiente. Un ejemplo de estos organismos lo constituye *Nitrosomonas europaea*, una bacteria nitrificante que fija el CO₂ a expensas de la energía que obtiene de la oxidación del amoníaco a hidroxilamina. *N. europea*, a pesar de ser un organismo procariota, utiliza para la fijación del carbono ciclos y vías metabólicas similares a la de los organismos fotosintéticos eucariotas. Dado

su rol en la naturaleza, los estudios bioquímicos de este microorganismo se inclinaron hacia la comprensión del proceso de nitrificación, mientras que el estudio del metabolismo del carbono quedó rezagado.

En este trabajo, buscamos entender mejor el flujo del carbono y la energía en células con diferentes características tróficas y diferentes formas de obtención de energía, mediante el estudio de enzimas claves de las vías metabólicas que convierten el carbono y transforman la energía. Con este objetivo, nos centramos en el estudio molecular, cinético y regulatorio de enzimas la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante dependiente de NADP⁺ (np-Ga3PDH_{asa}), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante dependiente de NADP⁺ (Ga3PDH_{asa} A/B), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante dependiente de NAD⁺ (Ga3PDH_{asa}) y la ADP glucosa pirofosforilasa (ADP-Glc PP_{asa}).

En el caso de *Chlorella*, medimos la actividad de las enzimas en extractos celulares obtenidos al cultivar células en diferentes condiciones y, además, caracterizamos cinéticamente algunas de las enzimas que pudimos obtener en forma recombinante empleando *Escherichia coli* como huésped. Además, modificamos genéticamente una cepa de *Chlorella* sp. para evaluar el impacto de la sobreexpresión de una de las enzimas claves para la síntesis de poder reductor, en el metabolismo de acumulación de reservas de carbono.

Partiendo de cultivos autotróficos y heterotróficos de la cepa de *Chlorella* spp., se realizaron diferentes extracciones que nos permitieron cuantificar el contenido de triacilglicéridos, almidón, proteínas y determinar la actividad de enzimas relacionadas al metabolismo del carbono. A partir de los resultados obtenidos y comprando ambas condiciones de cultivo, pudimos concluir que en condiciones heterotróficas se favorece la síntesis de lípidos en detrimento de la acumulación de almidón, mientras que ocurre lo opuesto en condiciones autotróficas. Cuando hubo un aumento en la cantidad de lípidos, también detectamos una mayor actividad de la Ga3PDH_{asa}. Mientras que, en condiciones autotróficas, donde se acumula mayor cantidad de almidón, incrementó la actividad de la ADP-Glc PP_{asa}. Además, caracterizamos de forma comparativa los cultivos de *Chlorella* sp., *C. protothecoides*, *C. saccharophila* y *C. vulgaris* tanto en condiciones autotróficas y heterotróficas, resultando que a excepción de *C. vulgaris*, las diferentes cepas acumulan mayor cantidad de lípidos en condiciones heterotróficas.

Para poder caracterizar las propiedades regulatorias, cinéticas y estructurales de las enzimas de *Chlorella variabilis* antes mencionadas, identificamos en las bases de datos los genes que las codifican mediante homología de secuencias empleando como molde enzimas ya caracterizadas.

Luego de identificarlos, se clonaron los genes *CvagapN*, *CvagapA*, *CvaGapC* y los genes que codifican las subunidades *large*, *small* y *smarge* de la ADP-Glc PPasa. Todos estos genes se expresaron en *Escherichia coli*, evaluando para todos los casos numerosos ensayos de expresión cambiando los plásmidos, las cepas de *E. coli* y las condiciones de cultivo. Los genes, *CvagapN* (que codifica para la np-Ga3PDHasa) y los correspondientes a las diferentes subunidades de la ADP-Glc PPasa, se expresaron principalmente de manera insoluble o carecían de actividad enzimática. Con respecto al gen *CvagapA*, que codifica para una Ga3PDHasaA, logró expresarse y purificarse mediante varios pasos, pero al determinar su actividad enzimática esta resulto tener una actividad muy baja en comparación a lo determinado para la misma enzima en otros organismos. Por estos motivos, no se avanzó en la caracterización cinética y estructural de dichas enzimas. Por último, cuando buscamos el gen *CvaGapC* que codifica una Ga3PDHasa citosólica., encontramos dos genes que codifican para la misma enzima, tal como ocurre en *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Arabidopsis thaliana*. Ambos genes se clonaron, expresaron y purificaron mediante cromatografía de unión a metal. En ambos casos se obtuvo la enzima de forma activa y con valores de actividad similares a los ya informados para otras Ga3PDHasas. La determinación de la masa molecular indicó que la isoforma Ga3PDHasa-1 recombinante es activa en una conformación nativa homohexamérica, mientras que la Ga3PDHasa-2 resultó ser activa con una estructura cuaternaria del tipo homotetramérica. Ambas isoformas resultaron ser específicas para el par NAD⁺/NADH. Se calcularon los parámetros cinéticos en ambos sentidos de la reacción, oxidación de Ga3P y reducción de 1,3bisPGA. Comparando los valores obtenidos para cada una de las enzimas, se observó que la Ga3PDHasa-1 tiene aproximadamente el doble de afinidad por el D-Ga3P y la mitad de la afinidad por el NAD⁺ que la Ga3PDHasa-2. Mientras que, las isoformas no presentaron diferencias significativas con respecto a la velocidad máxima en sentido de oxidación del D-Ga3P. En el sentido inverso de reacción, la velocidad de reducción del 1,3bisPGA es dos veces mayor cuando ocurre mediante la Ga3PDHasa-1, sin observarse diferencias en la afinidad por los sustratos con la Ga3PDHasa2. Cabe mencionar que la cinética de reacción de las Ga3PDHasas citosólica en sentido de reducción del 1,3bisPGA, es muy poco estudiada por lo que estos resultados aportan información novedosa sobre el comportamiento de las isoformas de las Ga3PDHasas.

Respecto a la modificación genética de *Chlorella* sp., se evaluaron varias metodologías de transformación hasta encontrar una resultó exitosa y fácilmente aplicable. Luego de seleccionar los clones de *Chlorella* sp. que expresaban el gen introducido mediante ingeniería genética, las células se cultivaron en condiciones de cultivo auto-, hetero- y mixo-tróficas. En comparación con la cepa sin editar genéticamente, al inicio de la fase estacionaria del cultivo las células transformadas alcanzaron una densidad celular menor. Sin embargo, al cuantificar los compuestos de reserva, se

pudo determinar que las cepas de *Chlorella* sp. que sobreexpresaban el gen de interés fueron capaces de acumular entre 20-50 veces más mg TAG por gramo de biomasa en comparación con la cepa control. Esto indica que la expresión de un único gen exógeno en *Chlorella* sp., incidió significativamente en el flujo metabólico favoreciendo la síntesis y acumulación de ácidos grasos por sobre la acumulación de almidón que disminuyó de 2 a 5 veces.

En el caso de *N. europaea*, adquirimos su ADN genómico y amplificamos a partir del mismo los genes que codifican para la Ga3PDHasa (codificada por el gen *cbgG*) y la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADHasa, codificada por el gen *gabD*). Ambas preteínas de produjeron forma recombinante clonando los ADNc correspondientes en plásmidos de expresión adecuados y transformando células de *E. coli*. Las dos enzimas se obtuvieron como polipéptidos fusionados a una etiqueta de histidinas, presentando actividad enzimática y lográndose purificar a homogeneidad electroforética.

En *N. europaea*, la Ga3PDHasa participaría en diferentes vías metabólicas: fijación del carbono mediante el ciclo de Benson-Calvin-Basham (BBC), la glucólisis y/o la gluconeogénesis, catalizando la oxidación reversible del Ga3P a 1,3bisPGA. En organismos eucariotas que emplean el ciclo de BBC, el cofactor clave para la transferencia del poder reductor a las triosas-P es el NADP⁺; sin embargo, la enzima de *N. europaea* es específica para el NAD⁺. Esto indica que independientemente de la vía metabólica en la que participe la Ga3PDHasa de *N. europaea*, la enzima emplea NAD para llevar a cabo su función. Tratándose de en un organismo quimiolitotrófico procarionta que carece de vías catabólicas, entendemos que se logra un ahorro significativo de energía al usar NADH en lugar de NADPH (el cual es generado a partir del NADH en una reacción dependiente de energía) para reducir 3-PGA.

En cuanto al gen *gabD*, a partir de la búsqueda realizada *in silico* en la base de datos del genoma de *N. europaea* se pudo identificar por similitud de secuencias que codificaría una SSADHasa (similar a la de *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus tokadaii*) y/o una np-Ga3PDHasa (similar a la de *Sulfolobus tokadaii* y *Triticum aestivum*). Estas dos enzimas están muy relacionadas en su secuencia y pertenecen a la superfamilia de las aldehído DHasas. De los estudios cinéticos realizados con la enzima que obtuvimos de forma recombinante, pudimos determinar que GabD puede catalizar la oxidación irreversible del Ga3P a 3PGA utilizando tanto NAD⁺ como NADP⁺ como cofactor, asemejándose así a la función que cumplen las np-Ga3PDHasas. Sin embargo, la actividad de la enzima al reemplazar el Ga3P por SSA, fue tres y cuatro órdenes de magnitud mayor en presencia de NAD⁺ o NADP⁺, respectivamente. Todos estos resultados sugirieron que GabD codifica para una SSADHasa que preferiblemente usa NADP⁺ como cofactor pero que es promiscua

por el NAD⁺. Los estudios realizados para comprender la función de la SSADHasa en *N. europaea* indicaron que la misma participaría del ciclo del ácido tricarboxílico, convirtiendo el SSA, resultante de la descarboxilación del α -cetoglutarato por la descarboxilasa específica (enzima anotada como NE2374 en la base de datos NCBI), en succinato. Así, estas dos enzimas serían capaces de cerrar el ciclo del TCA en *N. europaea* que hasta el momento se consideraba en forma de herradura, planteando así una vía alternativa que también se ha descrito en micobacterias, *Rhodococcus* y cianobacterias.

Los resultados obtenidos en este trabajo, contribuyen a la comprensión de los roles metabólicos desempeñados por las enzimas estudiadas en organismos con metabolismo auto-, hetero. y quimiolitioauto-trófico. Específicamente, los estudios comparativos realizados proporcionan información metabólica valiosa en dos organismos de relevancia en la naturaleza y con perspectivas biotecnológicas promisorias.

ABSTRACT

Microalgae are a group of microorganisms, both eukaryote and prokaryote, mostly photosynthetic, with different roles in aquatic and terrestrial ecosystems. They are recognized due to its potential biotechnological application in health, environment and energy. The different microalgae organisms produce a battery of compounds of therapeutic interest as antitumor, antiviral, and nutraceutical, like the long chain ω -3 polyunsaturated fatty acids. In the environment, they are use for bioremediation of heavy metals contaminated zones or for reducing the organic compounds present in specific effluents. Also, some microalgae have the ability to produce high quantities of oils that constitute a raw material for biodiesel production. The photosynthetic nature of microorganisms, in relation with starch accumulation, is a promising source to produce ethanol or other alcohols employed as biofuels. The accumulation of carbon reserves in some microalgae is related with different factors such as saline stress, depletion of nitrogen source and other culture conditions. The metabolic pathways and the culture conditions favoring the accumulation of carbon reserves as oil or starch are starting to be elucidated, especially in model organisms such as *Chlamydomonas reinhardtii*. Beyond the photosynthetic capacity (autotrophic metabolism) of microalgae, many strains are able to growth in mixotrophic (concurrent presence of light and organic carbon and energy source) or heterotrophic (in darkness with organic carbon-energy source) conditions, allowing the maximization of bioproducts yields according to the culture condition favoring the metabolic scenario for the bioproduct synthesis. At the same time, the alternative culture conditions may simplify the scaling process, being the heterotrophic conditions suitable for traditional industrial culture systems that are well characterized.

In nature, there are also microorganisms that are called chemolithoautotroph. This organisms, as photosynthetic ones, are able to capture atmospheric CO₂ to satisfy the carbon demand using the energy obtained from the oxidation of inorganic compounds in the presence of oxygen. These microorganisms are relevant in the biogeochemical cycles where they play fundamental roles in the interconversion of nitrogen, oxygen, hydrogen, calcium, sodium, sulfur, phosphorus, potassium, carbon and other elements between living organisms and the environment. An example of these is *Nitrosomonas europaea*, a nitrifying bacteria able to fixed CO₂ at the expense of the energy obtained from the oxidation of ammonium to hydroxylamine. *N. europaea*, a prokaryotic organism, can fixed the CO₂ using similar metabolic pathways than the photosynthetic eukaryotic organisms. Given its role in nature, the biochemical studies in *N. europaea* were focus towards the nitrification process, while the study of its carbon metabolism was left behind.

In this project, we aim to better understand the carbon and energy flux in cells with different trophic characteristics by studying key enzymes involved in the metabolic pathways that convert carbon and transformed the energy. With this purpose, we selected *Chlorella* sp. and *N. europaea* as model organisms and using different strategies, we studied the molecular, kinetic and regulatory properties of the following enzymes: cytosolic (NADP⁺ dependent) non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (np-Ga3PDHase), plastidic (NADP⁺ dependent) phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ga3PDHase A/B), cytosolic (NAD⁺ dependent) phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Ga3PDHase) and ADP-glucose pyrophosphorylase (ADP-Glc PPase).

In the case of *Chlorella*, we culture different species under different trophic conditions and measured the enzymes activity in the cell extracts. We also kinetically characterize some enzymes that we recombinant expressed in *Escherichia coli*. Additionally, we genetically modify *Chlorella* sp. cells to express a key enzyme for synthesis of reducing power and evaluate the impact of the gen overexpression in the metabolism of carbon reserve accumulation. Starting from autotrophic and heterotrophic culture of *Chlorella* spp. cells, we quantified the content of triacylglycerides (TAGs), starch and proteins, and determined some enzymes activities related to the carbon metabolism. Based on the results, when both culture conditions were compared it was concluded that in heterotrophic conditions carbon sources are best reserves as lipids instead of starch, while the opposite was determined under autotrophic culture conditions. When lipids accumulation was increased, it was detected a greater Ga3PDHase activity. Under autotrophic conditions, where carbon is better accumulated as starch, the ADP-Glc PPase activity was increase. The same results were obtained when we culture *Chlorella* sp., *C. protothecoides*, *C. saccharophila* under autotrophic and heterotrophic conditions, resulting *C. vulgaris* an exception as it accumulated the same quantity of lipids and starch under both culture conditions.

In order to characterize the regulatory, kinetic and structural properties of *Chlorella variabilis* enzymes we identify in the database by sequence homology the genes encoding the enzyme mention before. The *CvagapN*, *CvagapA*, *CvaGapC* genes and the genes encoding for the *large*, *small* and *smarge* subunits of the ADP-Glc PPase were identified, cloned and expressed in *Escherichia coli*. For all the genes we assayed different expression conditions changing the expression plasmids, the *E. coli* strains and the culture media. The genes, *CvagapN* (which codes for np-Ga3PDHase) and those corresponding to the different subunits of the ADP-Glc PPase, were mainly expressed as insoluble polypeptides or soluble polypeptides without enzymatic activity. The *CvagapA* gene, coding for a Ga3PDHaseA, was soluble expressed and purify by several steps, a very low enzymatic activity was detected not comparable with the activity determined for the same

enzyme in other organisms. For the reasons mention in each case, we not continue with the kinetic and structural characterization of these enzymes. For the Ga3PDHase we found two genes, *CvagapC-1* and *CvagapC-2* encoding the same enzyme, as was also reported in *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Arabidopsis thaliana*. Both genes were cloned, expressed and purified by immobilized-metal affinity chromatography, and both recombinant proteins were active enzymes with activity values similar to those reported for other Ga3PDHases. The native molecular mass determined for the active recombinant Ga3PDHase-1 was an homo-hexamer, while for the Ga3PDHase-2 isoform was an homotetramer. When we kinetically characterized the enzymes in both directions of the reaction, oxidation of Ga3P and reduction of 1,3bisPGA, it was determined that both isoforms were specific for the NAD⁺/NADH pair. Comparing the values obtained for each enzyme, the Ga3PDHase-1 showed a twice affinity for D-Ga3P and a half affinity for NAD⁺ than Ga3PDHase-2, while both isoforms showed similar V_{max} for the oxidation of D-Ga3P. In the reverse direction of reaction, the reduction rate of 1,3bisPGA was two times higher when was catalyze by the Ga3PDHase-1 instead of the Ga3PDHase-2. Kinetic characterization of cytosolic Ga3PDHases in the reduction of 1,3bisPGA sense of reaction, is not frequently determined, so it constitute valuable information to better know the activity of the Ga3PDHases isoforms.

Regarding the genetic modification of *Chlorella* sp., we evaluated several transformation methodologies until we found a successful and easily applicable transformation protocol. To select the genetically engineered *Chlorella* sp. clones expressing the recombinant gene introduced, the cells were grown under auto-, hetero- and mixo-trophic conditions, and the insertion of the exogenous gene into the genomic DNA was checked by PCR. Compared to the wild type strain (control strain), the culture of the genetically engineered *Chlorella* sp. cells reached a lower cell density at the beginning of the lag phase. However, when we quantify the accumulation of reserve compounds, we determined that *Chlorella* sp. cells expressing the exogenous gene were able to accumulate between 20-50 times more TAGs per gram of biomass when compared to the control strain. This shows that the expression of this single gene in *Chlorella* sp. significantly influenced the metabolic flow favoring the synthesis and accumulation of fatty acids in detriment of the starch accumulation which decreased between 2-5 times.

In the case of *N. europaea*, we acquire its genomic DNA to amplified the genes *cbbG* and *gabD*. Both recombinant proteins were expressed by cloning the corresponding cDNA into an expression plasmid and using *E. coli* cells as a host. Both enzymes were obtained as polypeptides fused to an N-term His-tag, purified until electrophoretic homogeneity and showed fully active.

The *cbbG* gene encodes for the Ga3PDHase. In *N. europaea*, Ga3PDHase would be part of different metabolic pathways: carbon fixation by the Benson Calvin Basham cycle (BBC), glycolysis and/or gluconeogenesis, catalyzing the reversible oxidation of Ga3P to 1,3bisPGA. In eukaryotic organisms using the BBC cycle, the key cofactor to the transfer of reducing power to the P-triose is NADP⁺; however, the enzyme from *N. europaea* was specific for NAD⁺. This shows that regardless of the metabolic pathway in which the Ga3PDHase from *N. europaea* is being involved, the enzyme will only use NAD⁺ to carry out its enzymatic activity. In the case of prokaryotic chemolithoautotrophic organisms, like *N. europaea*, which lacks catabolic pathways, it is hypothesized that the cells will significantly save energy by using NADH instead of NADPH (which is generated from NADH in an energy dependent reaction) to reduce 3-PGA.

The *gabD* gene from *N. europaea*, was identified by sequence homology as a semialdehyde succinate dehydrogenase (SSADHase), similar to *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus tokadaii* proteins; and as a np-Ga3PDHase, similar to *Sulfolobus tokadaii* and *Triticum aestivum* proteins. These two enzymes are closely related in their sequence and belong to the aldehyde DHases superfamily. From the biochemical studies assayed in this work with the recombinant enzyme, it was clear that the GabD protein was active to irreversibly oxidized the Ga3P to 3PGA using NAD⁺ or NADP⁺ as a cofactor, resembling the activity of the np-Ga3PDHases. However, when Ga3P was replaced by SSA as substrate the catalytic efficiency for the oxidation of SSA, was 3 and 4 orders of magnitude higher with NAD⁺ and NADP⁺, respectively. All these results suggest that the GabD protein was better function as a SSADHase preferably using NADP⁺, but being promiscuous for NAD⁺. To understand the role of the SSADHase in the *N. europaea* metabolism, we search for the role of the enzyme in other related organisms and searched for all the genes that would be related to the identified metabolic pathways in *N. europaea*. In this scenario it was identified that the enzyme would be involve in the TCA cycle, specifically oxidizing to succinate the SSA resulting from the decarboxylation of the α -ketoglutarate catalyzed by the specific decarboxylase (annotated as NE2374 in the *N. europae* genome). Together, these two enzymes would replace the missing enzyme and close the *N. europaea* TCA cycle by this alternative pathway also found in *Mycobacteria*, *Rhodococcus* and *Cyanobacteria*.

Results reported in this work contribute to the understanding of metabolic roles played by the enzymes studied in organisms with auto-, hetero- and chemolithoauto-trophic metabolism. Specifically, the comparative works give valuable information with respect to the carbon metabolism that it is reserve as different compounds in two organisms that are relevance in nature and promising for biotechnological applications.

INTRODUCCIÓN

La célula

Uno de los principios fundamentales de la biología es que todos los organismos vivos están compuestos de una o más unidades similares conocidas como células. La palabra célula, fue usada por primera vez en un sentido biológico hace aproximadamente 350 años. En el siglo XVII, el científico inglés Robert Hooke, usando un microscopio fabricado por él mismo, notó que el corcho y otros tejidos vegetales estaban constituidos por pequeñas cavidades separadas por paredes. Llamó a estas cavidades células, cuyo significado es “habitaciones pequeñas”. Sin embargo, la célula no adoptó su acepción actual de la unidad básica de la materia viva hasta unos 150 años después [1]. En 1838 Matthias Schleiden, para los tejidos vegetales, y en 1839 Theodor Schwann, para los tejidos animales, concluyeron que todos los tejidos de los organismos vivos consisten en masas de células organizadas. En 1858 el patólogo Rudolf Virchow generalizó diciendo: “Donde existe una célula debe haber habido una célula preexistente, así como un animal surge solamente de un animal y una planta surge solamente de una planta. A través de toda la serie de formas vivas, sean organismos animales o vegetales enteros, o sus partes componentes, gobierna una ley de desarrollo continuo” [1-4]. A partir de la perspectiva dada por la teoría de la evolución de Darwin, publicada en el año siguiente, el concepto de Virchow tomó aun mayor significado. Hoy sabemos que hay continuidad ininterrumpida entre las células modernas y los organismos unicelulares primitivos que aparecieron por primera vez sobre la Tierra hace más de tres mil millones de años. De este modo, todas las funciones vitales emanan de la maquinaria celular y de la interacción entre células adyacentes; además, la tenencia de su información genética codificada en el ADN (base de la herencia biológica), permite la transmisión de la información de generación en generación logrando así perpetuar la especie [1-4].

La teoría celular establece que: i) todos los organismos vivos están compuestos por una o más células; ii) las reacciones químicas de un organismo vivo, incluido sus procesos liberadores de energía y sus reacciones biosintéticas, tienen lugar dentro de la célula; iii) las células se originan de otras células; y iv) las células contienen la información hereditaria de los organismos de los cuales son parte, y esta información pasa de una célula progenitora a una célula hija [1-3, 5]. Todas las células comparten dos características esenciales. La primera es una membrana externa, la membrana celular, que separa el contenido celular de su ambiente externo. La otra es el material genético que tiene toda la información que necesita la célula para desarrollar todas sus actividades, incluso de manera específica y organizada, hasta reproducirse y transmitir sus características a la prole.

En la línea evolutiva que organiza a las especies vivas, podemos distinguir dos tipos distintos de células: las eucariotas y las procariotas. En las células eucariotas el ADN es lineal, está fuertemente unido a proteínas especiales (denominadas histonas) y está organizado en un número definido de cromosomas según la especie. Este material genético está confinado dentro del núcleo de la célula que está definido por una doble membrana (la envoltura nuclear), que lo separa del contenido celular y a su vez lo comunica mediante poros que intercambian moléculas de manera específica. En los procariotas (termino que expresa “antes de un núcleo”), el ADN se organiza en una única molécula circular a la que están débilmente asociadas diversas proteínas. En este caso, el material genético (que no está contenido dentro de un compartimiento específico), está ubicado en una región definida llamada nucleóide [1, 2, 5].

Los dominios en los que se clasifican a los seres vivos según su parentesco evolutivo, engloban a los organismos procariotas en los dominios bacterias y *archaeas* (conocidos también como Eubacteria y Archeobacteria, respectivamente). Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta; son ubicuas, se encuentran en todos los hábitats terrestres y acuáticos, crecen hasta en las condiciones más extremas, como en los manantiales de aguas calientes y ácidas, en desechos radioactivos, en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre e, incluso, algunas bacterias pueden sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior [2]. Los distintos organismos procariotas, son imprescindibles para el reciclaje de los elementos orgánicos en los ciclos biogeoquímicos de compuestos como el carbono, el oxígeno y el nitrógeno, entre otros.

Por otra parte, pertenecen al dominio Eukarya los reinos que engloban a los animales, las plantas y los hongos, así como varios organismos incluidos dentro del parafilético reino Protista (un grupo que contiene a todos los organismos eucariotas que no pueden agruparse en los otros reinos). Dentro del reino *Plantae* se encuentran todos los seres vivos fotosintéticos, sin capacidad locomotora y con paredes celulares compuestas principalmente de celulosa [1]. Entre la comunidad científica, aun no se ha logrado un consenso sobre cómo delimitar este grupo y se discute aun si las algas eucariotas pertenecen o no al mismo. Sin embargo, todos concuerdan en incluir en el reino *Plantae* a algunas algas verdes unicelulares como *Chlamydomonas* o *Chlorella*, consideradas como los organismos predecesores de las células vegetales que componen a las plantas terrestres.

Metabolismo celular

La palabra metabolismo significa etimológicamente “cualidad de cambio”; es decir, la cualidad que tiene los seres vivos de poder cambiar químicamente la naturaleza de ciertas sustancias [1]. Las sustancias que se incorporan a un organismo ingresan en una red de reacciones bioquímicas en las que esas sustancias se degradan o se utilizan para la síntesis de compuestos más complejos. Estas reacciones bioquímicas están organizadas en vías metabólicas energéticamente eficientes que convierten a los organismos vivos en expertos en la conversión energética. La energía que ingresa a las células, ya sea en la forma de energía física o química, es transformada y almacenada por los organismos para llevar a cabo todas las actividades celulares. Esto incluye a los numerosos procesos de síntesis de una gran diversidad de moléculas y estructuras celulares que le permiten al organismo mantenerse con vida y reproducirse. Por lo tanto, el conjunto de reacciones bioquímicas y de transformaciones energéticas que ocurren durante la síntesis y degradación de moléculas relativamente simples, constituye lo que se denomina metabolismo [1, 6, 7].

El metabolismo de cada célula y organismo tiene características similares y particulares que permiten diferenciarlos entre sí teniendo en cuenta las siguientes características principales [5, 7, 8]:

- según la fuente de energía utilizada, las células se pueden clasificar en *fotosintéticas* (si obtienen energía a partir de la luz solar), o *quimiosintéticas* (si usan la oxidación de compuestos químicos como fuente energética).

- según la fuente de carbono utilizada, los organismos se denominan *litótrofos*, cuando pueden utilizar materia inorgánica (CO₂) u *organótrofos*, si emplean materia orgánica (proteínas, carbohidratos, lípidos).

- según el metabolismo del carbono que utilizan, las células y organismos se pueden clasificar como *heterotróficos* (si utilizan como fuente de carbono moléculas orgánicas sintetizadas por otro ser vivo), o *autotróficos* (si son capaces de sintetizar sus propias moléculas orgánicas a partir de moléculas inorgánicas).

Las diversas células que componen un organismo pueden tener características metabólicas similares o diferentes [5]. Por ejemplo, los animales y algunos hongos son organismos totalmente heterotróficos; sin embargo, las plantas son organismos compuestos por células autotróficas y heterotróficas que se organizan en tejidos específicos. En el caso de las plantas, la energía asimilada por las células autótrofas del tejido fotosintético, es utilizada por las células heterotróficas que conforman los tejidos no-fotosintéticos. Por su parte, algunos organismos unicelulares, tienen la

particularidad de que pueden modificar su metabolismo y funcionar en condiciones autotróficas o heterotróficas según las condiciones de su entorno [9]. Esta plasticidad metabólica dentro de una misma célula se observa, por ejemplo, en algunas algas verdes unicelulares y en algunas bacterias que pueden crecer de diferente manera dependiendo de las condiciones del medio en el que se encuentren. Incluso pueden comportarse como mixotróficas; es decir, combinando vías metabólicas que les permiten utilizar fuentes de carbono tanto orgánicas como inorgánicas al mismo tiempo [9, 10].

El metabolismo global de una célula, es una combinación compleja de vías metabólicas interconectadas que varía de un organismo a otro. Dentro de una célula coexisten distintos tipos de vías metabólicas que permiten degradar y al mismo tiempo sintetizar las diferentes moléculas que la célula necesita [5]. Las vías metabólicas que producen energía mediante la degradación de moléculas se denominan vías catabólicas, mientras que las que requieren de energía para la síntesis de moléculas más complejas se denominan vías anabólicas. Cada una de estas vías metabólicas consiste de una serie de reacciones bioquímicas interconectadas que paso a paso convierten una o más moléculas utilizadas como sustrato en otras moléculas que resultan como producto [5, 7].

Los organismos vivos surgieron hace unos 3.800 millones de años, cuando la atmósfera carecía de oxígeno, y evolucionaron a partir del mismo ancestro común para adaptarse a los cambios del medioambiente y así sobrevivir [1, 5]. A pesar de las grandes diferencias que fueron desarrollando los organismos a lo largo de la cadena evolutiva, se ha demostrado científicamente que las vías metabólicas fueron evolucionando mediante el agregado o eliminación de enzimas especializadas que permitió que los organismos se adapten a su entorno, aumentando así sus posibilidades de mantenerse con vida.

Las rutas anabólicas, que requieren un aporte de energía para sintetizar moléculas complejas a partir de moléculas más simples incluyen las vías de síntesis de carbohidratos a partir de CO_2 , de proteínas a partir de aminoácidos, o de ADN a partir de ácidos nucleicos. Estos procesos biosintéticos tienen lugar constantemente y demandan de energía y equivalentes de reducción, suministrados en forma de ATP, NADH y NADPH. Las vías catabólicas, complementariamente, degradan moléculas complejas como los carbohidratos y lípidos hasta obtener moléculas simples como ATP, NADH y/o NADPH que retienen la energía y el poder reductor que se genera al descomponer los enlaces químicos de las moléculas complejas.

Las células combinan estas vías anabólicas y catabólicas que pueden ocurrir en compartimentos intracelulares iguales o diferentes, dependiendo del tipo celular. Cuando ocurren en el mismo compartimento, como en los organismos procariotas, las vías metabólicas opuestas están reguladas

de manera específica para que funcionen de manera coordinada. En el caso de los organismos eucariotas, las vías metabólicas opuestas están organizadas en diferentes compartimentos, pudiendo así ocurrir en simultáneo y de manera eficiente, además de estar reguladas de manera específica. Las enzimas involucradas en dichos procesos metabólicos pueden catalizar las reacciones de manera diferente; por ejemplo utilizando distintos co-sustratos, o pueden ser reemplazadas por enzimas alternativas que les permiten adaptarse mejor a su hábitat o en respuesta a estímulos específicos. Estudiar el metabolismo de organismos con vías particulares pero con varias enzimas compartidas, permite entender las adaptaciones metabólicas e inferir funciones y posibles aplicaciones biotecnológicas de las diferencias y similitudes entre ellos.

Modelos celulares estudiados en esta tesis:

***Chlorella*: célula eucariota fotosintética**

Chlorella es un alga verde unicelular eucariota que pertenece a un grupo de microorganismos fotosintéticos incluidos en el reino Plantae. Son claves para mantener el equilibrio gaseoso en la atmósfera, ya que pueden fijar CO₂ y liberar O₂ a la atmósfera mediante el proceso de fotosíntesis y devolver parte del CO₂ mediante la respiración celular [9, 10]. Además, al ser organismos autótrofos, constituyen la base de las cadenas tróficas que permiten la vida en los ecosistemas acuáticos. Existen diferentes especies de *Chlorella* con plasticidades metabólicas particulares que les da capacidad de crecer en condiciones de cultivo autotróficas (presencia de luz sin fuente de carbono orgánica), heterotróficas (ausencia de luz con fuente de carbono orgánica) o mixotróficas (presencia de luz con fuente de carbono orgánica) [9-11].

Las células de *Chlorella*, como otros organismos eucariotas, están formadas por diferentes compartimentos intracelulares organizados en organelas, tal como se representa en la Figura 1. Dentro de sus organelas se encuentran las vacuolas (gránulos que contienen sustancias de reserva) y los plástidos (cloroplastos y leucoplastos), característica que comparten con las células vegetales [9]. Históricamente, la teoría endosimbiótica de la evolución puede retrotraerse a la hipótesis planteada en el año 1905 por Mereschkowsky, la cual propone que los cloroplastos son formas reducidas de cianobacterias que actúan como “pequeños trabajadores o esclavos verdes” dentro de otra célula. Muchos años más tarde, los análisis filogenéticos, estructurales y bioquímicos confirmaron que un único evento de asociación simbiótica entre una cianobacteria y una célula eucariota mitocondriada, hace 1,2-1,5 mil millones de años, dieron lugar al nacimiento de los plástidos presentes en algas y plantas. El tipo de cianobacteria que dio lugar a los plástidos sigue, aun, siendo investigada [12].

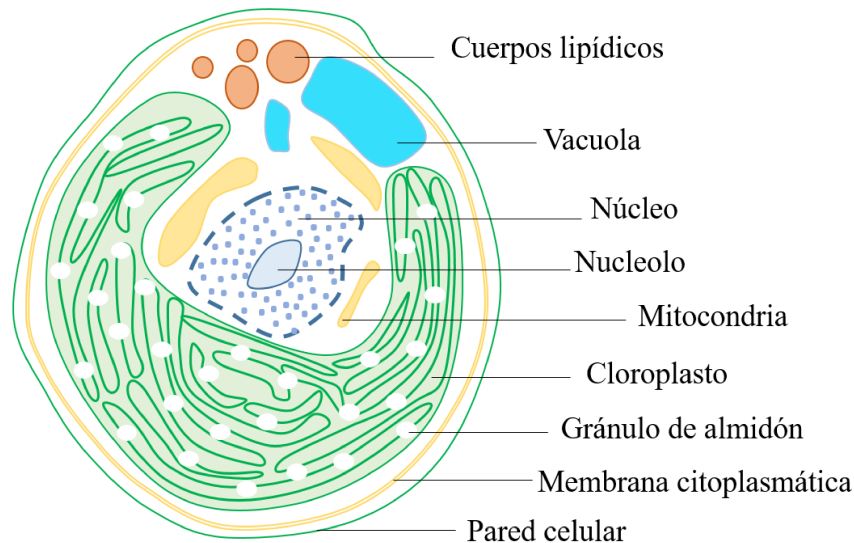


Figura 1. Estructura simplificada de la célula de *Chlorella*

En las células vegetales existen diferentes tipos de plástidos que cumplen funciones específicas y su morfología difiere de acuerdo al tejido donde se encuentren. En los tejidos fotosintéticos son los cloroplastos la unidad estructural donde se agrupan todas las enzimas que permiten realizar la fotosíntesis. Están limitados por dos membranas, una externa y otra interna, más un espacio intermembranoso entre ambas. En el interior del cloroplasto se encuentran los tilacoides, que son sacos aplanados delimitados por una membrana y agrupados formando estructuras a modo de pilas de monedas denominadas *granum*. Estos apilamientos están conectados lateralmente entre sí mediante membranas (ver Figura 2). El espacio interno del cloroplasto no ocupado por los tilacoides se denomina estroma, donde se encuentra el ADN y se llevan a cabo otros procesos de la fotosíntesis.

En las membranas de los tilacoides se sitúan las proteínas y moléculas responsables de realizar una parte de la fotosíntesis (que usa la energía lumínica para realizar la fotólisis del H_2O en el espacio tilacoidal) que da como resultado moléculas biológicas altamente energéticas, ATP y NADPH. Estas moléculas que contienen energía y poder reductor, son utilizadas dentro del mismo plástido para convertir el CO_2 en carbohidratos (triosas-P) que se distribuyen en los distintos compartimentos de las células para ser almacenados en compuestos de reserva (polisacáridos y/o lípidos) o utilizados en los distintos procesos celulares [13, 14] (Figura 2).

Las triosas-P pueden ser convertidas por vías anabólicas en moléculas de reserva tal como almidón o lípidos. En las células de *Chlorella*, la síntesis de almidón ocurre en determinados momentos dentro del mismo cloroplasto, mientras que la síntesis de lípidos ocurre en el citosol [9]. Las

triosas-P también pueden ser exportadas al citosol a través de transportadores específicos localizados en la membrana interna del cloroplasto (co-transportador de triosas-PPi, TTP) y ser utilizados para la síntesis de compuestos carbonados más complejos o en la respiración celular. El TTP posee una masa molecular de 29 kDa y representa entre un 10 y un 15% del total de las proteínas de la envoltura interna del cloroplasto. Si bien realiza el intercambio de triosas-P por Pi, también posee la capacidad de importar 3PGA y exportar triosas-P, permitiéndole al cloroplasto estar en constante comunicación con el citosol [14, 15].

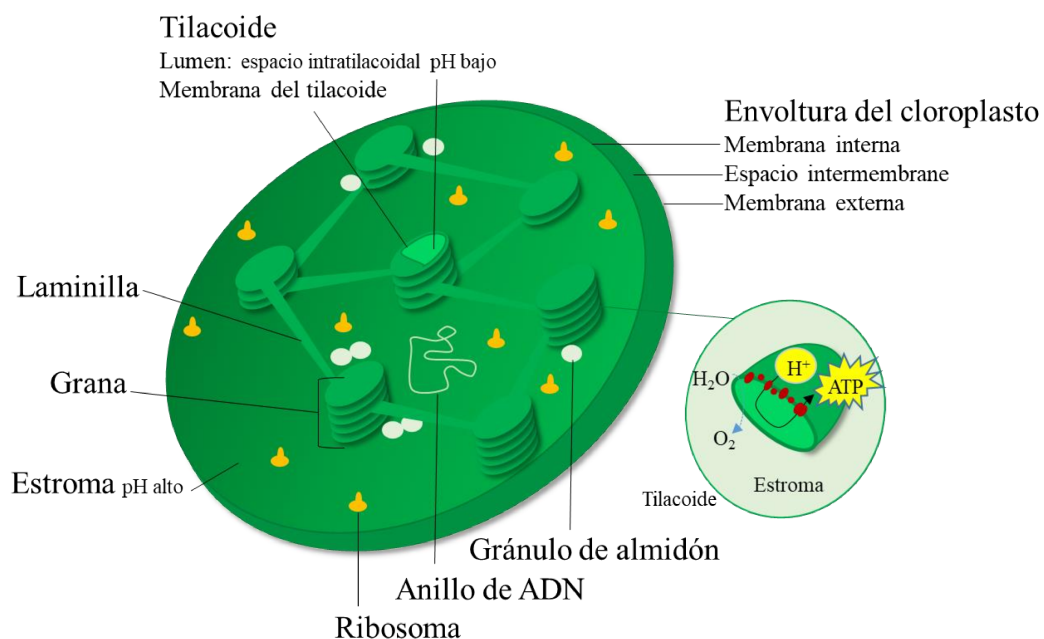


Figura 2. Estructura del cloroplasto

***Nitrosomonas europaea*: célula procariota quimiosintética**

Nitrosomonas europaea es una bacteria quimilitoautótrofa que puede obtener energía a partir de la oxidación del amonio a hidroxilamina y luego a nitrito, en un proceso aeróbico que precisa de oxígeno [16]. Este organismo pertenece a las β -proteobacterias, un grupo del dominio bacteria, el cual se presume como ancestro fotosintético [17] y resulta importante debido a su potencial biotecnológico en la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos alifáticos clorados [18-20]. Además, por ser nitrificante posee la capacidad de descontaminar aguas con alto contenido de amonio, si se crece en conjunto con organismos como *Paracoccus denitrifi* [21]. *N. europaea* es halotolerante y moderadamente halófila y ha sido aislada en aguas residuales, ríos, lagos y suelos fertilizados [22].

Al tratarse de un organismo procariota, *N. europaea* carece de orgánulos delimitados por membranas (Figura 3). En el citosol se pueden apreciar plásmidos (pequeñas moléculas circulares de ADN), que coexisten con el nucleoide y que contienen genes y son comúnmente usados por los procariotas en la conjugación (proceso de transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora). El citosol también contiene vacuolas y ribosomas (utilizados en la síntesis de proteínas) [23, 24].

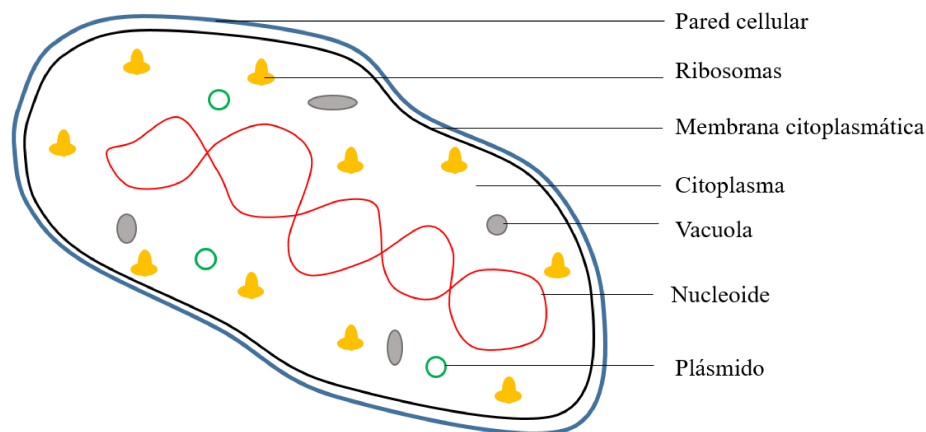


Figura 3. Estructura simplificada de una célula de *Nitrosomonas*.

Nitrosomonas, que es quimioautótrofa, puede fijar CO_2 y sintetizar triosas-P usando la energía que puede conservar durante la oxidación del amonio. En este caso, y a diferencia de *Chlorella*, todas las vías metabólicas se encuentran en el citosol, único compartimento celular. Según estudios genómicos, las triosas-P que resultan de la quimiosíntesis pueden ser metabolizadas para producir hexosas-P por gluconeogénesis o ser usadas para obtener energía y esqueletos carbonados necesarios para el mantenimiento celular a través de la glucólisis y otras vías metabólicas [25].

Procesos acoplados: “la energía no se crea ni se destruye, se transforma”

El nacimiento de la bioquímica, establecido por Eduard Büchner a fines del siglo XIX, deja establecido que las células vivientes están regidas por las leyes de la termodinámica, incluyendo la primera de ellas. Dentro de las células, el catabolismo y el anabolismo, son procesos acoplados. Las reacciones catabólicas liberan y retienen parte de la energía (por ejemplo la glucólisis) al degradar compuestos; mientras que las reacciones anabólicas, en cambio, utilizan esa energía liberada acoplando los procesos para formar nuevos enlaces químicos y construir componentes celulares como proteínas, lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos [7]. *Chlorella* y *N. europaea*, que son

organismos unicelulares muy diferentes, comparten algunas características metabólicas entre sí. Ambos organismos pueden convertir energía física o química en energía biológica y a su vez, pueden adaptar sus vías metabólicas si se cultivan en diferentes condiciones tróficas. Tanto *Chlorella* como *Nitrosomonas* pueden, momentáneamente, seleccionar qué vías metabólicas mantener activas y, si se comparan las células de un mismo tipo celular pero crecidas en diferentes condiciones tróficas, se puede distinguir y comprender las adaptaciones metabólicas que les permiten desarrollarse en cada condición.

Cuando las células crecen en condiciones autotróficas, tienen distinta fuente de obtención de energía pero ambas fijan el CO₂ mediante el ciclo de Benson-Basham-Calvin (BBC) generando triosas-P que pueden utilizar en otros procesos celulares (Figura 4 A y Figura 5). Además, ambos microorganismos pueden crecer basados en un metabolismo heterotrófico (Figura 4 B y Figura 5) ya que pueden activar las vías metabólicas necesarias para degradar moléculas complejas de hidrato de carbono (como glucosa o fructosa) y guardar la energía de este proceso en moléculas ATP y NADH mediante la vía glucólisis y respiración celular [25-27].

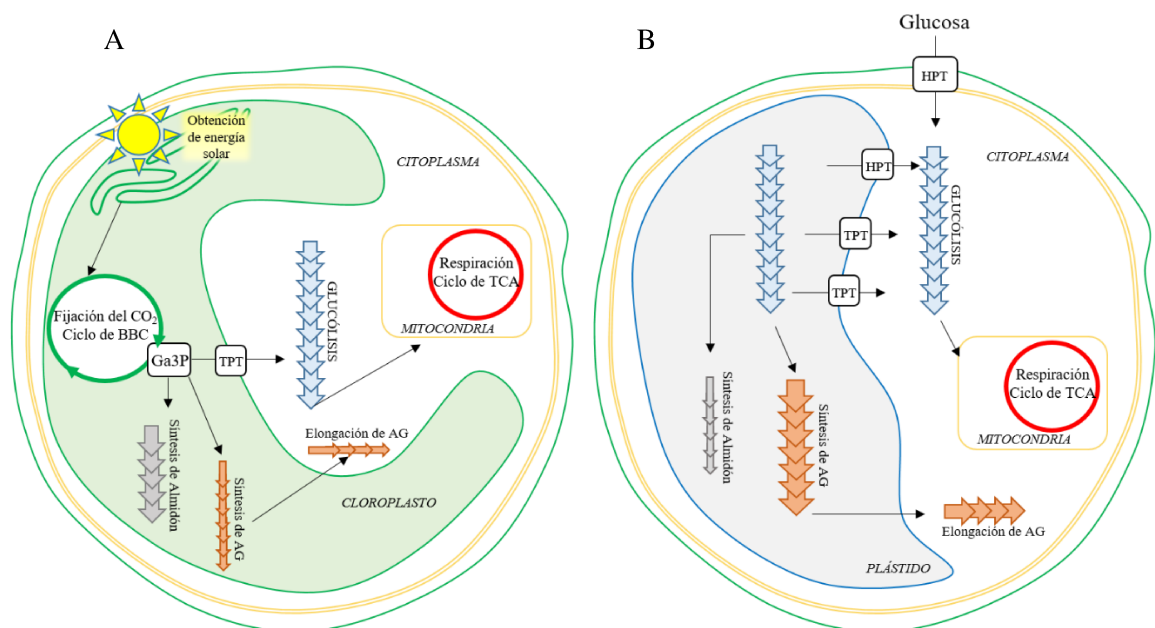


Figura 4. Esquema simplificado de las vías metabólicas involucradas en células: (A) fotosintética de *Chlorella*, y (B) heterotrófica de *Chlorella*. TPT y HPT: son transportadores de triosas y hexosas fosfato. Ga3P: gliceraldehído-3-fosfato. AG: ácido graso.

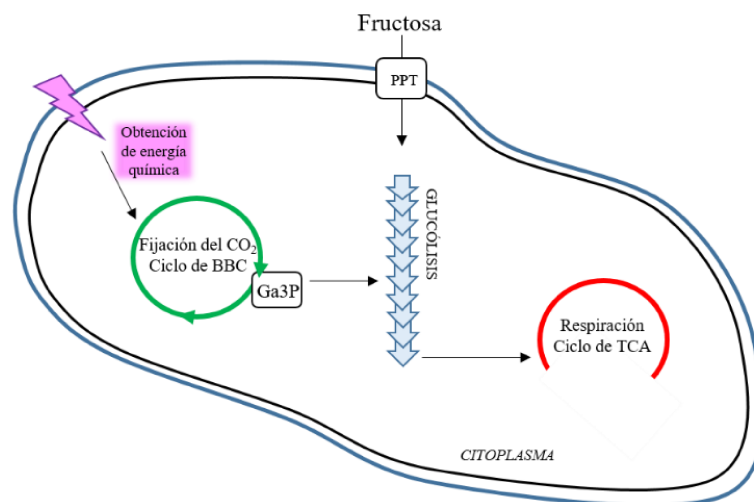


Figura 5. Esquema simplificado de las vías metabólicas involucradas en una célula quimiolitotrófica facultativa de *Nitrosomonas*. Las abreviatura PPT indica un transportador de pentosas fosfato; mientras que Ga3P refiere a gliceraldehído-3-fosfato.

Conversión de energía física o química en energía biológica

Fase luminosa de la fotosíntesis

La fotosíntesis es el proceso por el cual se convierte la energía lumínica en energía química, que permite la fijación del CO₂ atmosférico (inorgánico) en moléculas orgánicas, primariamente de hidratos de carbono [13]. La vida en nuestro planeta se mantiene fundamentalmente gracias a la fotosíntesis que realizan en el medio acuático las algas y las cianobacterias por dos motivos: 1- constituyen la base de la cadena alimenticia de los ambientes acuáticos y 2- como consecuencia de su actividad metabólica mantienen los niveles de O₂ en el aire de la superficie terrestre, permitiendo la vida de los organismos aeróbicos [28].

Hay dos hipótesis principales sobre el origen de la fotosíntesis. Una de ellas sugiere que la misma se originó en un ambiente prebiótico y que fue complementaria al origen de la vida. La otra teoría, basada en evidencias de análisis de filogenética molecular, sugiere que la fotosíntesis evolucionó luego del desarrollo de la capacidad quimiolitotrófica en un ancestro común. Sobre la base de esta última teoría, es ampliamente aceptado que la fotosíntesis tiene un origen bacteriano; incluso hallazgos recientes sugieren que la fotosíntesis oxigénica, presente inicialmente en las cianobacterias, comenzó en el género *Archaea* como una fotosíntesis anoxigénica [29, 30]. A pesar de que continúan presentándose algunas discusiones respecto a cuál fue el origen y cuáles son sus

relaciones evolutivas, es indiscutible que el desarrollo de la fotosíntesis fue uno de los eventos más importantes en la historia de la Tierra, que generó cambios fundamentales en el balance redox terrestre, aumentando sustancialmente los niveles de O₂ desde una atmósfera casi anaeróbica a la que se presenta en la actualidad. Esto permitió el desarrollo del metabolismo aeróbico y de formas de vida mucho más avanzadas.

El proceso fotosintético comprende dos fases: una denominada luminosa y la otra sintética. La fase luminosa, involucra la captura de la energía solar mediante los centros de reacción fotosintéticos para generar ATP y NADPH, moléculas de alto contenido energético y poder reductor, respectivamente. La segunda etapa, llamada comúnmente fase sintética, que será descrita mas adelante, permite fijar el CO₂ atmosférico utilizando las moléculas de alta energía sintetizadas en la etapa luminosa, para sintetizar hidratos de carbono complejos. La fase sintética depende de la fase luminosa, ya que sin las moléculas de alto contenido energético y equivalentes de reducción no es posible asimilar el CO₂ para sintetizar azúcares [31]. La fase luminosa de la fotosíntesis desarrollada en *Chlorella*, como en otros organismos eucariotas fotosintéticos, es un proceso que ocurre en las membranas tilacoides del cloroplasto (Figura 6), lugar donde se encuentran ancladas las proteínas y pigmentos necesarios para convertir la energía lumínica en moléculas de ATP (energía) y NADPH (poder reductor) [13, 14]. La bicapa lipídica de las membranas tilacoides está compuesta por fosfolípidos, galactolípidos, complejos de proteínas y pigmentos como carotenos, quinonas, citocromos y clorofilas [32]. La Figura 6 muestra un modelo de la membrana tilacoide incluyendo los componentes involucrados en el transporte de electrones y en la síntesis de ATP y NADPH.

La mayoría de los procesos químicos que tienen lugar en las reacciones dependientes de luz son llevadas a cabo por complejos proteicos que absorben la energía electromagnética y la utilizan para la transferencia de electrones a través de sus componentes: fotosistema II (FS II), citocromo *b6f*, FS I y ATP sintasa. Estos cuatro complejos integrales de membrana poseen las siguientes funciones: i) el FS II absorbe la energía lumínica y realiza la fotólisis del H₂O, en el proceso libera un protón y produce O₂; ii) el citocromo *b6f* recibe electrones del FS II y los entrega al FS I, también transporta protones adicionales provenientes del estroma al interior del lumen; iii) el FS I utiliza la energía para reducir NADP⁺ a NADPH en el estroma del cloroplasto por acción de la ferredoxina (Fd) y la flavoproteína ferredoxina-NADP reductasa (FNRasa) que están asociadas al FSI; y iv) la ATP sintasa por ultimo utiliza el gradiente electroquímico generado por el desbalance asimétrico de protones y cationes a través de la membrana para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi, conversión que ocurre en el estroma [33].

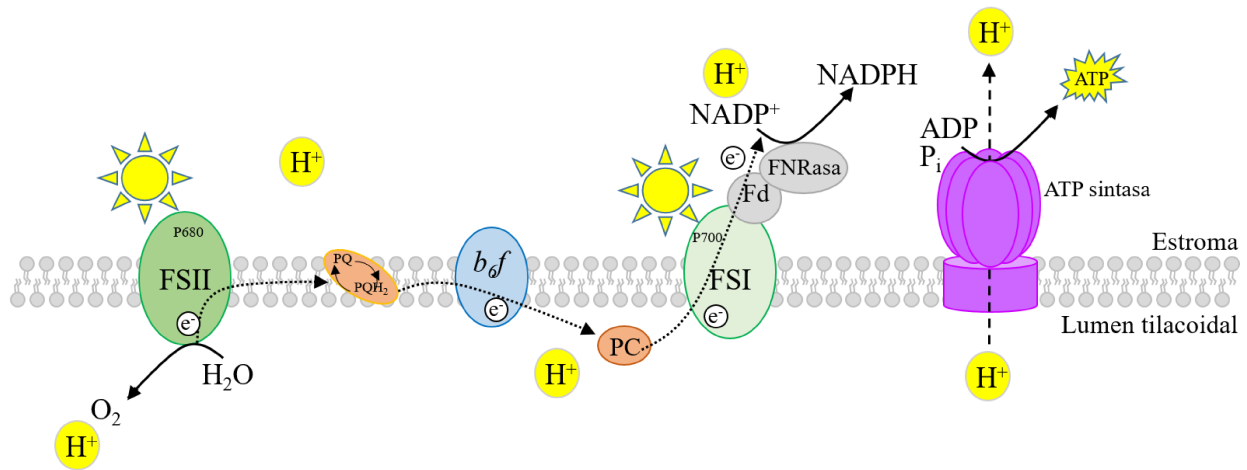


Figura 6. Esquema de la fase luminosa de la fotosíntesis. Se destacan los componentes que participan en la captación de la energía lumínica, la fotólisis del agua, el transporte de electrones hasta el aceptor final (NADP^+) y la síntesis de ATP. FSII: fotosistema II; P680: centro de reacción del FSII; PQ y PQH_2 : plastoquinona en estado oxidado y reducido, respectivamente; b_6f : citocromo; PC: plastocianina; FSI: fotosistema I, P700: centro de reacción de FSI; Fd: ferredoxina y FNRasa: ferredoxina- NADP^+ reductasa. Las flechas en puntos representan la transferencia de los electrones.

Quimiosíntesis

La quimiosíntesis es análoga a la fase luminosa, pero para organismos quimiolitotróficos. Consiste en la síntesis de ATP a partir de la energía que se libera en las reacciones de oxidación de los compuestos inorgánicos reducidos. El primer ecosistema quimiosintético fue descubierto por una expedición realizada en el Alvin, un pequeño submarino de investigaciones de la Institución Oceanográfica de Wood Hole. En esa expedición encontraron que en la grieta entre dos placas tectónicas contiguas existían bacterias capaces de oxidar el sulfato y así obtener la energía necesaria para extraer el CO_2 del agua de mar. Muchas bacterias del fondo de los océanos usan la quimiosíntesis como forma de producir energía ya que la luz solar no alcanza aquel hábitat y solo los organismos de la superficie pueden realizar fotosíntesis [34]. Además, estos microorganismos son la base de la cadena alimenticia del resto de los organismos del suelo oceánico que necesitan de fuentes de carbono y energía orgánica. Jeffrey Steinen, en 1988 publicó que los moluscos del mar negro se alimentaban de bacterias en aguas ricas en azufre, que normalmente serían tóxicas para la vida de otros animales [35].

La quimiosíntesis, aunque usa una fuente de energía diferente, tiene ciertos paralelismos con la fotosíntesis; en ambas se genera ATP y NAD(P)H a partir de una serie de reacciones que

permiten conservar la energía contenida o liberada en las reacciones asociadas a la oxidación de compuestos inorgánicos. Los organismos quimiosintéticos oxidan moléculas inorgánicas reducidas presentes en el medio tales como hidrógeno (H_2), sulfuro de hidrógeno (H_2S), azufre elemental (S), tiosulfato ($S_2O_3^{-2}$), amoníaco (NH_3), nitrito (NO_2^-) e hierro ferroso (Fe^{2+}). Los electrones liberados por estos sustratos ingresan en una cadena transportadora de electrones, análoga a la de la respiración mitocondrial, donde el aceptor final de los electrones es el oxígeno y donde el gradiente electroquímico se aprovecha para realizar la fosforilación oxidativa que genera ATP a partir de ADP y Pi.

La quimiosíntesis en *Nitrosomonas europaea* es un proceso que ocurre entre el periplasma, el citosol y la membrana interna, lugar donde se encuentran ancladas las proteínas necesarias para convertir la energía química en moléculas de ATP (energía) y NADH (poder reductor). La Figura 7 muestra un modelo incluyendo los componentes involucrados en el transporte de electrones y en la síntesis de ATP y NADH: la enzima amonía monooxigenasa (AMO, EC 1.14.99.39) y la hidroxilamina oxidoreductasa (HAO, EC 1.7.99.8), los complejos I, III y IV y la ATP sintasa. Todos los componentes poseen las siguientes funciones: (i) el amonio es oxidado a hidroxilamina por AMO, la cual es oxidada a nitrito por una reacción catalizada por HAO; (ii) los cuatro electrones liberados son transportados a la ubiquinona por medio de los citocromos c554 y c552, siendo dos de los electrones utilizados para mantener estable la actividad de la AMO; y (iii) los dos electrones restantes se transfieren a la síntesis de ATP a través de una cadena de transporte compuesta por los complejos III y IV. Algunos electrones son utilizados para sintetizar NADH a través de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) [25, 36].

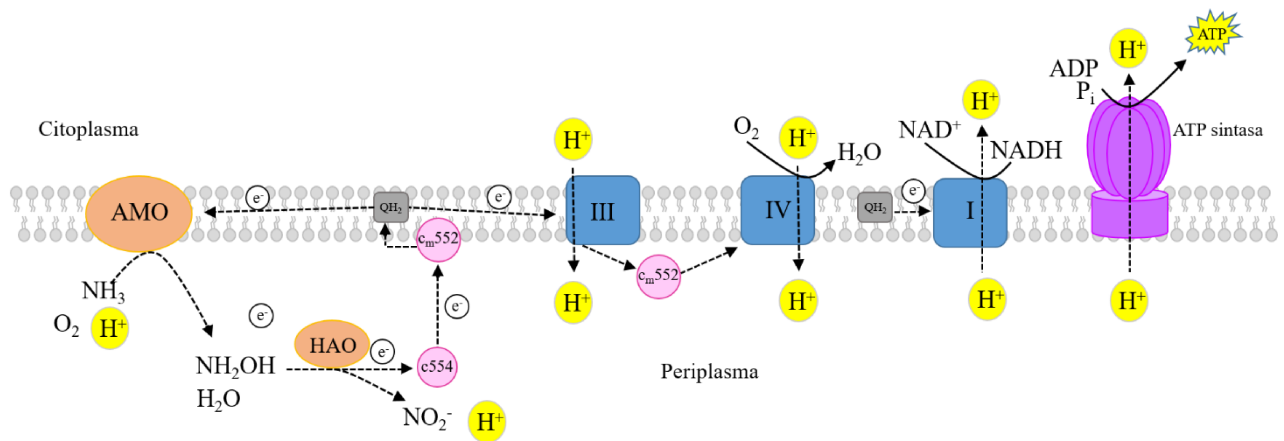


Figura 7. Esquema de la quimiosíntesis en *Nitrosomonas europaea*. Se destacan los componentes que participan en la captación de la energía química, y el transporte de electrones hasta el aceptor final (NADH) y la síntesis de ATP. AMO: amonía monooxigenasa; HAO: hidroxilamina oxidoreductasa; c554 y c552: citocromos; QH₂: ubiquinona reducida; I, III y IV: complejos multienzimático NADH deshidrogenasa, *bc₁* y C. ox, respectivamente. Las flechas en puntos representan la transferencia de los electrones.

Conversión del CO₂ atmosférico en moléculas orgánicas

La fijación del CO₂ ocurre en los organismos vivos mediante el BBC y usa la energía (ATP) y poder reductor (NADPH) provenientes de la conversión de la energía inorgánica mediante la fotosíntesis o quimiosíntesis. Este ciclo ocurre con adaptaciones particulares en cianobacterias, bacterias, algas y plantas superiores [37-41]. La dilucidación del ciclo de fijación del carbono fue un logro significativo para la biología, haciéndolos a Benson, Basham y Calvin merecedores del Premio Nobel de Química en el año 1961 [42]. De hecho, el BBC fue la primera vía metabólica dilucidada (durante la década de 1940) enteramente con el uso de ¹⁴C, isótopo radioactivo de larga vida media descubierto por entonces. Luego, los estudios continuaron enfocándose en la caracterización de cada una de las enzimas involucradas y en su regulación para entender su funcionamiento en conjunto.

El ciclo de BBC puede describirse de manera global como la fijación de tres moléculas de CO₂ y la incorporación de una molécula de ortofosfato (Pi) en una molécula de azúcar de tres carbonos, formando triosa-P. Las triosas-P, específicamente dihidroxiacetona-P (DHAP) y Ga3P, son las moléculas que luego se reparten entre las distintas vías metabólicas para suplir las demandas energéticas de los distintos procesos celulares. En el caso de células eucariotas, las triosas-P pueden ser exportadas hacia el citosol o retenidas dentro del cloroplasto para ser utilizadas en la biosíntesis

de almidón o en la regeneración de la ribulosa-1,5-bisfosfato (Rul-1,5-bisP, aceptor del CO₂) por sucesivas reacciones del propio BBC.

En los organismos eucariotas, las reacciones del BBC ocurren en el estroma del cloroplasto, mientras que en los organismos procariotas ocurren en el citosol y en ambos casos comprende 13 reacciones catalizadas por 11 enzimas (Figura 8) que podrían considerarse agrupadas en tres fases a modo descriptivo:

(i) *Fijación*: adición de una molécula de CO₂ a la Rul-1,5-bisP, generando dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA)

(ii) *Reducción*: reducción de las dos moléculas de 3PGA a Ga3P utilizando las moléculas de ATP y NAD(P)H (dependiendo el organismo puede ser NADPH o NADH) generadas sintéticamente en la etapa luminosa o química.

(iii) *Regeneración*: el aceptor primario, la Rul-1,5-bisP es regenerada a partir de las triosas-P, por lo cual cinco moléculas de triosa-P son re-arregladas en tres moléculas de cinco carbonos en un proceso que consume ATP para producir la Rul-1,5-bisP.

Todas estas fases requieren que por cada molécula de CO₂ fijada mediante el BBC se consuman tres moléculas de ATP y dos de NAD(P)H provenientes de la fase luminosa de la fotosíntesis o de la quimiosíntesis. El análisis global del ciclo indica que hay una ganancia neta de carbono y que por cada tres moléculas de CO₂ que ingresan al BBC, se gana una de triosa-P que puede ser utilizada en otras vías metabólicas ya que el ciclo es autocatalítico y puede generar más aceptor de CO₂ del que consume [43]. La puesta en evidencia de que el aceptor de CO₂ es la Rul-1,5-bisP llevó al descubrimiento de la enzima que cataliza dicha reacción, la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO, EC 4.1.1.39), la cual puede representar el 50% de las proteínas solubles en las células verdes de vegetales [44].

La Figura 8 muestra un esquema donde se indican las enzimas que participan de cada fase del ciclo de BBC. (i) La etapa de fijación está catalizada por la RuBisCO (EC 4.1.1.39) que incorpora una molécula de CO₂ a la Rul-1,5-bisP generando dos moléculas de 3PGA. (ii) En la fase de reducción, el 3PGA es reducido a Ga3P por la acción de una quinasa específica (3PGKasa, EC 2.7.2.3) y la Ga3P deshidrogenasa (Ga3PDHasa, EC 1.2.1.13) fosforilante dependiente de NADP⁺; la triosa-P isomerasa (TPIasa, EC 5.3.1.1) luego interconvierte Ga3P en DHAP. (iii) En la etapa de regeneración: se regenera la Rul-1,5-bisP en una combinación de varias reacciones. La fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (Fru-1,6-bisP, EC 4.1.2.13) convierte DHAP/Ga3P en Fru-1,6-bisP y la sedoheptulosa-bisP aldolasa convierte DHAP y eritrosa-4P en sedoheptulosa-1,7-bisP. Las enzimas

Fru-1,6-bisP fosfatasa (EC 3.1.3.11) y la sedoheptulosa-bisP fosfatasa (EC 3.1.3.37) convierten a los bisfosfatos en Fru-6P y sedoheptulosa-7P. La interconversión de las pentosas-P es luego catalizada por la Rib-P isomerasa (EC 5.3.1.6) y la Rul-5P 3-epimerasa. Finalmente, la Ril-5P quinasa (EC 2.7.1.19) cataliza la fosforilación dependiente de ATP de la Rul-5P para regenerar Rul-7,1,5-bisP[5, 42]. El ciclo puede considerarse como una lanzadera de azúcares-P, en donde cinco moléculas de C3 son convertidas en tres moléculas de C5. Una de las moléculas de triosa-P, derivada de la incorporación de tres moléculas de CO₂ mediada por la RuBisCO, puede ser destinada para la síntesis de productos.

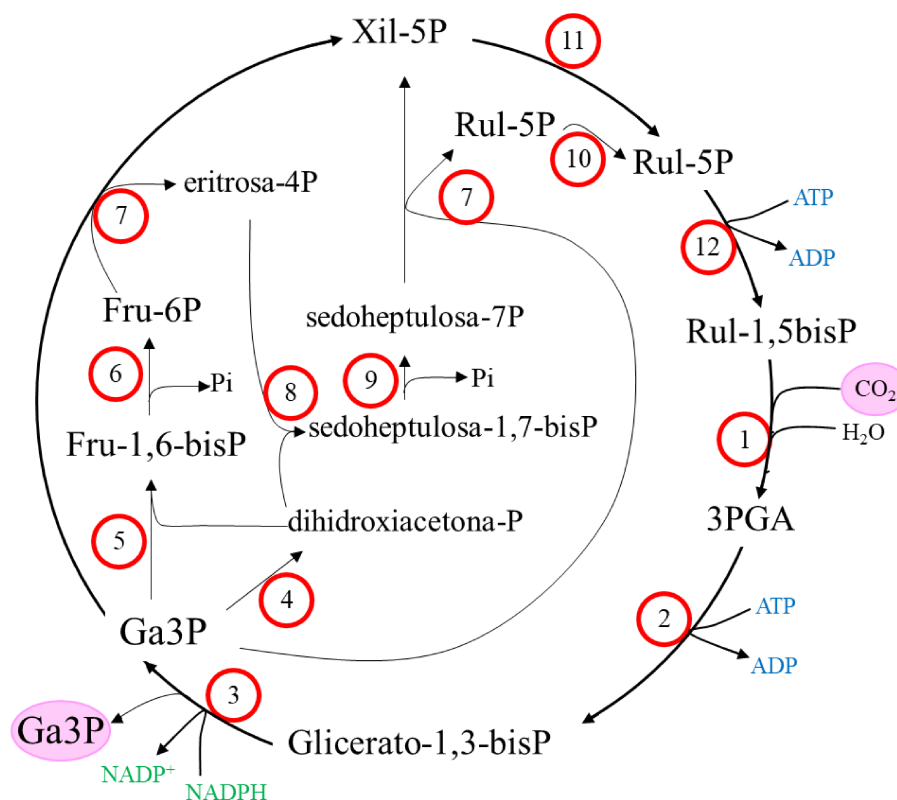


Figura 8. Representación esquemática del BBC

Metabolismo de los hidratos de carbono

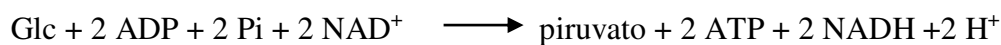
Las triosas-P sintetizadas por fijación del CO₂ pueden ser utilizadas por las células para sintetizar moléculas de hexosa-P mediante la gluconeogénesis o ser oxidadas mediante la vía glucolítica para obtener la energía contenida en sus enlaces en el citosol. Cuando una molécula pierde un electrón, se oxida y libera energía. Cuando los seres vivos oxidan los hidratos de carbono, convierten los enlaces carbono-carbono (C-C) y carbono-hidrógeno (C-H) en enlaces carbono-oxígeno (C-O) e

hidrógeno-oxígeno (H-O) y los electrones se conservan en átomos de oxígeno. De esta forma, la energía libre no se disipa al azar y puede ser conservada para convertir ADP en ATP [5-7].

Considerando que las triosas-P ingresan en pasos intermedios de la vía glucolítica, la descripción de la misma se va a realizar considerando la glucosa (Glc) como el metabolito de inicio de la ruta. La oxidación completa de la Glc en los seres vivos, se desarrolla en dos etapas principales: (I) la glucólisis, que ocurre en el citosol y (II) la respiración, que consiste en el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y la cadena de transporte de electrones, que tiene lugar dentro de la mitocondria (en eucariotas) o en el citosol (en procariotas).

Glucólisis

La glucólisis clásica (Figura 9), que ocurre en el citosol de la gran mayoría de los organismos, es una secuencia lineal de 10 reacciones que degrada una molécula de Glc para generar dos de piruvato, además de 2 moléculas de ATP y NADH; según la reacción global:



La Glc ingresa a la vía glucolítica mediante una reacción de fosforilación catalizada por la hexoquinasa (EC 2.7.1.1), que genera Glc6P y que utiliza una molécula de ATP como grupo dador de fosfato. Posteriormente, la Glc6P es convertida en Fru6P mediante la fosfoglucoisomerasa (EC 5.3.1.9). Esta reacción es seguida por la fosforilación de la Fru6P en el carbono-1 para generar Fru1,6bisP, mediante una reacción catalizada por la fosfofructoquinasa (PFKasa, EC 2.7.1.11) dependiente de ATP. La Fru1,6bisP continúa la vía glucolítica mediante su separación en dos moléculas de triosa-P, una de Ga3P y otra de DHAP, en una reacción catalizada por la aldolasa. El Ga3P y la DHAP son interconvertidos por la enzima TPIasa, continuando la glucólisis con la oxidación acoplada a fosforólisis del Ga3P a 1,3bisfosfoglicerato (1,3bisPGA), mediante la reacción catalizada por la Ga3PDHasa fosforilante dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.12).

El 1,3bisPGA generado por fosforólisis a expensas de Pi en la reacción de la Ga3PDHasa fosforilante, contiene un enlace fosfato de alto contenido energético en la posición 1. Este anhídrido de ácidos carboxílico y fosfórico resulta de alta energía y el grupo fosfato puede generar ATP en una reacción posterior de fosforilación a nivel de sustrato, con el ADP, catalizada por la PGKasa, dejando como producto 3PGA. Puesto que se forman dos moléculas de triosa-P por cada molécula de Glc que experimenta la glucólisis, en esta etapa se generan dos moléculas de ATP por molécula de Glc. El 3PGA que proviene de las reacciones anteriores, es convertido en 2-fosfoglicerato (2PGA) por la fosfogliceromutasa (EC 5.4.2.1). El paso siguiente es catalizado por la enolasa

(EC 4.2.1.11) e implica una deshidratación y redistribución de la energía dentro de la molécula, lo cual eleva el fosfato de la posición dos al estado de alta energía, formándose así fosfoenolpiruvato (PEP). El fosfato de alta energía del PEP es transferido al ADP por la piruvato quinasa (PKasa, EC 2.7.1.40) para generar en este estadio dos moléculas más de ATP por molécula de Glc oxidada, generándose piruvato como producto. El piruvato puede ser transportado a las mitocondrias como fuente de carbono y energía para las reacciones de respiración y biosíntesis [5, 7].

Pasos alternativos de la vía glucolítica

En organismos fotosintéticos la vía glucolítica citosólica es una red compleja, que presenta reacciones enzimáticas paralelas a nivel de varios intermediarios (Figura 9) [14, 45-47]. Alrededor de 1980 comenzó a esclarecerse la ocurrencia de enzimas que catalizan reacciones alternativas de ciertos pasos de la vía de glucólisis citosólica en organismos fotosintéticos superiores [48]. Más tarde se encontró que ocurren también en otros organismos fotosintéticos y no fotosintéticos, incluyendo bacterias y protozoos. Se ha propuesto que estas enzimas alternativas podrían tener una función relevante cuando las células vegetales se encuentran bajo condiciones de estrés metabólico, tales como anoxia o depleción de Pi [45].

Una de esas reacciones paralelas involucra a la Fru6P, pudiendo esta ser convertida a Fru1,6bisP mediante la PFKasa clásica dependiente de ATP, o mediante la fosfofructoquinasa dependiente de PPI (PFPasa, EC 2.7.1.90) (ver Figura 9). Esta enzima de organismos fotosintéticos, descubierta en 1979, que cataliza una reacción reversible que se encuentra cercana al equilibrio *in vivo*, utiliza PPI como dador del grupo fosfato en lugar de ATP [45]. Esta última característica tiene importancia en la conservación de energía y se vuelve especialmente relevante bajo condiciones de depleción de Pi. En esta situación hay un rápido y drástico descenso en las concentraciones de nucleótidos de adenina (ATP/ADP/AMP) lo cual se vuelve un factor limitante para el metabolismo, mientras que los niveles de PPI se mantienen marcadamente invariables ante esta situación y tienden a ser constantes, independientemente del estado metabólico celular [47]. La PFPasa es marcadamente activada por niveles micromolares de Fru2,6bisP y plantea una bifurcación crítica del paso catalizado por la PFKasa que es altamente regulado [45]. Desde su descubrimiento, los numerosos estudios realizados con la PFPasa han llevado a la idea de que podría considerársela como una enzima involucrada fundamentalmente en la glucólisis en lugar de la gluconeogénesis, siendo capaz de dar a la planta la flexibilidad de adaptar su metabolismo a situaciones de estrés [47] [49].

Como se observa en la Figura 9, otro paso de la vía glucolítica que presenta alternativas en organismos fotosintéticos involucra al Ga3P, el cual puede ser convertido a 3PGA mediante dos

caminos distintos. Siguiendo la vía clásica actúan dos enzimas, la Ga3PDHasa dependiente de NAD^+ que convierte el Ga3P, utilizando Pi y generando NADH, en 1,3bisPGA, el cual es luego convertido a 3PGA mediante la enzima PGKasa en una reacción que genera una molécula de ATP. Estas reacciones representan etapas clave de la vía glucolítica, ya que en la primera se genera un enlace de alto contenido energético a partir de Pi, lo que permite el paso posterior donde se produce la fosforilación a nivel de sustrato con conservación de la energía por síntesis de ATP [50]. El otro camino presente en el citosol de las células vegetales para la utilización del Ga3P involucra a la enzima Ga3P deshidrogenasa no-fosforilante, dependiente de NADP^+ (np-Ga3PDHasa, EC 1.2.1.9), que cataliza la hidrólisis irreversible del Ga3P a 3PGA generando NADPH [47]. Esta bifurcación resulta muy importante en tejidos fotosintéticos, ya que durante el día las triosas-P resultantes de la actividad fotosintética pueden ser exportadas desde el cloroplasto hacia el citosol. Allí su destino es la oxidación mediante alguna de las enzimas con actividad de Ga3PDHasa: para generar ATP y NADH mediante la vía acoplada, o para generar NADPH si dicha oxidación es catalizada por la np-Ga3PDHasa. De esta forma, se establece un sistema enzimático que permite la explotación indirecta (vía triosas-P) del ATP y el NADPH generados por fotosíntesis en el cloroplasto hacia el citosol.

Según cual sea el camino seguido por las triosas-P, la célula podrá obtener diferentes formas de energía (Figura 9), esto dependerá de las necesidades metabólicas transitorias de la célula [51]. Estudios de inmunodetección y de ensayos de actividad han establecido que, *in vivo*, los niveles de np-Ga3PDHasa experimentan un aumento relativo en condiciones de estrés oxidativo [52]. Se ha propuesto que esta enzima participa en los tejidos fotosintéticos de un sistema de transporte del NADPH fotosintéticamente generado desde el cloroplasto al citosol [53], aun cuando esto implica resignar el paso de síntesis de ATP. Se ha demostrado que, en tejidos heterotróficos de trigo, la np-Ga3PDHasa está sujeta a un delicado mecanismo de regulación que involucra su fosforilación y posterior unión a proteínas regulatorias del tipo 14-3-3, modificación que produce una disminución de la actividad de la enzima [54, 55]. Estos hallazgos no hacen más que enfatizar la importancia de esta enzima en los procesos metabólicos centrales [47].

El último de los intermediarios glucolíticos que posee rutas alternativas para su metabolismo es el PEP (Figura 9). El PEP, que se encuentra en la posición más alta en la escala termodinámica de los metabolitos fosforilados hasta ahora conocidos, ocupa un rol central en el metabolismo citosólico de los organismos fotosintéticos, situándose en un punto clave de bifurcación y comportándose, además, como molécula regulatoria de un número importante de procesos metabólicos primarios y secundarios [45]. El PEP es convertido en la vía glucolítica clásica a piruvato por la enzima PKasa, que es la segunda reacción de la vía glucolítica que permite conservar la energía del enlace fosfato.

El piruvato es luego metabolizado en la mitocondria. En el citosol de las células vegetales el PEP puede ser utilizado también por la enzima PEP carboxilasa (PEPCasa, EC 4.1.1.13), que cataliza la síntesis de de ácido oxalacético (OAA) a partir de PEP y bicarbonato. El OAA producido es convertido luego a malato mediante una reacción catalizada por la enzima malato deshidrogenasa (MDHasa, EC 1.1.1.37) dependiente de NAD^+ , pudiendo el malato ser transportado a la mitocondria o plástido, donde es utilizado en vías metabólicas biosintéticas al ser convertido a piruvato por la enzima málica (ME) dependiente de NAD^+ (EC 1.1.1.39) o de NADP^+ (EC 1.1.1.40), respectivamente [47].

El cortocircuito glucolítico del paso catalizado por la PKasa, generado por el conjunto PEPCasa-MDHasa-ME es importante durante la depleción nutricional de Pi, cuando la actividad de la PKasa se encuentra limitada por las bajas concentraciones de ADP [45]. De hecho, se ha demostrado que la PEPCasa es inducida en respuesta a situaciones de estrés tales como depleción de Pi y estrés por frío [47]. Hay otras dos enzimas que pueden competir por el PEP citosólico, una de ellas es la PEP fosfatasa (PEPasa, EC 3.1.3.60), presente en la vacuola, que lo desfosforila para convertirlo también en piruvato y Pi, produciendo una molécula de ATP menos. La otra enzima que puede utilizar el PEP es la PEP-carboxiquinasa (PEPCKasa, EC 4.1.1.49), enzima que a pesar de catalizar una reacción reversible, está probablemente más relacionada a la gluconeogénesis que a la glucólisis [47].

Dado que estas bifurcaciones de la vía glucolítica plantean la utilización y competencia de dos (o más) enzimas por un mismo sustrato en cada punto, es de esperar que las enzimas involucradas en ramificaciones se encuentren altamente reguladas, a fin de poder coordinar la vía glucolítica y los productos que pueden surgir de ella. Uno de los desafíos más recientes en el estudio de la glucólisis de ha sido, justamente, el estudio de las respectivas funciones, la forma de regulación y la importancia de cada vía, a fin de dilucidar en qué momentos los metabolitos cursan una, otra, o ambas vías alternativas [45]. A pesar de esta interesante flexibilidad de la vía glucolítica citosólica, hay pocos estudios que logren discernir la regulación diferencial o conjunta de enzimas paralelas, ya sea a nivel de expresión de los genes correspondientes, regulaciones alostéricas y modificaciones post-traduccionales, mecanismos que han sido ampliamente estudiados en las isoformas cloroplastídicas.

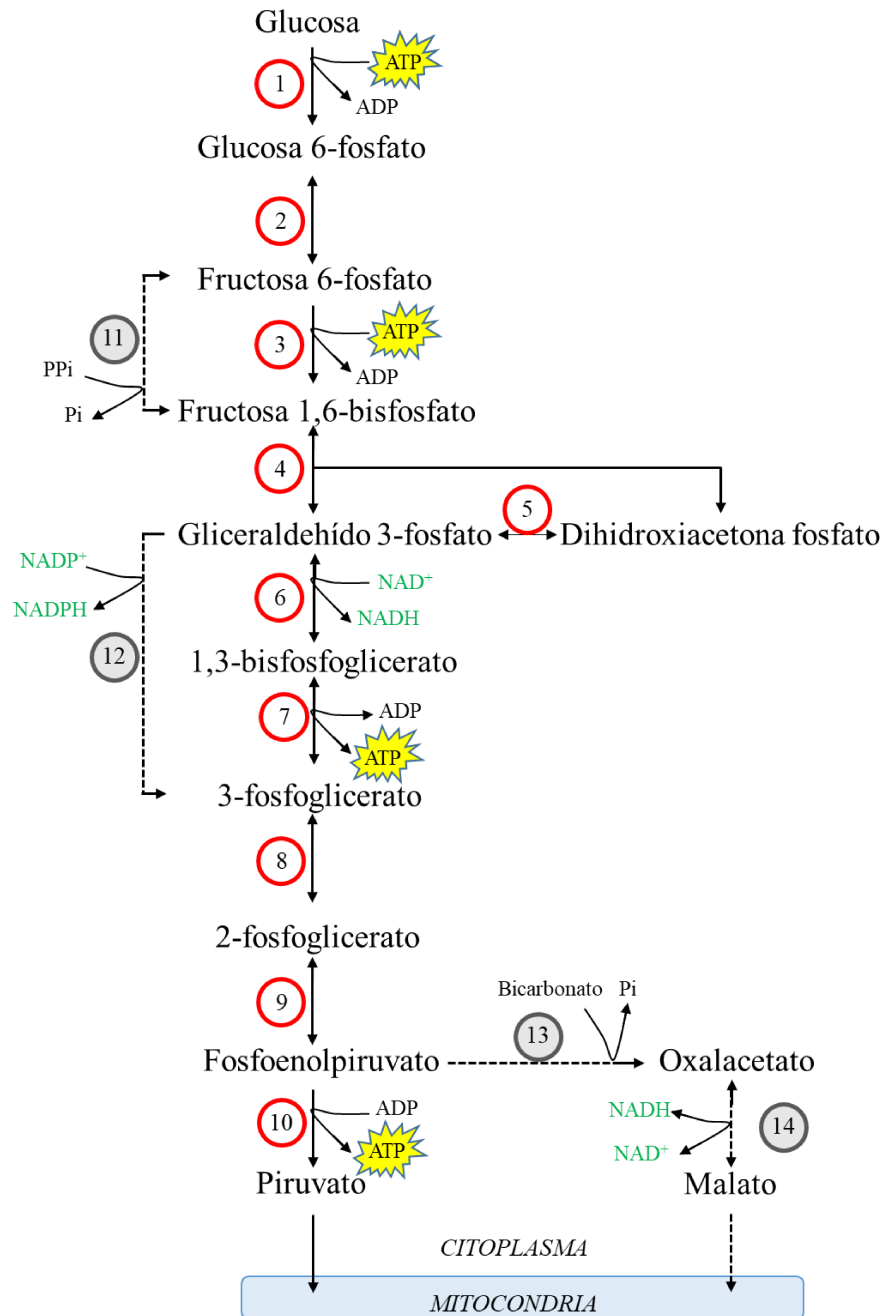


Figura 9. Descripción general de la vía glucolítica. En la figura se muestran los distintos pasos de la glucólisis clásica (flechas sólidas) y las rutas alternativas de células vegetales (flechas de puntos). Los círculos en colores indican: (rojo) Enzimas que participan de la glucólisis clásica; (gris) Enzimas que, en plantas, participan de rutas alternativas de la glucólisis clásica. Los números indican: (1) Hexoquinasa; (2) Fosfoglucoisomerasa, (3) PFKasa; (4) Aldolasa; (5) TPIasa; (6) Ga3PDHasa dependiente de NAD⁺; (7) PGKasa; (8) Fosfogliceromutasa; (9) Enolasa; (10) PKasa; (11) PFPasa; (12) np-Ga3PDHasa; (13) PEPCKasa; (14) MDHasa. Las flechas indican que a nivel fisiológico, las reacciones enzimáticas son: (→) irreversibles o (↔) reversibles. Traducido y detallado a partir de Plaxton, 1996 [45].

Ciclo del TCA

En presencia de oxígeno, la siguiente etapa de la degradación de los productos de la glucólisis implica la oxidación progresiva del piruvato a CO_2 y agua. Esta etapa está mediada por un grupo de compuestos y enzimas que componen el ciclo del TCA. Su nombre deriva del ácido cítrico y otros ácidos tricarboxílicos que son intermediarios del metabolismo. Los componentes y reacciones del ciclo del TCA fueron establecidos en la década de 1930 por la investigación del premio Nobel Albert Szent-Györgyi, por la que recibió el Premio Nobel en 1937, específicamente por sus descubrimientos relacionados con el ácido fumárico, un componente clave de esta ruta metabólica. El ciclo del ácido cítrico fue finalmente identificado en 1937 por Hans Adolf Krebs, en la universidad de Sheffield, por lo que recibió el Premio Nobel de Medicina en 1953 y es por esto que también se lo conoce como ciclo de Krebs [56].

Por lo tanto, el catabolismo de la Glc y lípidos (a través de la glucólisis y la beta oxidación), produce acetil-CoA, un grupo acetilo enlazado a la coenzima A. El acetil-CoA constituye el principal sustrato del ciclo. Su entrada consiste en una condensación con el oxalacetato, al generar citrato. Este ciclo también es importante porque proporciona precursores para la síntesis de ciertos aminoácidos, por ello se lo considera una vía anfibólica, es decir, catabólica y anabólica al mismo tiempo [5, 7].

Las reacciones del ciclo de TCA son llevadas a cabo por 8 enzimas diferentes (Figura 10):

- la citrato sintasa (EC. 2.3.3.1) cataliza la reacción entre el acetil-CoA y el oxalacetato. En el proceso, el grupo tioéster (CoA) se hidroliza y la energía que esto libera es aprovechada a la formación de la molécula de citrato. Esta reacción recibe el nombre de condensación.

- la aconitasa (EC. 4.2.1.3) cataliza la isomerización del citrato a isocitrato, por la formación de cis-aconitato.

- la isocitrato deshidrogenasa (EC. 1.1.1.42) cataliza la oxidación del isocitrato a α -cetoglutarato. En esta reacción de descarboxilación oxidativa se genera una molécula de NADH y se libera una de CO_2 .

- la α -cetoglutarato deshidrogenasa (EC. 1.2.4.2), conocida también como oxoglutarato deshidrogenasa, está compuesta de tres enzimas diferentes: E1, cetoglutarato deshidrogenasa; E2, transuccinilasa; y E3 dihidrolipoamida deshidrogenasa. El sistema cataliza una segunda reacción de descarboxilación oxidativa que lleva a la formación del succinil CoA, generando CO_2 , CoA-SH y NADH.

- la succinil-CoA sintetasa (EC. 6.2.1.4) cataliza la única reacción del ciclo que produce fosforilación a nivel de sustrato. La reacción genera succinato y GTP que, esencialmente en este ciclo, tiene la función de trasladar grupos fosfatos hacia el ATP y la CoA-SH, que vuelve a ser utilizada para generar acetil-CoA a partir de piruvato.

- la succinato deshidrogenasa (EC. 1.3.5.1) es la única enzima del ciclo que tiene como aceptor de hidrógeno una molécula de FAD en vez de NAD^+ (encargada de transportar los electrones hacia la cadena de electrones). La enzima cataliza una reacción de oxidación que genera fumarato.

- la fumarasa (EC. 4.2.1.2) cataliza la hidratación del fumarato, generando de esta manera, L-malato.

- la malato deshidrogenasa (EC. 1.1.1.37) cataliza la última reacción que completa el ciclo. Esta reacción de síntesis del oxalacetato genera una molécula de NADH.

Los cofactores reducidos, NADH y FADH_2 generados en el ciclo, se comportan como intermediarios óxido/reductores. Transportan electrones a hasta la cadena respiratoria mitocondrial. En tal cadena se reoxidan a NAD^+ y a FAD, cediendo los electrones para alcanzar el acople energético quimiosmótico que permite la fosforilación de ADP para generar ATP.

Por lo tanto, la energía derivada de la ruptura completa de una molécula de Glc por los tres estadios de glucólisis, ciclo de Krebs y cadena de transporte de electrones, es óptimamente conservada en la síntesis de 36 moléculas de ATP. En realidad son 38 las moléculas netas de ATP que se producen en el proceso, pero dos de ellas se consumen para transportar (mediante transporte activo), desde el citosol a la matriz mitocondrial, las dos moléculas de $\text{NADH} + \text{H}^+$ producidas en la glucólisis.

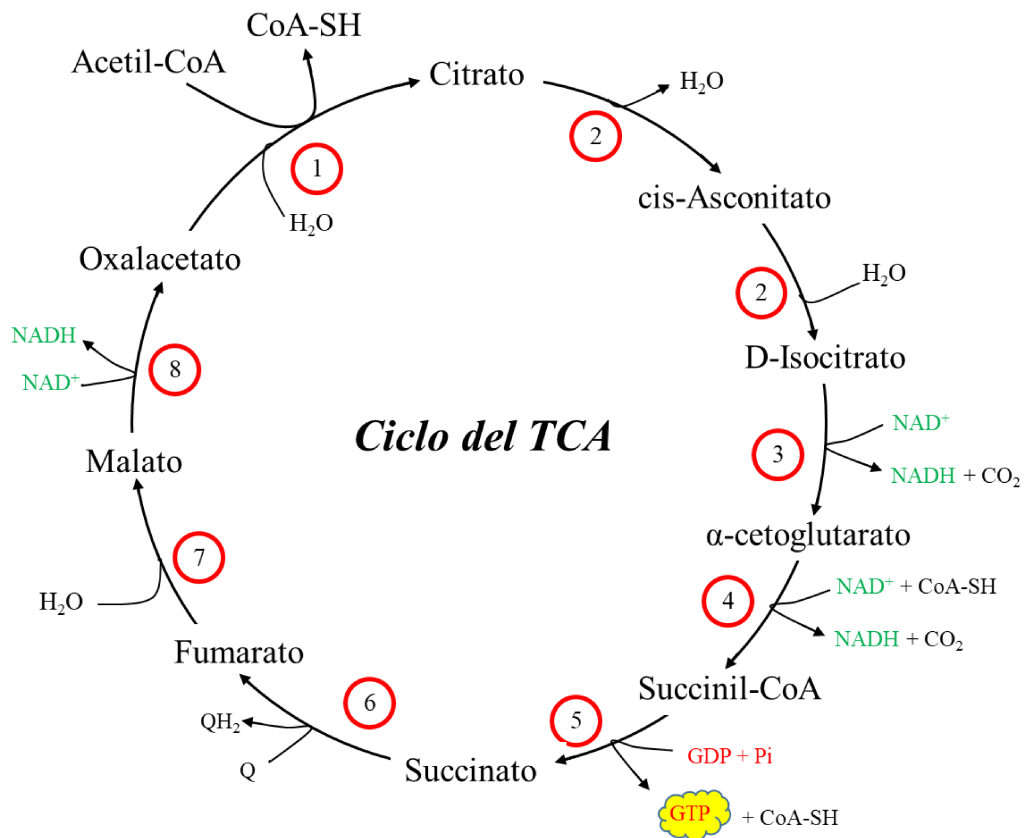


Figura 10. Descripción general del ciclo del TCA. Los números indican: (1) Citrato sintasa; (2) Aconitasa, (3) Isocitrato deshidrogenasa; (4) α-cetoglutarato deshidrogenasa; (5) Succinil-CoA sintasa; (6) Succinato deshidrogenasa; (7) Fumarasa; (8) Malato deshidrogenasa.

En el contexto metabólico arriba planteado, resulta de relevancia la caracterización cinética, estructural y regulatoria de las enzimas que están involucradas en pasos críticos para el uso y generación de equivalente energéticos y de reducción. De particular relevancia es, en tal sentido, el estudio comparativo de enzimas que catalizan reacciones alternativas, así como de aquellas que determinan los flujos metabólicos en los procesos de asimilación del carbono en células autotróficas y heterotróficas. Esta temática es central en el abordaje experimental de la presente Tesis, que involucra la identificación estructural y funcional de enzimas en células del alga verde fotosintética *Chlorella* sp. y de la bacteria quimiolitautotrófica *Nitrosomonas europaea*.

OBJETIVOS

Objetivo general

En este trabajo de tesis se plantea alcanzar dos objetivos generales. Por un lado se indagará para alcanzar una mejor comprensión de la relación metabolismo-partición-acumulación del carbono en forma de almidón y/o ácidos grasos y las condiciones de cultivo en algas verdes unicelulares, en forma comparativa con diferentes tejidos de plantas superiores. Para alcanzar dicho objetivo se trabajará con células provenientes de diferentes condiciones tróficas y se estudiarán enzimas claves de las vías metabólicas relacionadas a la utilización-partición del carbono y las involucradas en la síntesis de compuestos de reserva. Principalmente, se trabajará con *Chlorella* spp., que serán cultivadas en condiciones auto- y hetero-tróficas. Con las células resultantes, se evaluará la acumulación de reservas (hidratos de carbono y lípidos), se analizará el perfil de proteínas y la actividad de enzimas puntuales pertenecientes a vías metabólicas como la glucólisis, la síntesis de almidón y la síntesis de triacilglicéridos. De esta forma se busca obtener un mayor entendimiento del flujo del carbono y la energía en células con diferentes características tróficas. Asimismo, se realizará el estudio molecular, cinético y regulatorio de enzimas claves de las vías metabólicas antes mencionadas en *Chlorella* spp., producidas en forma recombinante en *Escherichia coli*. Además, se utilizarán herramientas de ingeniería genética para modificar las vías metabólicas en algas verdes unicelulares. Las cepas genéticamente modificadas se crecerán en condiciones de cultivo auto- y hetero-trófico. Se analizará si hay cambios en la cantidad, tipo y relación entre el carbono acumulado en forma de almidón y/o ácidos grasos.

Por otro lado, y con el fin de tener un panorama más amplio acerca de los organismos autotrófos, estudiaremos las enzimas involucradas en el metabolismo del carbono de *Nitrosomonas europaea*. Esta bacteria nitrificadora tiene un metabolismo quimiolitotrófico que le permite fijar el CO₂ y convertirlo en compuestos orgánicos mediante ciclos y vías metabólicas similares a las descritas en organismos fotosintéticos.

Objetivos particulares

I-Establecer condiciones de cultivo autotróficas y heterotróficas para *Chlorella* sp., determinando el perfil de acumulación de reservas en cada condición.

II-Estudiar enzimas claves del metabolismo del carbono en *Chlorella* sp. y *Nitrosomonas europaea*, así como en tejidos vegetales con diferentes características tróficas tanto *in vivo* como *in vitro*.

III-Establecer tecnologías de transformación para generar cepas de *Chlorella* sp. genéticamente modificadas a fin de disminuir o aumentar la expresión de los genes en estudio.

Capítulo 1: *Chlorella* spp.

Introducción

“Phycologists regard any organisms with chlorophyll a and a thallus not differentiated into roots, stem and leaves to be an alga” Lee, 1989.

Las microalgas constituyen un grupo extremadamente heterogéneo de microorganismos procariotas y eucariotas que pueden crecer rápidamente dada su estructura celular sencilla -unicelular o multicelular simple- [9]. Tradicionalmente, las algas se han clasificado de acuerdo con su color y esta característica sigue siendo la más importante. Actualmente, las algas se clasifican según los siguientes criterios principales: tipos de pigmentos, naturaleza química de los productos de almacenamiento y componentes de la pared celular. Además, hay criterios que toman en consideración características citológicas y morfológicas: aparición de células flageladas, estructura de los flagelos, esquema y trayectoria de la división nuclear y celular, así como número y composición de las membranas del cloroplasto [9] [10].

La mayoría de las microalgas son de color verde por la presencia de las clorofilas, pero algunas son de color marrón o rojas por la presencia de xantófilas que enmascaran el color verde [9] [34]. En general, poseen como principal pigmento fotosintético clorofila *a*, lo que les permite captar la luz para utilizarla como fuente de energía en la transformación de materia inorgánica en orgánica (metabolismo autotrófico) necesitando únicamente compuestos como CO₂, sales y luz solar como fuente de energía para el crecimiento. Esta definición, sin embargo, no es tan estricta ya que algunos organismos considerados microalgas pueden crecer en condiciones mixotróficas y heterotróficas, es decir, en presencia simultánea de luz y fuentes de carbono-energía orgánica; o en oscuridad y sólo con fuentes de carbono-energía orgánica, respectivamente [9] [57]. El ambiente más común de estos microorganismos es el agua, tanto salada como dulce y se pueden encontrar en hábitats que presentan amplios rangos de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes. También pueden crecer en ambientes terrestres de amplia variedad, desde la nieve hasta formar parte de líquenes (una asociación entre un hongo y una o más algas o cianobacterias) [9] [58]. Dentro del grupo de microorganismos considerados microalgas, los procariotas fotosintéticos se conocen como cianobacterias que pertenecen a la clase *Cyanophyceae*; mientras que dentro de las eucariotas más conocidas se pueden mencionar a las algas verdes de la división *Chlorophyta* y a las diatomeas de la división *Bacillariophyta* [9] [10].

Las microalgas tienen gran importancia en biotecnología debido a su potencial aplicación en salud, el ambiente y la producción de energía [59]. Al respecto, se han publicado trabajos sobre sustancias de interés terapéutico, como antitumorales y antivirales [60] [61], o nutracéutico (como ácidos grasos poliinsaturados tipo ω -3 de cadena larga) [62]. Relacionado a su aplicación medioambiental, está descrito su empleo en la biorremediación de zonas contaminadas con metales pesados o su uso en la reducción de la carga orgánica de ciertos efluentes [59] [63]. En cuanto a la producción de energía, se destacan algunas cepas de microalgas por su capacidad de sintetizar y acumular elevadas cantidades de aceites, característica que se aprovecha para obtener la materia prima necesaria para la producción de biodiésel. La naturaleza fotosintética de estos microorganismos sumada a su capacidad de acumular almidón (o alguna variante de polisacárido de reserva), permite proyectar también su empleo en la producción de etanol u otros alcoholes apreciados como biocombustibles [64] [65] [66] [67].

La acumulación de los materiales de reserva en las células de microalgas, está asociada a diferentes factores y puede inducirse con modificaciones en sus condiciones de cultivo generando estrés salino y/o depleción de la fuente luz o de nitrógeno [68] [69] [70] [71] [72]. Los mecanismos moleculares asociados a estos fenómenos comienzan a ser dilucidados, especialmente en organismos modelo como *Chlamydomonas reinhardtii* [73] [68] [74]. Sin embargo, el conocimiento de las particularidades metabólicas de cada microalga con potencial aplicación industrial es muy escaso.

Como se mencionó anteriormente, además de la capacidad fotosintética de las microalgas, muchas especies son capaces de crecer en condiciones mixotróficas y heterotróficas [75] [76] [77]. Esta última condición, aunque requiere de fuentes externas de carbono y energía, permite maximizar los rendimientos de algunos bioproductos [75] [78] [79] [80] [81] [82]. Además, el utilizar condiciones heterotróficas es de interés para la industria, ya que simplifica el escalado de los bioprocesos al adaptarse a los sistemas de cultivo tradicionales que existen actualmente a escala productiva. Para integrar los beneficios de los cultivos heterotróficos sin eliminar globalmente las ventajas energéticas del crecimiento autotrófico de estos microorganismos, se han desarrollado tecnologías que recurren a la hidrólisis de polisacáridos como la celulosa a los efectos de obtener la Glc necesaria para utilizar como fuente de carbono y energía en este tipo de cultivo [83] [84] [85].

El desarrollo de bioprocesos redituables y competitivos con microalgas en el campo de los biocombustibles, requiere de la obtención de cepas de adecuado desarrollo y altamente productivas, propiedades que están asociadas a las tecnologías de cultivo. Dentro de las diferentes microalgas podemos encontrar, conformando el reino procariota, a las cianobacterias conocidas tiempo atrás como algas azul verdosas. Además, hay un grupo extenso de algas uni- o pluricelulares que según

sus características, se clasifican en diferentes grupos que conforman el reino eucariota [9]. Nuestros estudios estuvieron basados en *Chlorella*, un alga verde unicelular perteneciente al grupo *Chlorophyta* que ha demostrado gran potencial e interés para la industria biotecnológica por su capacidad de acumular almidón y triacilglicéridos [75] [86].

Chlorophyta

La clase *Chlorophyta* comprende, junto con las *Streptophytas*, el clado *Viridiplantae* (Figura 11). Son los organismos que dieron origen a las plantas terrestres (*Embriophytas*) y aunque consiste en un grupo de organismos eucariotas unicelulares pueden presentar diferentes niveles y formas de organización (colonias, filamentos, sifonáceos o con talo) incluso algunos pueden presentar flagelos. Esta clase está compuesta mayoritariamente por algas de agua dulce y sólo el 10% está representado por algas marinas [9].

Chlorella spp., que pertenecen a esta clase, se caracterizan por poseer clorofila *a* y *b*; además de sintetizar compuestos de reserva como lípidos (que se acumulan en el citosol) y de almidón (encontrado en cloroplastos) que se encuentra asociado a pirenoides (masa fundamentalmente proteica, incolora, que se encuentra en el estroma de los plástidos). La pared celular que presentan está compuesta principalmente por celulosa, aunque frecuentemente este polisacárido estructural es reemplazado por xilanos o mananos [9].

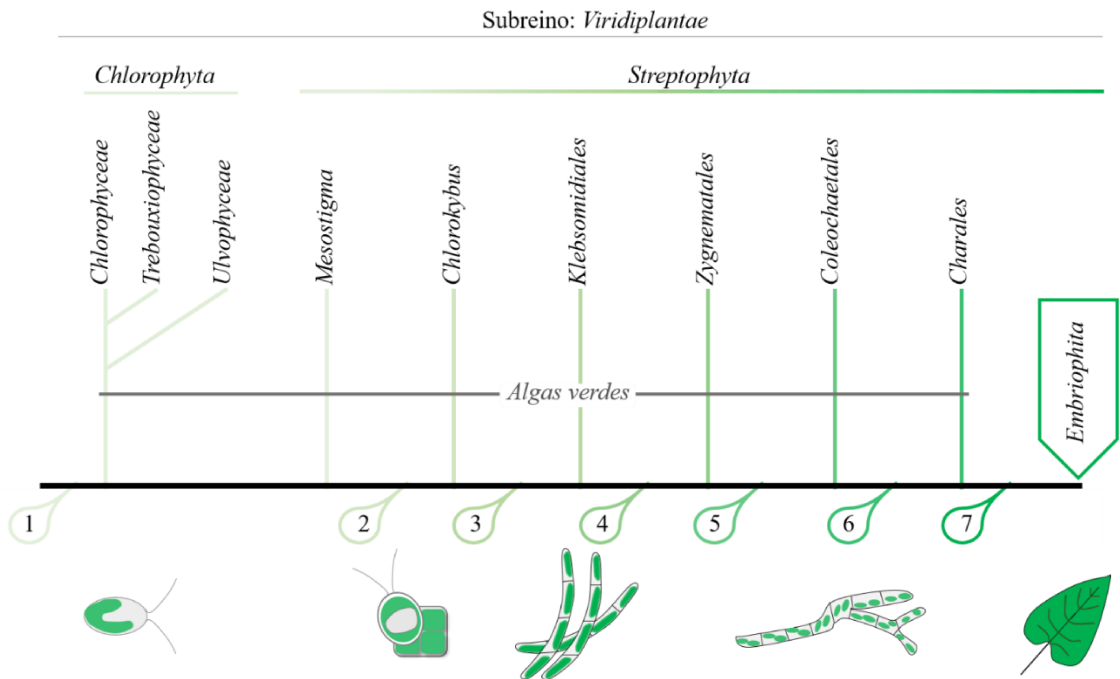


Figura 11. Árbol filogenético del grupo monofilético *Viridiplantae*. Adaptado de Judd y col [87]

La reproducción en *Chlorophyta* puede ocurrir tanto de forma sexual como asexual. En el caso de *Chlorella* spp., la reproducción es asexual, mediante la formación de autoesporas (células reproductivas no móviles) que presentan la misma forma que la célula madre. Las autoesporas se forman en un número múltiplo de dos, generando células idénticas a la que le dio origen [9]. En un estudio de proliferación celular de *Chlorella vulgaris* [88] se describieron 3 fases en el ciclo celular de esta alga: crecimiento de las células madres, división celular y liberación de las células hijas.

En cuanto al metabolismo de la clase *Chlorophyta*, además de ser fotosintéticas, también pueden asimilar compuestos orgánicos y metabolizarlos heterotróficamente. Este es el caso de diversas especies del género *Chlorella* y *Scenedesmus*, las cuales pueden asimilar glucosa y glicerol [89]. *Chlorella* es el género más importante en la industria de la microalgas y actualmente se cultiva y se comercializa esencialmente como alimento saludable [10].

Metabolismo: de la comprensión a la aplicación

La biosíntesis de almidón y lípidos ha sido muy estudiada en algas en los últimos años, debido a su potencial aplicación en la producción de bioetanol y biodiésel [90] [91]. En principio, es inevitable comparar a las algas con las plantas superiores (organismos estudiados en mayor detalle). En tal sentido, es relevante considerar los procesos de partición del carbono fotoasimilado en estos organismos. En algas verdes unicelulares, el carbono se distribuye en los distintos compartimentos de una única célula. Las plantas superiores poseen dos tipos de tejidos diferentes [14]: fotosintético (o autótrofo) y no fotosintético (o heterótrofo). Por lo tanto, en el caso de las plantas los compuestos fotoasimilados deben dividirse no sólo dentro de una célula (entre el plástido y el citosol), sino también entre los diferentes tejidos, siendo la sacarosa (Suc) el principal metabolito involucrado en la distribución intercelular del carbono. El transporte intercelular de fotoasimilados entre células fotosintéticas y no fotosintéticas que ocurre en las plantas, no ocurre en algas verdes unicelulares.

En *Chlorella* spp., las células pueden presentar características autotróficas o heterotróficas (Figura 12) dependiendo de las condiciones de cultivo y todas las adaptaciones metabólicas y la partición de los compuestos de carbono ocurren dentro de la misma célula [92] [27] [75]. En presencia de luz el alga fija CO₂ y las triosas-P sintetizadas se utilizan para la síntesis de almidón dentro del mismo cloroplasto o se transportan al citosol para ingresar a otras vías metabólicas, como por ejemplo la glucólisis (Figura 12 A). En condiciones de oscuridad y con Glc como fuente externa de carbono y energía, la partición del carbono ocurriría en sentido inverso a lo descrito

anteriormente, favoreciéndose el transporte de triosas-P desde el citosol al plástido, lo que permite la síntesis de almidón y lípidos (Figura 12 B).

Dentro de las especies de *Chlorella* [86] [93] [94] [95] [96], se han descrito algunas cepas con potencial para la producción industrial de biodiésel debido a su gran capacidad de acumular ácidos grasos. Al respecto, se ha demostrado que *Chlorella protothecoides* puede acumular, cuando se cultiva en condiciones heterotróficas con adición de Glc, hasta un ~55% más de lípidos que en condiciones de cultivo autotróficas. Esto significa un incremento de 4 veces en la producción de lípidos [96]. Además, se ha observado que en los cultivos heterotróficos de este microorganismo la adición de Glc genera un incremento de la expresión del gen que codifica para la Ga3PDHasa (Figura 12), con un consecuente aumento del flujo glucolítico y de la producción de piruvato. En estas condiciones se genera también un aumento de la expresión del gen que codifica para el transportador de ATP/ADP de la membrana mitocondrial (entre otros genes), lo que se relaciona directamente con la producción energética celular [97].

Por otra parte, se ha analizado la regulación de la expresión de los genes que codifican dos Ga3PDHasas en *Chlorella fusca* y su relación con las condiciones tróficas del cultivo. Se ha observado que la adición de Glc a los cultivos autotróficos, genera una disminución de la expresión del gen que codifica para la Ga3PDHasaA (cloroplastídica) y un aumento de la expresión del gen que codifica para la np-Ga3PDHasa (GapN) [92]. Este cambio en la expresión génica logra una adaptación metabólica que permitiría sintetizar mayor cantidad de Ga3P y NADPH en el citosol celular y permitir la importación de Ga3P dentro del cloroplasto ya que no se está generando energía proveniente de la fotosíntesis para poder fijar CO₂ y sintetizar triosas-P dentro del mismo. La adaptación metabólica mediante la regulación de la partición del Ga3P entre las distintas Ga3PDHasas también se han descrito en plantas, donde se ha mostrado que las condiciones redox del microambiente celular puede variar el flujo del Ga3P a fin de obtener distintas fuentes de energía [98] [52]. Por otra parte, se observó que la inactivación del gen que codifica para la ADPGlc PPasa (AGPasa) en *Chlamydomonas reinhardtii*, enzima clave de la ruta de biosíntesis de almidón, conlleva a un aumento de 10 veces en la síntesis de lípidos respecto a la cepa del tipo salvaje [99, 100]. Esto tiene una estrecha relación con la partición del carbono entre las vías metabólicas que sintetizan el almidón y los lípidos que comparten los precursores metabólicos.

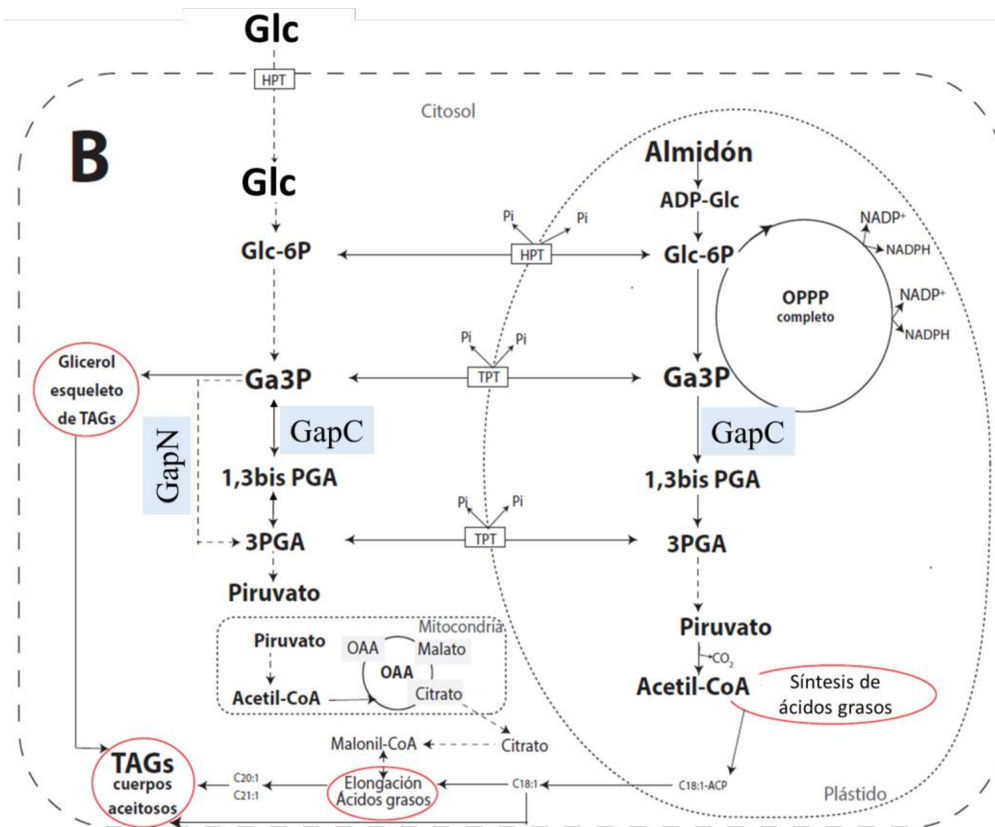
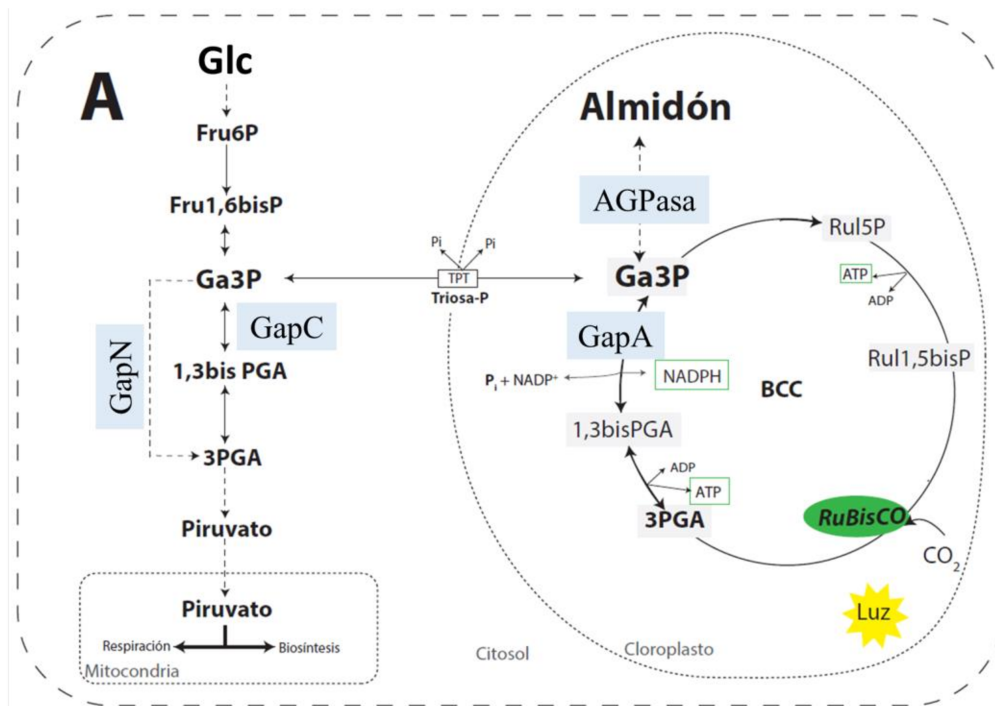


Figura 12. Esquema simplificado de la partición del carbono en una célula de *Chlorella* spp. crecida en condiciones autotróficas (A) o heterotróficas (B). Se detallan los principales destinos metabólicos de las triosas-P generadas en el proceso de fotosíntesis o en la glucólisis y algunas enzimas que son objeto de estudio en esta Tesis. OPPP: ciclo oxidativo de las pentosas fosfato; OAA: oxalacetato; TAGs: triacilglicéridos; GapC: Ga3PDHasa; GapN: np-Ga3PDHasa; GapA: Ga3PDHasa A; AGPasa: ADPGlc PPasa; Glc: glucosa.

Los resultados obtenidos en los estudios mencionados, destacan la partición intracelular del carbono en algas verdes y su relación con la síntesis de compuestos de reserva. Sin embargo, la comprensión actual no es suficiente para entender de forma integral cuales son todos los actores involucrados y cómo están siendo afectados en relación a los cambios en las condiciones de cultivo (sean autotróficas o heterotróficas). El poder avanzar en el estudio y caracterización de enzimas de diferentes vías metabólicas permitirá comprender las adaptaciones del metabolismo e incidir de manera específica tanto en las condiciones de cultivo como en la manipulación genética racional y fundada de estos organismos con el objetivo de conseguir maximizar la producción de ácidos grasos y/o almidón.

Objetivos

I-Establecer condiciones de cultivo autotróficas y heterotróficas para *Chlorella* spp., determinando el perfil de acumulación de reservas en cada condición.

II-Estudiar enzimas claves del metabolismo del carbono en *Chlorella* spp., tales como Ga3PDH_{asa}, np-Ga3PDH_{asa}, Ga3PDH_{asa}A/B y ADP-Glc PP_{asa}. Se realizarán estudios *in vitro*, con las proteínas producidas en forma recombinante, caracterizando sus propiedades cinéticas y estructurales. Además, para el caso de np-Ga3PDH_{asa}, se evaluará su impacto *in vivo*, empleando metodología de transformación génica para variar los niveles de expresión y actividad en célula de *Chlorella* sp.

III-Establecer tecnologías de transformación para generar cepas de *Chlorella* sp. genéticamente modificadas a fin de disminuir o aumentar la expresión de los genes en estudio.

Materiales y Métodos

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima calidad disponible, de grado “pro-análisis” o similar. Los materiales y reactivos químicos empleados en este trabajo se obtuvieron comercialmente de distintas compañías, indicadas para cada caso.

Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y antibiótico

Plásmidos

- a. pRSFDuet (Novagen): tiene como marcador de selección el antibiótico kanamicina.
- b. pETDuet (Novagen): tiene como marcador de selección el antibiótico ampicilina.
- c. pChlamy3 (Invitrogen): tiene como marcador de selección el antibiótico ampicilina en bacterias e higromicina en algas verdes unicelulares.
- d. pCAMBIA 1302: tiene como marcador de selección los antibióticos kanamicina en bacterias e higromicina en algas verdes unicelulares.

Cepas y antibióticos

Cepas bacterianas

- a. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen)
- b. *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen)
- c. *Agrobacterium tumefaciens*

El medio de cultivo y las condiciones de crecimiento se especificarán según corresponda. Las células transformadas con vectores plasmídicos fueron seleccionadas y crecidas en presencia de un antibiótico adecuado: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) o higromicina (50 µg/ml).

Cepas de algas verdes unicelulares

- a. *Chlorella* sp. (UTEX 1822)
- b. *Chlorella vulgaris* (UTEX 26)
- c. *Chlorella prototheicoides* (UTEX 25)
- d. *Chlorella saccharophila* (UTEX 2469)

Las células que fueron modificadas genéticamente se seleccionaron y crecieron en presencia de higromicina a una concentración final de 50 µg/ml.

Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla a continuación:

Cultivo de bacterias

- a. Luria-Bertani (LB): 10 g/l tripteína, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl y H₂O.
- b. LB-agar: Compuesto por medio LB más 1,6% (p/v) agar-agar.
- c. YT2X: 6 g/l hidrolizado de caseína, 10 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl y H₂O.
- d. Terrific Broth (TB): 2,3 g/l KH₂PO₄, 12,5 g/l K₂HPO₄, 12 g/l hidrolizado de caseína, 24 g/l extracto de levadura, 4 ml/l glicerol y H₂O.

Cultivo de algas verdes unicelulares

- a. BOLD3N: 0,75 g/l NaNO₃, 0,0255 g/l CaCl₂, 0,04 g/l MgO₄, 0,175 g/l K₂HPO₄, 0,025 g/l NaCl, 25 µg/l biotina, 135 µg/l B12, 1,1 mg/l tiamina y H₂O.
- b. BOLD3N-agar: Compuesto por medio BOLD3N más 1,5% (p/v) agar-agar.
- c. BOLD3N-glc: Compuesto por el medio BOLD3N más 20 g/l de Glc.
- d. M16: 2 g/l KNO₃, 0,01 g/l CaCl₂, 1 g/l MgO₄, 2 g/l K₂HPO₄, 2 g/l NH₄Cl, 2 g/l Glc, 20 g/l glicerol, 2 g/l urea, 1 g/l extra to de levadura, 1 g/l tripteína, 25 µg/l biotina, 135 µg/l B12, 1,1 mg/l tiamina y H₂O.
- e. GOLGI: Medio mínimo y tripteína de soja.
- f. ENVA: Compuesto por GOLGI, extracto de levadura, 10 g/l de glicerol y 10 g/l de glucosa.

Mantenimiento de cultivo y obtención de biomasa

Cultivo de bacterias

El cultivo de las bacterias se realizó empleando alguno de los medios detallados anteriormente y erlenmeyers de distintos volúmenes manteniendo siempre una proporción de volumen de medio líquido correspondiente al 25% del volumen total del erlenmeyer. Las condiciones de cultivo estándares se mantuvieron a 37 °C en agitación a 200 rpm empleando un agitador orbital con temperatura controlada.

Cultivo de algas verdes unicelulares

1- Mantenimiento

Para mantener en cultivo las algas verdes unicelulares, se utilizaron frascos T de 25 ml (Greiner Bio-One™) con tapa a rosca con filtro de intercambio gaseoso y los medios de cultivo BOLD3N o GOLGI aptos para condiciones de cultivo autotróficas con una intensidad de luz de $57 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y a $22 \text{ }^\circ\text{C}$.

2- Obtención de biomasa

Para obtener biomasa de *Chlorella* spp. se escalaron los cultivos en frascos erlenmeyers de diferentes volúmenes pero siempre manteniendo una proporción de volumen de medio líquido correspondiente al 10% del volumen total del mismo. Según la condición de cultivo, se utilizó alguno de los medios detallados anteriormente. Para el cultivo en condiciones heterotróficas se emplearon los medios M16, ENVA o BOLD3N-glc y en condiciones autotróficas los medios de cultivo GOLGI o BOLD3N. Se realizaron cultivos estáticos o agitados empleando un agitador orbital a 160 rpm. Para los cultivos autotróficos se mantuvo una intensidad de luz de $57 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, para los cultivos heterotróficos se mantuvieron condiciones de oscuridad constante. En todos los casos la temperatura de cultivo fue de $22 \text{ }^\circ\text{C}$.

La biomasa de células obtenida en las distintas condiciones y con los diferentes medios de cultivo, se cosechó a comienzos de la fase estacionaria del crecimiento celular. Las células cosechadas se conservaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta ser utilizadas para determinar: contenido de lípidos, contenido de almidón, extracción de proteínas y extracción de ARNm o ADN genómico.

Cinética de proliferación celular

Con el fin de caracterizar el crecimiento de las algas verdes unicelulares en las distintas condiciones de cultivo, se estandarizó la cantidad de células iniciales y periódicamente se tomaron muestras del cultivo para determinar el número de células/ml por recuento en cámara de Neubauer.

La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó mediante un software a partir de los gráficos del logaritmo natural de la concentración de células en función del tiempo de cultivo. La pendiente obtenida en el rango lineal de la gráfica corresponde directamente al valor de μ ,

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

Siendo x_0 la concentración celular inicial, y x la concentración celular alcanzada a un tiempo t .

Métodos bioquímicos básicos

Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1% (p/v) con *buffer* TAE [40 mM Tris, 40 mM ácido acético y 1 mM EDTA pH 8,0] en presencia del colorante Gel Green (Biotium). Las muestras se acondicionaron con 3% (v/v) glicerol y 0,05% (p/v) Azul de Bromofenol antes de realizar la siembra. Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 V constantes durante el tiempo necesario. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz led azul.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó según la técnica descrita por Laemmli (1970). La concentración del gel de separación varió entre 10-15%, dependiendo de las masas de las proteínas a separar. A las muestras de proteínas a separar por electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE reductor) se les adicionó 1/3 (v/v) de *buffer* de muestra reductor (240 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% (p/v) SDS, 40% (v/v) glicerol, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 0,04% (v/v) Azul de Bromofenol). Cuando se quisieron preservar las condiciones de oxido-reducción originales de las muestras en la electroforesis (SDS-PAGE no reductor), se utilizó un *buffer* de muestra sin 2-mercaptoetanol. Los marcadores de masa molecular empleados fueron de GE Healthcare. Terminada la electroforesis, cada gel fue coloreado con una solución de *Coomassie Brilliant Blue R-250 (Coomassie Blue)*, salvo en los casos que se realizaron electrotransferencia e inmunodetección.

Cuantificación del contenido proteico

La determinación de la concentración de proteínas en solución se realizó por el método de Bradford [101], utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar.

Desalado y concentración de proteínas

Para cambiar la composición de las soluciones en las que se encontraban disueltas las proteínas y/o para concentrarlas, se emplearon dispositivos comerciales de ultrafiltración (Amicon, Millipore) con membranas de tamaño molecular apropiado para cada proteína y se procedió según las indicaciones del fabricante.

Electrotransferencia seguida de inmunodetección (WB)

Para las inmunodetecciones, una vez realizada la corrida electroforética en el SDS-PAGE, se efectuó una electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa durante 60 min a 180 mA en un equipo *Mini Protean III* (Bio-Rad) con una solución de 0,025 M Tris-HCl pH 8,3; 0,192 M glicina y 20% (v/v) metanol. Finalizada la electrotransferencia, la membrana se bloqueó incubándola 1 h a 25 °C con una solución de TBS Tween [50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl y 0,05% (p/v) Tween 20] adicionada de leche descremada en polvo al 5% (p/v). Luego, se lavó con solución de TBS-Tween 10 min a 25 °C y se incubó 16 h a 25 °C con la misma solución suplementada con leche descremada al 1 % (p/v) que contenía una dilución adecuada del anticuerpo primario preparado en conejo. Se lavó nuevamente con solución de TBS Tween 10 min a 25 °C y se procedió al revelado de la membrana. Para tal fin, se incubó durante 1 h a 25 °C en TBS Tween suplementado con una dilución 1/5.000 del anticuerpo secundario conjugado a un colorante fluorescente *Alexa Fluor 647* (Invitrogen) producido en cabra, que permite detectar las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos producidos en conejo. La señal fue detectada mediante la emisión de fluorescencia, utilizando el escáner *Typhoon FLA 7.000* (GE Healthcare).

Anticuerpos

Los sueros inmunes contra las proteínas de interés fueron preparados en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina; mediante la inmunización de conejos, acorde a lo

descrito por Vaitukaitis [102]. Como inmunógeno se utilizó las proteínas de interés purificadas a homogeneidad electroforética.

Determinación de lípidos

La extracción de los triacilglicéridos (TAG) de las células de algas verdes unicelulares se realizó según lo descrito por Folch y col. [103]. Para cada una de las muestras, se tomaron 200 mg de células previamente trituradas con N₂ líquido y se le agregaron 0,2 ml de H₂O destilada y 3,8 ml de mezcla de extracción compuesta por cloroformo/metanol: 2/1 (v/v). Los tubos se cerraron herméticamente y se dejaron reposar 2 h agitando enérgicamente cada 30 min en vórtice. Posteriormente, las muestras se filtraron utilizando papel de filtro libre de grasas previamente lavado con la mezcla de extracción. Las muestras se transvasaron a tubos de vidrio previamente tarados. A cada tubo se le agregó 0,7 ml de solución de lavado I [0,02% CaCl₂ en mezcla de cloroformo/metanol/H₂O: 3/48/47 (v/v)]. Se agitaron y centrifugaron durante 5 min a 3.000 xg hasta separación de las fases. La fase superior se eliminó por succión y se agregó a cada tubo 0,7 ml de la solución de lavado II [cloroformo/metanol/H₂O: 3/48/47 (v/v)]. Se agitaron y centrifugaron durante 5 min a 3.000 xg hasta separación de las fases. La fase superior se eliminó por succión. Posteriormente, los tubos se incubaron en baño térmico a 45-60 °C para evaporación total del cloroformo y obtención de los lípidos. Cada tubo fue pesado y por diferencia de peso con los tubos vacíos, se determinó el peso de los lípidos obtenidos. Todas las muestras se disolvieron con isopropanol a una concentración final de 1 mg/μl.

Para determinar la concentración de TAG en cada una de las muestras se produjo la hidrólisis enzimática de los mismos mediante una lipasa comercial y luego el glicerol (Gro) liberado se cuantificó por una serie de reacciones enzimáticas. El Gro generado fue fosforilado a Gro-P y éste luego fue oxidado, por la acción conjunta de la Gro quinasa y la Gro-P oxidasa que genera como producto peróxido de hidrógeno. Este último fue cuantificado colorimétricamente por acción de la peroxidasa acoplada a un compuesto coloreado (Wiener lab). Las determinaciones se realizaron en *buffer* 50 mM Pipes pH 7,5 con 5 mM 4-clorofenol, en presencia de lipoprotein lipasa (>15.000 U/l), Gro quinasa (>1.000 U/l), Gro-P oxidasa (>2.500 U/l), peroxidasa (>440 U/l), 0,7 mmol/l 4-aminofenazona y 0,18 mmol/l ATP. Las determinaciones se realizaron colocando 5 μl de muestra convenientemente diluida en 500 μl de reactivo de trabajo. Además, se realizó un blanco de reactivos y un testigo con una solución patrón (2 g/l o 2,26 mmol/l de trioleína). Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 5 min y posteriormente se midió la absorbancia en espectrofotómetro a

492 nm. Para obtener la cantidad de TAG contenidos por mg de células en cada una de las muestras se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{TAG } (\mu\text{g/mg cél}) = (C_t * (A_m - A_b) * \text{Dil}^{-1}/A_t) * \text{mg líp ext/mg cél}$$

C_t : concentración de solución patron/testigo

A_m : absorbancia a 492 nm de la muestra

A_b : absorbancia a 492 nm del blanco

A_t : absorbancia a 492 nm del testigo

mg líp ext: mg de lípidos extraídos

mg cél: mg de células de partida

Determinación de almidón

La determinación de la cantidad de almidón en células de algas verdes unicelulares se realizó combinando y adaptando los protocolos descriptos por Reibach y Benedict [104] y Baud y Graham [105]. Para cada muestra, 200 mg de células trituradas en N₂ líquido se extrajeron con 500 μ l de etanol 95% a 4 °C. Luego se centrifugó a 13.000 xg a 4 °C durante 10 min, se descartó la fracción soluble, y se repitió el paso de extracción 6 veces más para eliminar los azúcares solubles presentes en las muestras. La fracción insoluble, fue secada en estufa y pesada en un tubo previamente tarado. Luego, el extracto seco se resuspendió en 10 μ l de H₂O destilada por cada 1 mg de extracto, los tubos se taparon herméticamente y se hirvieron en baño de agua durante 1 h para solubilizar el almidón. Posteriormente se centrifugaron a 13.000 xg durante 10 min y a partir de la fracción soluble se realizó la digestión enzimática del almidón. A 20 μ l de las fracciones solubles diluidas (1/10 y/o 1/20) se le agregaron 200 μ l de *buffer* 100 mM acetato de sodio pH 4,5 y 70 U de amiloglucosidasa [1,4 α -D glucan glucohydrolase exo-1,4 α glucosidasa (Sigma)]. Las muestras se incubaron 16 h a 55-60 °C para permitir la degradación del almidón. Posteriormente se centrifugaron a 13.000 xg durante 10 min, se recuperó la fracción soluble y se cuantificaron los residuos de azúcares solubles mediante la reacción de la glucosa oxidasa, que genera peróxido de hidrógeno durante la oxidación. Este último fue cuantificado colorimétricamente por la acción de la peroxidasa acoplada a un compuesto coloreado (Wiener lab) según se describe. Una alícuota de (50 μ l) de muestra diluida convenientemente se adicionó a 200 μ l del reactivo comercial (solución de 10 kU/l peroxidasa; 0,5 mM 4-aminofenazona; *buffer* 100 mM fosfatos pH 7.0 y 12 mM 4-hidroxibenzoatos). Se incubó la reacción 10 min a 37 °C y se leyó la absorbancia a 492 nm en

espectrofotómetro junto al blanco de reactivos correspondiente a la determinación. Para poder correlacionar la cantidad de almidón con la determinación de la concentración de azúcares solubles liberados durante la digestión enzimática del almidón, se construyó una curva de almidón a partir de una solución estándar, y se trató de igual manera que la muestra. Con los valores obtenidos en esta determinación se realizó una curva de calibrado de Glc (mg/ml) en función de la cantidad de almidón (μg). Para determinar los contenidos de almidón por célula en cada una de las muestras se utilizó siempre la parte lineal de la curva obtenida y las siguientes ecuaciones:

Cálculo de la concentración de Glc en la muestra:

$$C_{\text{glc}} = ((A_m - A_b) / P_{\text{glc}}) * \text{Dil}^{-1}$$

C_{glc} : concentración de glucose en la muestra (mg/ml)

A_m : absorbancia a 492 nm de la muestra

A_b : absorbancia a 492 nm del blanco

P_{glc} : pendiente de la recta A_{glc} vs C_{glc} (ml/mg)

Dil^{-1} : inversa de la dilución de la muestra ensayada.

Cálculo de los μg de almidón en la muestra:

$$\text{Alm} = (C_{\text{glc}} / P_{\text{alm/Cglc}}) * \text{Dil}^{-1}$$

Alm : cantidad de almidón (μg)

$P_{\text{alm/Cglc}}$: pendiente de la recta Alm vs C_{glc} .

Tinción con Rojo Nilo

Las muestras de algas verdes unicelulares destinadas a la determinación de lípidos neutros se centrifugaron a 1500 xg durante 10 min para obtener un *pellet* celular que se resuspendió en *buffer* fosfatos salino (PBS). La suspensión obtenida se separó en 2 alícuotas iguales y solo a una de ellas se le agregó un volumen de una solución del colorante Rojo Nilo en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de ($0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Las suspensiones celulares fueron observadas en microscopio de epifluorescencia (CX31, Olympus, Japón), empleando filtros de excitación y emisión para fluoresceína (FITC).

Metodología utilizada en biología molecular

Extracción del ARNm

Células autotróficas

Las extracciones de ARN en células de algas verdes unicelulares crecidas en condiciones autotróficas, se realizaron utilizando el reactivo de extracción Trizol (0,38% (v/v) de fenol ácido, 0,8 M de tiocianato de guanidina, 0,4 M tiocianato de amonio, 0,1 M de NaAc (pH 5,0), 5% (v/v) de glicerol). Para dichas extracciones 1×10^8 células se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero estéril y la totalidad del polvo obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregó 1 ml del reactivo de extracción. Luego de mezclar por inversión varias veces, los tubos se incubaron a temperatura ambiente 10 min y se centrifugaron 10 min a 13.000 xg y 4 °C. A las fracciones solubles obtenidas se les adicionó 200 µl de cloroformo y se incubaron 3 min adicionales a temperatura ambiente. Se centrifugaron 15 min a 13.000 xg a 4 °C y la fase acuosa fue posteriormente precipitada con un volumen de isopropanol incubando los tubos durante 30 min a -20 °C. Pasado el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 13.000 xg durante 15 min a 4 °C y luego fueron lavados con etanol 70% (v/v). El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente para luego ser disuelto en 30 µl de agua bidestilada estéril. La concentración de ARN se determinó en espectrofotómetro a 260 nm.

Células heterotróficas

En el caso de extracciones de ARN de células crecidas en condiciones heterotróficas las muestras se trataron según se describe (Oñate-Sánchez y Vicente-Carbajosa, 2008). Las muestras se procesaron en nitrógeno líquido para lograr un polvo uniforme y este polvo se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml que se adicionaron de 550 µl de solución amortiguadora de extracción de ARN (0,4 M LiCl, 0,2 M *buffer* Tris pH 8, 25 mM EDTA y 1 % (p/v) SDS) y 550 µl de cloroformo. Los tubos se agitaron 10 s., se mantuvieron en hielo 20 min y se centrifugaron a 13.000 xg 3 min a 4 °C. Luego, la fracción soluble se transfirió a tubos de 1,5 ml nuevos, se agregaron 500 µl de fenol ácido, los tubos se agitaron nuevamente, se agregaron 200 µl de cloroformo y se centrifugó a 13000 xg, 3 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo con 1/3 del volumen de 8 M LiCl y se agitó. Se incubó a - 20 °C durante 1 h para precipitar el ARN, luego se centrifugó a 13000 xg durante 30 min a 4 °C y se realizó un lavado con etanol 70% (v/v). Para limpiar el ARN de impurezas, como carbohidratos, se hizo una precipitación diferencial, para lo que se agregaron 470 µl de agua

bidestilada, 7 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 250 µl de etanol absoluto, se homogenizó la mezcla y se centrifugó durante 10 min a 13.000 xg 4 °C. Luego, se transfirió la fracción soluble a un tubo de 1,5 ml y se agregaron 43 µl de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 750 µl de etanol absoluto, se mezcló para homogeneizar y se incubó a -20 °C durante 1 h. Luego, se centrifugó para separar el ARN precipitado. Finalmente, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol 70% (v/v). En todos los casos, se realizó una segunda precipitación del ARN con 1 M LiCl, para eliminar posibles contaminaciones con ADN genómico, y se incubó 1 h a -20 °C. Se centrifugó a 13.000 xg por 1 h y se lavó el precipitado dos veces con 1 ml de etanol 70% (v/v). Luego, el ARN se resuspendió en 20-50 µl de agua estéril libre de RNasas.

Extracción de ADN genómico

Para analizar mediante la técnica de PCR la células de *Chlorella* sp. transformadas, se realizaron preparaciones de ADN genómico empleando un método de extracción sencillo[106]. Se colocó el pellet celular proveniente de 10 ml de cultivo en un tubo y se maceró durante 15 s. Después de agregar 700 µl de solución de extracción de ADN (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA y 0,5% (p/v) SDS), se agitó vigorosamente durante 10 s y se centrifugó a 12.000 xg durante 1 min.. Se tomaron 600 µl del sobrenadante y se agregó 1 volumen de isopropanol. Luego de incubar 5 min a temperatura ambiente y mezclar vigorosamente, los tubos fueron centrifugados a 10.000 xg durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 600 µl de etanol al 70% (v/v), se centrifugó 5 min a 10.000 xg y se mantuvo en estufa a 37 °C hasta evaporar el alcohol. Se resuspendió en 100 µl de agua bidestilada estéril y se centrifugó 2 min a 10.000 xg. Para realizar la PCR se tomó 1 µl de ADN.

Transcripción reversa: obtención del ADN copia

Para obtener el ADN copia (ADNc) a partir del ARNm, se realizó una retro-transcripción utilizando la transcriptasa reversa *M-MLV* (Promega), como se indica a continuación. Brevemente, se incubó 1 µg ARNm y 100 pmol de oligo(dT) durante 5 min a 70 °C y luego la mezcla se enfrió rápidamente en hielo. Paso siguiente, la muestra se diluyó a un volumen final de 50 µl en 50 mM TRIS-HCl pH 8,3; 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 200 mM dNTP, 25 U de inhibidor de ribonucleasas (*RNasin ribonuclease inhibitor*, Promega) y 200 U de transcriptasa reversa *M-MLV*. La hebra de ADNc a partir del ARNm se obtuvo incubando la mezcla de reacción anterior a 42 °C durante 60 min.

Cuantificación de ácidos nucleicos

Las concentraciones de ADN y ARN en solución se calcularon a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que una DO (260 nm) = 1 equivale a 50 µg/ml de ADN o a 40 g/ml de ARN. También se midió la absorbancia a 280 nm, pico máximo de absorción de las proteínas, y se descartaron aquellas muestras con una relación de Abs 260 / Abs 280 inferior a 1,7 por considerarlas con una contaminación de proteínas no aceptable para los ensayos subsiguientes.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este capítulo se detallan en la Tabla 1, donde se remarcan las secuencias que determinan los sitios de las enzimas de restricción indicadas (en negrita).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 1. Las secuencias en negrita corresponden a los sitios de restricción de cada oligonucleótido.		
Oligonucleótidos	Secuencia	Sitio de restricción
<i>Cv</i> gapN-Fo	GGATCC CATGACGGTCAGCAGCGACTTC	<i>Bam</i> HI
<i>Cv</i> gapN-Re	GCGGCCG CCTCATGCAGCGCCAG	<i>Not</i> I
<i>Cv</i> gapC1-Fo	GGATCC GATGCATGGCCATTGTGC	<i>Bam</i> HI
<i>Cv</i> gapC1-Re	GCGGCCG GCTCAGACCTTGGCATC	<i>Not</i> I
<i>Cv</i> gapC2-Fo	GGATCC AAATGCCGGTCAAGCTCG	<i>Bam</i> HI
<i>Cv</i> gapC2-Re	CATATG TGCATGCCGACTTGGACATGT	<i>Nde</i> I
<i>Cv</i> gapC2-Re	AAGCTT TTCATGCCGACTTGGACATG	<i>Hind</i> III
<i>Cv</i> gapA-Fo	GGATCC AAATGGCCGCCTCCG	<i>Bam</i> HI
<i>Cv</i> gapA-Re	GCGGCCG GCTCACTCCCAGTTG	<i>Not</i> I
<i>Cv</i> aglC small-Fo	GGATCC GATGCGCTGCGCCGAGCTCAC	<i>Bam</i> HI
<i>Cv</i> aglC small-Re	GCGGCCG GCTCAGATGATGGTACCGTCAG	<i>Not</i> I
<i>Cv</i> aglC large-Fo	GGATCC AAATGCAGCAGGTTGCGATCG	<i>Bam</i> HI
<i>Cv</i> aglC large-Re	GCGGCCG GCTCAGATGATGGTGCC	<i>Not</i> I
<i>Cv</i> aglC smarge-Fo	GGATCC AAATGAGCCGCACCGTG	<i>Bam</i> HI
<i>Cv</i> aglC smarge-Re	GCGGCCG GCTCAGATCACGATGC	<i>Not</i> I
HaACT-Fo	GGTAACATCGTGCTCAGTGGTGG	
HaACT-Re	AACCACCTTGATCTTCATGCTGC	

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes de interés se utilizó como molde ADNc o ADN genómico, según corresponda. Las reacciones se realizaron con 2 µl de ADN molde, 2 mM dNTPs, 0,1 mM oligonucleótidos, 2 mM MgCl₂ y 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas) en un volumen final de 50 µl. El programa básico utilizado fue el siguiente:

1 ciclo de desnaturalización a 95 °C, 5 min

30 ciclos de:

(i) desnaturalización a 95 °C, 1 min

(ii) hibridación a 40-60 °C, 30 s

(iii) elongación a 72 °C, 1 min/kpb

1 ciclo de elongación a 72 °C, 10 min.

Las reacciones se realizaron en un termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf).

Clonado

Los productos amplificados por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. La banda de interés se escindió del gel y se purificó con la herramienta comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Las muestras purificadas se ligaron al vector de clonado pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Subclonado

Para introducir el gen de interés en el vector de expresión correspondiente, se procedió a cortar el vector de clonado con las enzimas de restricción adecuadas para cada caso, de forma de liberar el inserto. Luego, la muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa y la banda de interés se cortó del gel y se purificó con la herramienta comercial *Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System* (Promega). Por otra parte, el vector de expresión se escindió con las mismas enzimas de restricción con las que se liberó el gen de interés del vector de clonado. Luego de la digestión, el vector de expresión cortado se precipitó con 67% (v/v) etanol y 0,1 M acetato de sodio incubando a -20 °C durante 16-18 h. Finalmente, el vector digerido y precipitado se centrifugó a 15.000 xg durante 15 min a 4 °C y resuspendió en agua mQ estéril. El inserto y el vector se ligaron utilizando T4 ADN ligasa (Promega) durante 16 h a 16 °C. Con la mezcla de ligación se transformaron células de *E. coli* TOP10, a fin de amplificar el plásmido. Para evaluar la presencia del inserto de interés en el

vector de expresión se realizó un corte con enzimas de restricción adecuadas y se sometió la reacción a una electroforesis en gel de agarosa.

Extracción de ADN plasmídico

Las células de *E. coli* transformadas se cultivaron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron a 37 °C durante 16-18 h. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación y se extrajo el ADN plasmídico utilizando la herramienta comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). La obtención del ADN plasmídico se corroboró por electroforesis en gel de agarosa.

Corte con enzimas de restricción

Para evaluar la presencia del inserto de interés en el vector correspondiente, se procedió al corte con enzimas de restricción. El procedimiento típico consistió en la incubación del ADN plasmídico (1-2 µg) con la(s) enzima(s) de restricción correspondiente(s) (10-20 U, en la solución reguladora provista por el fabricante para cada caso) a 37 °C durante 3 h.

Construcciones plasmídicas para la expresión de las enzimas recombinantes

En la Tabla 2 se detallan todas las construcciones plasmídicas que permitieron expresar las proteínas recombinantes utilizadas en esta tesis.

Tabla 2. Expresión de las proteínas recombinantes: construcciones y condiciones empleadas. Las enzimas se diferencian en colores de acuerdo al organismo al que pertenecen: verde (<i>Chlorella vulgaris</i>) y rojo (<i>Arabidopsis thaliana</i>). smc: sitio de múltiples clonados; CP: Codon-Plus®; T: temperatura.					
Enzima	Construcción	Sitios de clonado	Cepa de <i>E. coli</i>	T (°C)	[IPTG] (mM)
Ga3PDHasa 1	[pETDUET/ <i>Cva</i> gapC1]	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	BL21	28	0,2
Ga3PDHasa 2	[pETDUET/ <i>Cva</i> gapC2]	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	BL21	28	0,2
Ga3PDHasa A	[pETDUET/ <i>Cva</i> gapA]	(smc1) <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I (smc2) <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	BL21	15-37	0,2-0,5
Ga3PDHasa A	[pETDUET/ <i>Ath</i> gapA]	(smc1) <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I (smc2) <i>Nde</i> I/ <i>Xho</i> I	BL21	15-37	0,2-0,5
Ga3PDHasa B	[pETDUET/ <i>Ath</i> gapB]	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	BL21	18	0,2
np- Ga3PDHasa	[pETDUET/ <i>Cva</i> gapN]	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	BL21; CHAP2; CP	15-37	0,2-0,5
ADP-Glc PPasa large	[pETDUET/ <i>Cva</i> AGPL]	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	BL21; CHAP2; CP	15-37	0,2-0,5
ADP-Glc PPasa small	[pETDUET/ <i>Cva</i> AGPS]	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	BL21; CHAP2; CP	15-37	0,2-0,5
ADP-Glc PPasa smarge	[pETDUET/ <i>Cva</i> AGPSm]	<i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I	BL21; CHAP2; CP	15-37	0,2-0,5

Para expresar las proteínas recombinantes, se transformaron células de *E. coli* indicadas en la Tabla 2 para cada caso con la construcción correspondiente utilizando el método de transformación por CaCl₂. Luego, las células transformadas obtenidas en las placas con el medio de selección se repicaron a medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron en agitación a 37 °C hasta su saturación.

Para los ensayos de expresión se inocularon cultivos de 1 l de medios de cultivo LB, YT2X o TB realizando una dilución 1/50. El cultivo inoculado se incubó a 30 °C en agitación orbital a 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ ~ 0,8, momento en el cual se agregó el inductor IPTG. Luego de la inducción, las células continuaron cultivándose a la temperatura adecuada (según tabla 2) en agitador orbital a 200 rpm durante 16 h más. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 xg durante 10 min y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Transformación de células

Cepas bacterianas

Las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método del CaCl₂. Se utilizó un cultivo saturado para inocular medio LB fresco en una dilución 1/20. Las células se crecieron hasta DO₆₀₀ ~ 0,4 y luego se cosecharon por centrifugación a 5.000 xg durante 5 min. Luego las células a partir de 1 ml de cultivo se resuspendieron en 500 µl de ST1 [10 mM MOPS-NaOH pH 7,0, 10 mM KCl]. Seguidamente se lavaron con el mismo volumen de ST2 [100 mM MOPS pH 6,5, 10 mM KCl, 100 mM CaCl₂] y se incubaron 15 min en hielo, se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones y luego resuspendieron en 100 µl de ST2. Para transformar las células competentes, a una alícuota de 100 µl se le adicionaron de 2 a 4 µg de ADN plasmídico. La mezcla se incubó en hielo durante 1 h y luego se sometieron las células a un choque térmico a 42 °C por 45 s. Las células se recuperaron en medio LB durante 1 h a 37 °C y se sembraron en medio LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente. Finalmente, las células se cultivaron durante 16-18 h a 37 °C y se seleccionaron distintos clones para su posterior análisis.

Cepas de algas verdes unicelulares

Las células en fase exponencial crecidas en el medio BOLD3N fueron sometidas a distintos métodos de transformación según se describe en las siguientes secciones.

Electroporación de células intactas

Las células se transformaron según el protocolo de *GeneArt® Chamydomonas Engineering Kits* (Invitrogen). Se centrifugó por 15 min a 1.500 xg un volumen de cultivo correspondiente a 1×10^8 células. Seguidamente las mismas se resuspendieron en 10 ml de *GeneArt® MAX Efficiency® Transformation Reagent* y se centrifugaron 5 min a 1.500 xg. Luego de repetir este último paso, las células se resuspendieron con un volumen del mismo reactivo hasta una concentración celular final de 3×10^8 células/ml. Se puso una alícuota de 300 μ l de dichas células en 4 cubetas de electroporación (0,2 cm de diámetro) y se les agregó 25 μ l de la solución correspondiente según se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Soluciones empleadas para realizar los diferentes controles de transformación de <i>Chlorella</i> sp. SE:sobreexpresión		
CONTROLES	NEGATIVO	agua mQ estéril
	POSITIVO	0,16 g/l pChlamy_3 linealizado con <i>PvuI</i>
	VIABILIDAD	agua mQ estéril
Contrucción plasmídica		0,16 g/l [pChlamy_3/ <i>AthGapN</i>] linealizado con <i>PvuI</i>

La mezcla se incubó en hielo durante 5 min y se electroporó en un electroporador *Gene Pulser TM* (Bio-Rad) con las siguientes condiciones: capacitancia 50 μ F, resistencia 800 Ω y un voltaje de 500 V con un pulso de 5 s. Las cubetas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente se agregó medio BOLD3N suplementado con Glc 20% (p/v), se pasaron las suspensiones celulares a tubos Eppendorf y se incubó durante 20 h. Se centrifugó durante 15 min a 1.500 xg y se plaqueó en medio sólido BOLD3N-glc 1.5% agar con una concentración de 50 mg/l de higromicina, excepto en el caso del control de viabilidad que se plaqueó en el mismo medio pero sin antibiótico. Se mantuvieron a 23-25 °C con ciclos luz/oscuridad de 16/8 h hasta que aparezcan colonias.

Generación y electroporación de protoplastos

Los protoplastos se generaron incubando 5×10^8 células con 10 ml de celulasa de *Trichoderma longibrachiatum* (SIGMA) 4% (p/v) en *buffer* fosfato salino (PBS) durante 24 h a 23 °C en condiciones de agitación y ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h. Posteriormente se centrifugó a 1.500 xg durante 15 min, se lavó con 5 ml de BOLD3N y se resuspendió en 1 ml de *buffer* acetato

5 mM, pH 5 y 20 g/l de Glc. Luego se continuó con la electroporación siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para células intactas.

Transformación de protoplastos con PEG

Luego de generar los protoplastos, estos se centrifugaron eliminando la fracción soluble y se realizaron dos lavados con 10 ml de BOLD3N. Finalmente, se resuspendieron en 1 ml del mismo medio. Seguidamente, se mezcló en 4 tubos: 400 µl de protoplastos, 300 mg de microesferas de vidrio y 25 µl de las soluciones detalladas en la Tabla 3. Cada tubo se mezcló utilizando un vórtice en ciclos de mezcla/descanso de 5/5 s durante 30 min. Luego se dispersaron las células en placas con medio sólido BOLD3N-glc 1.5% agar suplementado con 50 mg/l de higromicina, excepto en el caso del control de viabilidad que se plaqueó en el mismo medio pero sin antibiótico. Se mantuvieron a 23-25 °C con ciclos luz/oscuridad de 16/8 h hasta que aparezcan colonias.

Transformación de células de *Chlorella* sp. intactas con *Agrobacterium tumefaciens*

Se procedió a la transformación según el protocolo descrito por Thye San Cha y col. [107] y según se detalla a continuación.

Las células de *Chlorella* sp. se plaquearon en medio BOLD3N-agar, 5×10^6 células y se mantuvieron a 23-25°C durante 2 días con ciclos de luz/oscuridad 16/8 h. Luego se recogieron las células de la placa lavando la misma con 5 ml de medio inductor (BOLD3N con 100 µM de acetociringona) y se pasaron a un tubo falcon de 15 ml. Se centrifugó a 2500 xg durante 15 min y se conservó las células cosechadas a -80 °C.

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* se cultivaron en 10 ml de medio LB suplementado con 5 mM de Glc, 50 mg/l de kanamicina y rifampicina y 100 mg/l de streptomycin; en oscuridad durante 20 h a 28 °C y 200 rpm. Posteriormente, se realizó una dilución 1/5 del cultivo en medio LB y se lo mantuvo en las mismas condiciones antes mencionadas hasta que alcanzó una DO: 1. El cultivo se centrifugó a 2.000 xg durante 15 min y la fracción insoluble se resuspendió en un volumen de medio inductor tal que permita tener una DO: 0,5.

Las células de *Chlorella* sp. se resuspendieron con 200 µl de la suspensión de células de *A. tumefaciens* y se plaquearon en medio inductor agarizado. Se mantuvieron las placas en oscuridad a 23-25 °C durante 3 días. Para cosechar las células se agregó a la placa 7 ml de medio BOLD3N suplementado con higromicina 20 mg/l, se recolectó el líquido con la suspensión celular y se mantuvo durante dos días a 23-25 °C con ciclos luz/oscuridad de 16/8 h. Posteriormente, se

seleccionaron las colonias transformadas plaqueando la suspensión celular en medio BOLD3N-agar suplementado con 50 mg/l de higromicina. Se mantuvieron a 23-25 °C con ciclos luz/oscuridad de 16/8 h hasta que aparezcan colonias.

Purificación de las enzimas recombinantes

Las células obtenidas en los ensayos de expresión se resuspendieron en *Buffer H* [25 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol y 10 mM imidazol] y se lisaron por ultrasonido. Se centrifugó a 16.000 xg durante 20 min hasta obtener un sobrenadante limpio de partículas en suspensión. La fracción soluble se sembró en una columna *HisTrap HP* de 1 ml (GE Healthcare) previamente equilibrada con *Buffer H*. La elusión de la proteína retenida se realizó con un gradiente de imidazol de 10-300 mM en *Buffer H*. Para el caso en el que no se utilizó el AKTA, las eluciones se realizaron empleando concentraciones crecientes de imidazol en *buffer H* (30, 50, 70, 100 y 300 mM). Las fracciones que contenían actividad enzimática se reunieron y se conservaron a -80 °C.

Todas las proteínas se purificaron siguiendo el protocolo descrito, a excepción de la Ga3PDH_A clonada en el vector pETDUET smc 2 (Tabla 3) la cual no contiene etiqueta de *His* incorporada. En este caso, las células se resuspendieron en *Buffer A* [50 mM MOPS pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ y 5% (p/v) de sacarosa] y se lisaron por ultrasonido. Se centrifugó a 16.000 xg durante 20 min hasta obtener un sobrenadante limpio de partículas en suspensión. La fracción soluble se sometió a una precipitación salina sucesiva, entre 30 y 80 % utilizando (NH₄)₂SO₄. Luego se probaron diferentes protocolos con las fracciones obtenidas:

- se lavaron con *Buffer A* empleando un dispositivo de ultracentrifugación.
- se sembraron en una columna de filtración por gel (*Superdex 200 5/100 Tricon*).
- se sembraron en una columna de fenilsefarosa equilibrada con *Buffer C* [*Buffer A* con 1 M de (NH₄)₂SO₄].

En todos los casos se determinó actividad enzimática y se analizó el perfil proteico obtenido mediante electroforesis (SDS-PAGE 12%).

Filtración por gel

La masa molecular de las proteínas se determinó utilizando una columna de *Superdex 200 5/100 Tricorn* (GE Healthcare) equilibrada con solución G (50 mM HEPES pH 8,0 y 100 mM NaCl). LA curva de calibrado se determinó utilizando proteínas estándar de masa molecular conocida (ovoalbúmina, 43 kDa; conalbúmina, 75 kDa; aldolasa, 158 kDa, ferritina, 440 kDa y tiroglobulina, 669 kDa; GE Healthcare). El volumen V_0 fue determinado utilizando Azul de Dextrano (Promega).

Disrupción y extracción proteica en células de *Chlorella spp.*

Las células obtenidas durante el crecimiento autotrófico y/o heterotrófico se pulverizaron con N_2 líquido en un mortero. El polvo obtenido se transfirió a un tubo eppendorf el cual contenía un volumen de *buffer* de extracción de 2 μ l por mg de biomasa húmeda (10% (v/v) Glicerol, 0,25% (p/v) BSA, 0,1% (v/v) Tritón-X100, 50 mM Hepes/KOH pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMFS y 1 mM DTT). Luego de mezclar empleamos un vórtice, los tubos se centrifugaron a 13.000 xg y 4 °C. Las fracciones solubles obtenidas se conservaron a 4 °C mientras se determinó la actividad enzimática correspondiente.

Metodología de análisis enzimático

Medida de actividad de las deshidrogenasas (DHasas)

Para medir la actividad de las enzimas Ga3PDHase, np-Ga3PDHase, Ga3PDHaseA/B y la SSADHase se hizo uso de la propiedad diferencial que tiene la coenzima $NAD(P)^+$ y su par reducido, $NAD(P)H$, en su espectro de absorción a 340 nm, longitud a la cual sólo absorbe la forma reducida. De esta manera se puede seguir la actividad de una enzima que utiliza el cofactor $NAD(P)^+$, por aumento de la absorción a 340 nm en un espectrofotómetro. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir/consumir 1 μ mol de producto/sustrato en 1 min bajo las condiciones específicas para cada ensayo. Para calcular la concentración del $NAD(P)H$ generado en el medio de reacción se utilizó su coeficiente de absorción molar a 340 nm de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Medida de actividad Ga3PDHasa

Para determinar la actividad de la enzima Ga3PDHasa en dirección de la reducción del NAD⁺ se utilizó un medio de reacción que contenía: 50 mM Tricina-NaOH pH 8,5, 1,5 mM NAD⁺, 10 mM AsO₄Na₃, 2,4 mM Fru1,6bisP, 0,4 U aldolasa (Sigma) y una cantidad adecuada de enzima, a menos que se indique lo contrario. Cuando se empleó D/L Ga3P, la aldolasa y Fru1,6bisP no se agregaron a la mezcla de reacción. Para la reacción en sentido de la oxidación del NADH se empleó: 8 mM ATP, MgSO₄ y 3PGA, 1,5 mM NADH, 1 U/ml PGK y una cantidad adecuada de enzima. Las reacciones se iniciaron, en todos los casos, por el agregado del sustrato Fru1,6bisP, (D o L)-Ga3P o ATP, según corresponda, y se registró la reducción/oxidación del NAD⁺/NADH a 340 nm a 30 °C.

Medida de actividad np-Ga3PDHasa

Para determinar la actividad de la enzima np-Ga3PDHasa se utilizó un medio de reacción que contenía: 50 mM Tricina-NaOH pH 8,5, 2,4 mM Fru1,6bisP, 1 U aldolasa (Sigma), 1,5 mM NADP⁺ y una cantidad adecuada de enzima, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones se iniciaron, en todos los casos, por el agregado de Fru1,6bisP y se registró la reducción del NADP⁺ a 340 nm a 30 °C.

Medida de actividad Ga3PDHasa A y B

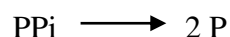
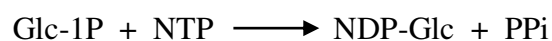
Para determinar la actividad de las enzimas Ga3PDHasa A y B en dirección de la reducción del NADP⁺ se utilizó un medio de reacción que contenía: 50 mM Tricina-NaOH pH 8,5, 1,5 mM NADP⁺, 2,4 mM Fru1,6bisP, 0,4 U aldolasa (Sigma) y una cantidad adecuada de enzima, a menos que se indique lo contrario. Cuando se empleó (D o L)-Ga3P, la aldolasa y Fru1,6bisP no se agregaron a la mezcla de reacción. Para la reacción en sentido de la oxidación del NADPH se empleó: 8 mM ATP, MgSO₄ y 3PGA, 1,5 mM NADH, 1 U/ml PGK y una cantidad adecuada de enzima. Las reacciones se iniciaron, en todos los casos, por el agregado del sustrato Fru1,6bisP, (D o L)-Ga3P o ATP, según corresponda, y se registró la reducción/oxidación del NADP⁺/NADPH a 340 nm a 30 °C.

Medida de actividad ADP-Glc PPasa

La determinación de la actividad de la ADP-Glc PPasa se realizó en sentido de síntesis de ADP-Glc, empleando el método colorimétrico desarrollado en nuestro laboratorio. Este método se

basa en la cuantificación de Pi mediante una reacción de color con el acople Verde de Malaquita-molibdato de amonio. El Pi medido es generado por hidrólisis enzimática del PPi a expensas de una reacción acoplada, catalizada por la pirofosfatasa inorgánica (PPasa, pirofosfato:fosfohidrolasa, EC 3.6.1.1). El PPi, es producto de la reacción de síntesis de NDP-Glc llevada a cabo por las NDP-Glc PPasas[108].

Las reacciones acopladas del método de medida son:



Una unidad (U) de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que cataliza la síntesis de 1 μmol de producto por min, en las condiciones especificadas.

La determinación de la medida de actividad se realizó a 37 °C en un volumen final de 50 μl , donde la mezcla de reacción estándar contenía: 100 mM MOPS pH 8, 5 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 5 mM 3PGA, 0,2 mg/ml BSA, 0,5 U/ml PPasa obtenida en nuestro laboratorio, 1 mM ATP y una cantidad adecuada de enzima. La reacción se inició con el agregado de 1 mM de Glc-1P y se incubó durante 10 min. La reacción se detuvo con la adición de 375 μl del reactivo de color (ver composición más abajo), seguido por el agregado de 50 μl de 34% (p/v) citrato de sodio. Una alícuota de 250 μl de esta mezcla previamente homogeneizada se dispensó en policubetas y se determinó la absorbancia a 630 nm en un lector de ELISA Microplate Photometer Miltiskan Ascent (Thermo Scientific). Paralelamente a la determinación se estableció una curva de calibrado con testigos de PPi tratados con PPasa en el mismo medio de reacción que las muestras y se obtuvo el factor de conversión de DO a nmoles. El reactivo de color se preparó mezclando 3 volúmenes de Verde de Malaquita (Sigma) al 0,045% (p/v) y 1 volumen de molibdato de amonio al 4,2% (p/v) en 5 N HCl. Luego de homogeneizar durante 30 min y filtrar, a 5 ml de la solución obtenida se le adicionaron 100 μl de Tween20 al 2% (v/v) [108].

Caracterización cinética de las enzimas en estudio

Para determinar los parámetros cinéticos de las enzimas en estudio se realizaron curvas de saturación de actividad enzimática en presencia de una concentración fija de uno de los sustratos y concentraciones variables del sustrato analizado. Los datos cinéticos obtenidos se graficaron como velocidad inicial en U/mg versus la concentración del sustrato variable en μM o mM. Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal utilizando la

ecuación de Hill y el programa informático Origin™ 7.0. Los valores obtenidos implican un promedio de un mínimo de tres determinaciones independientes que fueran reproducibles dentro de un marco de variación de $\pm 10\%$.

Análisis cinético

Los datos de actividad enzimática se graficaron en función de la concentración de sustrato o efector y fueron ajustados a distintos modelos de ecuaciones con el programa Origin 8.1 (OriginLab). Para el caso del cálculo de constantes cinéticas, se ajustaron los datos experimentales a la ecuación de Hill: $v = V_{\max}S^{nH}/(S_{0,5}^{nH} + S^{nH})$; donde $S_{0,5}$ es la concentración de sustrato (S) que produce el 50 % de la velocidad máxima (V_{\max}), y nH es el coeficiente de Hill [109]. Una vez verificado un comportamiento hiperbólico (nH no significativamente distinto de 1), el $S_{0,5}$ es equivalente a los valores de K_m determinados. Los valores de las constantes cinéticas son el resultado de al menos tres determinaciones con una variación menor al 10 %. Los valores de las mismas se expresan \pm su error estándar.

Resultados

Cultivo de distintas especies de *Chlorella* en condiciones autotróficas y heterotróficas

Chlorella es un alga con capacidad de sintetizar ácidos grasos de interés industrial, de rápido crecimiento y se adapta a diferentes fuentes de carbono y energía tanto en condiciones autotróficas, heterotróficas e inclusive, mixotróficas. Por este motivo, y con el objetivo de comprender mejor sus adaptaciones metabólicas frente a diferentes condiciones de cultivo, seleccionamos algunas especies de *Chlorella* que disponíamos, las cultivamos en diferentes condiciones tróficas y caracterizamos el cultivo determinando: su crecimiento celular (calculando la velocidad específica de crecimiento μ , que es el tiempo en el que el cultivo alcanza la fase exponencial y estacionaria del crecimiento), la concentración celular máxima y la concentración de almidón, ácidos grasos (TAG) y proteínas. Luego de conocer estas características, escalamos los cultivos en las condiciones adecuadas y utilizamos la biomasa obtenida para determinar la actividad de algunas enzimas de relevancia en la partición del carbono intracelular.

Caracterización de los cultivos de *Chlorella* sp.

Las células de *Chlorella* sp. UTEX LB 1822 se cultivaron en condiciones autotróficas utilizando el medio de cultivo BOLD3N y en condiciones heterotróficas en el medio M16. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers en condiciones estáticas a 23-25 °C con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h para las condiciones autotróficas o en total oscuridad para la condición heterotrófica. Se tomaron muestras del cultivo cada 24 h y se realizó un recuento celular empleando una cámara de Neubauer hasta que cada cultivo llegó a la fase estacionaria. En la Figura 13 se muestran las cinéticas de crecimiento celular para cada condición de cultivo.

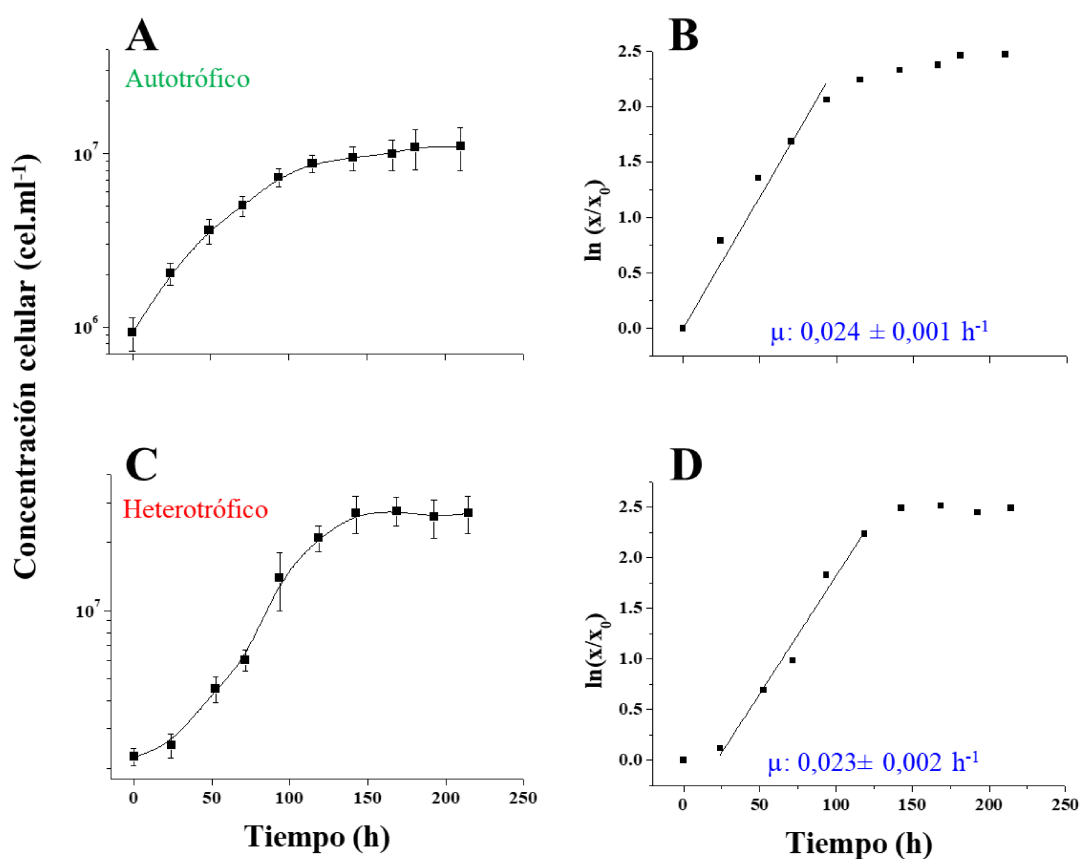


Figura 13. Estudio del crecimiento celular de *Chlorella* sp. Cinética de proliferación celular (A y C) y cálculo de la velocidad específica ($\mu = [\ln(x/x_0)/t]$), B y D) para células de *Chlorella* sp. crecidas en condiciones autotróficas (BOLD3N; A y B) y heterotróficas (M16, C y D).

En la Figura 13 A se representa la proliferación celular de *Chlorella* sp. en cultivo autotrófico. En este gráfico se puede observar que las células crecieron en forma exponencial durante 100 h a una

velocidad de crecimiento de $0,024 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$ y al momento de comenzar la fase estacionaria se obtuvo una concentración celular de $1 \times 10^7 \text{ cel/ml}$. En el cultivo heterotrófico (Figura 13 C), se puede observar que durante las primeras 24 h las células crecieron a una menor velocidad (fase de latencia) y luego entraron en la fase de crecimiento exponencial durante 120 h con una velocidad específica de crecimiento de $0,023 \pm 0.002 \text{ h}^{-1}$. A comienzos de la fase estacionaria, el cultivo heterotrófico alcanzó una concentración celular máxima de $2,7 \times 10^7 \text{ cel/ml}$, el doble que la alcanzada en condiciones autotróficas. Conocidos estos parámetros, se escalaron los cultivos de *Chlorella* sp. en idénticas condiciones y al finalizar la fase exponencial, se tomó una alícuota de cultivo para observarlas al microscopio, la biomasa restante se cosechó y conservó a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para análisis posteriores.

Con el fin de evaluar la acumulación de lípidos en las células, se realizó un ensayo cualitativo empleando un microscopio de epifluorescencia y el colorante fluorescente Rojo Nilo que puede unirse a los ácidos grasos de manera específica. Como puede observarse en la Figura 14 B, en las células crecidas en condiciones heterotróficas aparecen partículas esféricas, fluorescentes, formadas por lípidos neutros, que están ausentes en las células crecidas en condiciones autotróficas (Figura 14 A). Además, cuando se determinó cuantitativamente la concentración de TAG y almidón en ambos cultivos (Figura 14 C), resultó que la cantidad de TAG es tres veces mayor en las condiciones heterotróficas y va en detrimento del contenido de almidón, que disminuyó en la misma proporción cuando se comparan con los valores obtenidos para la condición autotrófica.

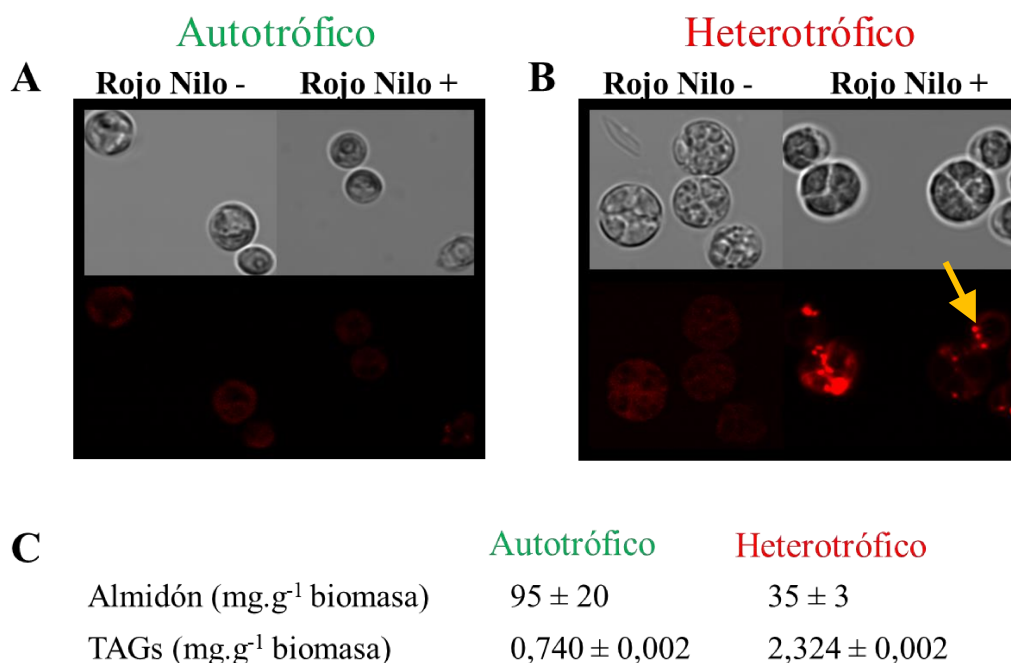


Figura 14. Ensayo cualitativo y cuantitativo de los compuestos de reserva en *Chlorella* sp. Microfotografías obtenidas por microscopía de epifluorescencia de células de *Chlorella* sp. crecidas en condiciones autotróficas (A) o heterotróficas (B), observadas en campo claro (superior) y teñidas con Rojo Nilo (inferior). (C) Contenido de almidón y TAG de las mismas células determinados por técnicas cuantitativas. Flecha amarilla: partícula de TAG teñida con el colorante fluorescente Rojo Nilo.

Caracterización comparativa de los cultivos de *Chlorella* sp., *C. protothecoides*, *C. saccharophila* y *C. vulgaris*

Particularmente entre las distintas especies de *Chlorella* se han observado diferencias en la concentración y característica fisicoquímica de los compuestos de reserva [79] [91] [110] [111] [112] [113] [114] [115]. Además, esto depende de las condiciones de cultivo. Específicamente, en trabajos anteriores se pudo determinar que la acumulación de lípidos en *C. protothecoides* es entre 11-59% [110] [79] [111] [112], en *C. pyrenoidosa* 27% [113] [114], en *C. sorokiniana* 13-23% [91] y en *C. saccharophila* 18-54% [115].

Para determinar las características de los cultivos de *Chlorella* sp. (*Csp*), *C. protothecoides* (*Cpr*), *C. saccharophila* (*Csa*) y *C. vulgaris* (*Cvu*) en forma comparativa, se las cultivó en condiciones

autotróficas empleando el medio de cultivo GOLGI y en condiciones heterotróficas empleando el medio de cultivo ENVA. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers en condiciones agitadas y con ciclos de 16/8 h de luz/oscuridad en el caso de los cultivos autotróficos y en oscuridad absoluta para los cultivos heterotróficos. En la Figura 15 A se puede observar el aspecto de los cultivos de cada cepa en las dos condiciones de cultivo. En las condiciones heterotróficas, *Cpr* y *Csa* presentaron una coloración amarillo pálido, a diferencia de *Cvu* y *Csp* que mantuvieron el mismo color verde que todas tienen en condiciones autotróficas. Esta diferencia de color, podría atribuirse a que en ausencia de luz, *Cpr* y *Csa* no sintetizan la clorofila requerida para el proceso de fotosíntesis, mientras que esto no resulta evidente a simple vista en *Cvu* y *Csp*.

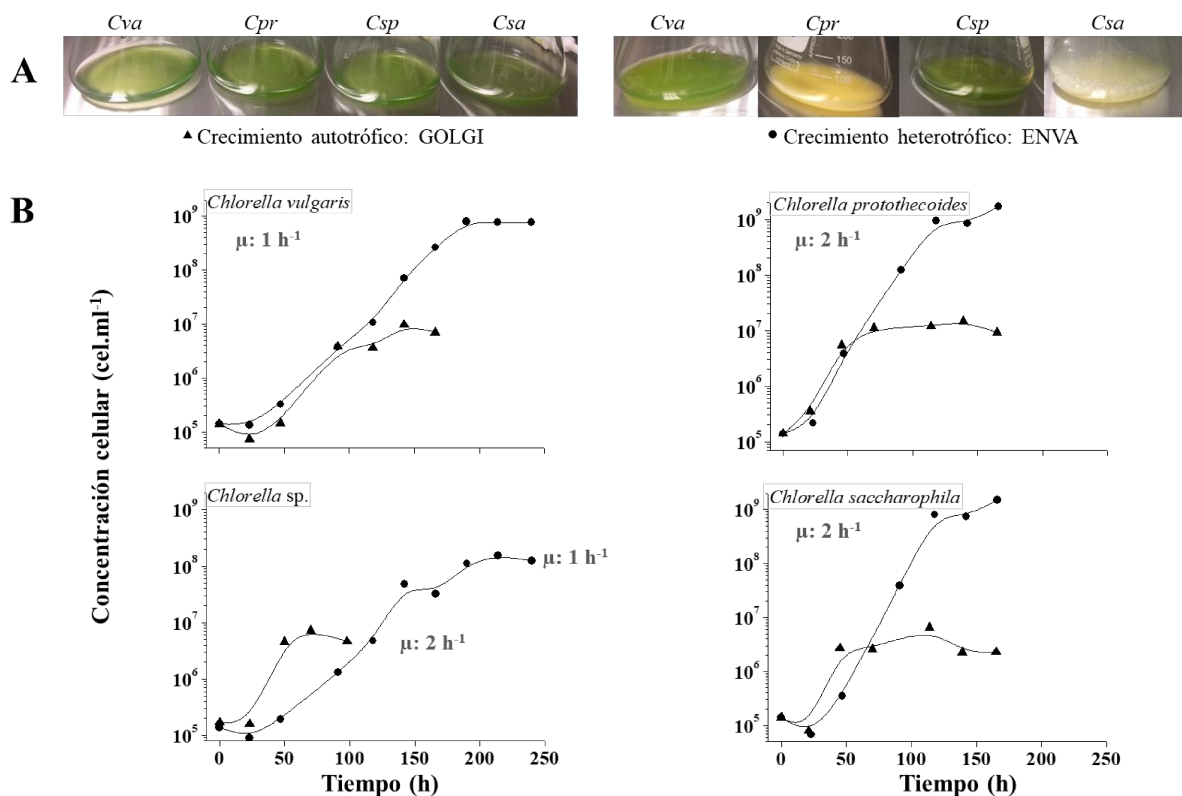


Figura 15. Características de los cultivos de *C. vulgaris* (*Cva*), *C. protothecoides* (*Cpr*), *C. sp.* (*Csp*) y *C. saccharophila* (*Csa*). (A) Fotografía de los cultivos de las células creciendo en condiciones autotróficas (izquierda) y heterotróficas (derecha). (B) Cinética de proliferación celular y velocidad específica de crecimiento (μ) de los cultivos en condiciones autotróficas (triángulo) y heterotróficas (círculo).

Durante el cultivo, se tomaron muestras cada 24 h y se realizó recuento celular empleando una cámara de Neubauer. En la Figura 15 B se puede observar, para cada cepa y cada condición de cultivo, las concentraciones celulares obtenidas en el tiempo. En todos los casos, las células presentaron una fase de latencia durante las primeras 24 h. En condiciones heterotróficas, *Cpr* y *Csa*

presentaron el doble de velocidad específica de crecimiento (μ) que *Cvu* y *Csp* en las mismas condiciones. *Cpr* y *Csa* crecieron exponencialmente por 100 h donde alcanzaron concentraciones celulares finales de 1×10^9 cel/ml, mientras que *Cvu* y *Csp*, tuvieron una fase exponencial de crecimiento extendida que fue de 190 h, que finalmente permitió alcanzar densidades celulares de 1×10^8 cel/ml. Los resultados indican que *Cpr* y *Csa*, lograron alcanzar una concentración celular en condiciones heterotróficas un orden de magnitud mayor que *Cvu* y *Csp*. En condiciones autotróficas, *Csp*, *Cpr* y *Csa* presentaron una fase de crecimiento exponencial de 25 h, logrando una concentración celular máxima de 5×10^6 , 1×10^7 y 3×10^6 cel/ml, respectivamente. En esas mismas condiciones, *Cvu* creció exponencialmente por 75 h, alcanzando una concentración máxima de 5×10^6 cel/ml. Luego de caracterizar el crecimiento celular, se escalaron los cultivos en las mismas condiciones con el fin de obtener biomasa. Las células cosechadas se dividieron a fin de tener muestras para observar al microscopio, determinar contenido de almidón, lípidos y proteínas, y la fracción restante se conservó a -80 °C para posteriores análisis.

En la Figura 16 A se muestran los resultados de la cuantificación de los componentes celulares: TAG, almidón y proteínas para cada una de las cepas en ambas condiciones de cultivo. Como se observa en la Figura 16 A, en condiciones autotróficas *Cvu* acumuló ~ 70 veces más TAG que las cepas restantes, mientras que en condiciones heterotróficas *Csa*, *Cpr* y *Cvu* presentaron un contenido de TAG un orden de magnitud mayor que *Csp*. Respecto al contenido de almidón (Figura 16 B), *Cvu* y *Csp* acumularon en promedio ~ 6 veces más almidón que *Csa* y *Cpr* en cualquiera de las condiciones de cultivo. En el caso del contenido proteico (Figura 16 C), *Csp* contiene en promedio ~ 4 veces más proteínas que las cepas restantes en ambas condiciones de cultivo.

Tomando cada cepa en particular:

-*Csa* acumuló ~ 55 veces más TAG y ~ 4 veces menos almidón en condiciones heterotróficas, mientras que las proteínas se mantuvieron en concentraciones similares en ambas condiciones de cultivo.

-*Cpr* acumuló ~ 17 veces más TAG, ~ 4 veces menos almidón y ~ 4 veces menos proteínas en condiciones heterotróficas.

-*Cvu* acumuló cantidades similares de TAG y almidón en ambas condiciones de cultivo y ~ 4 veces más proteínas en condiciones heterotróficas.

-*Csp* acumuló cantidades similares de TAG, almidón y proteínas en ambas condiciones de cultivo.

Las algas, generalmente, presentan mayor velocidad de crecimiento [93] [116] y productividad de lípidos [29] [111] [116] en condiciones heterotróficas. La variabilidad en el perfil de acumulación

de compuestos de reserva de cada especie de *Chlorella* se ha demostrado anteriormente, siendo tanto el contenido de lípidos como el perfil de ácidos grasos de las algas variable entre especies y en función de las condiciones del cultivo [79] [117] [118] [119] [120], del período de cosecha y la edad del cultivo [121] [122]. Los resultados indican que dependiendo el tipo de producto que se quiere obtener y las condiciones de cultivo que se puedan utilizar, deberá elegirse una u otra especie de *Chlorella* ya que no es indistinto y todas presentan perfiles de acumulación de reservas particulares.

Una característica ventajosa del trabajo con algas es la capacidad que tienen las mismas de cambiar rápidamente la forma de almacenamiento de energía entre almidón/lípido [123]. En el caso de *Csa* y *Cpr*, ambas especies tienen un mayor contenido de TAG en condiciones heterotróficas y esto va en detrimento de las concentraciones de almidón, e incluso de proteínas. A su vez, para *Csa* y *Cpr* el contenido de almidón fue ~4 veces mayor cuando se cultivaron en condiciones autotróficas. Otro de los compuestos sintetizados por las algas y con interés comercial son las proteínas. *Chlorella* se ha convertido en un alga dominante comercialmente por su uso como fuente de nutraceuticos y de proteínas funcionales o antígenos de vacunas [124]. El contenido proteico total en *Chlorella* sp. resultó ~4 veces mayor que el de las demás especies, sin embargo esta fue la especie con menor contenido de TAG en cualquiera de las condiciones de cultivo. En comparación con las plantas superiores, la biosíntesis de almidón y lípidos ha sido menos estudiada en microalgas. Entender la partición del carbono entre lípidos y/o almidón podría ser significativo para el desarrollo de cepas que acumulen discriminadamente uno u otro tipo de compuesto de reserva con vista a su aplicación a nivel industrial para la producción de biocombustibles. Los resultados obtenidos en estos estudios enfatizan la importancia de caracterizar el metabolismo del carbono en microalgas, lo cual permitirá la manipulación genética racional y fundada de estos organismos partiendo de una análisis integral de las enzimas y vías metabólicas involucradas, conociendo cómo se modifican en relación a cambios en las condiciones de cultivo y su relación con los rendimientos en la producción de lípidos y de carbohidratos.

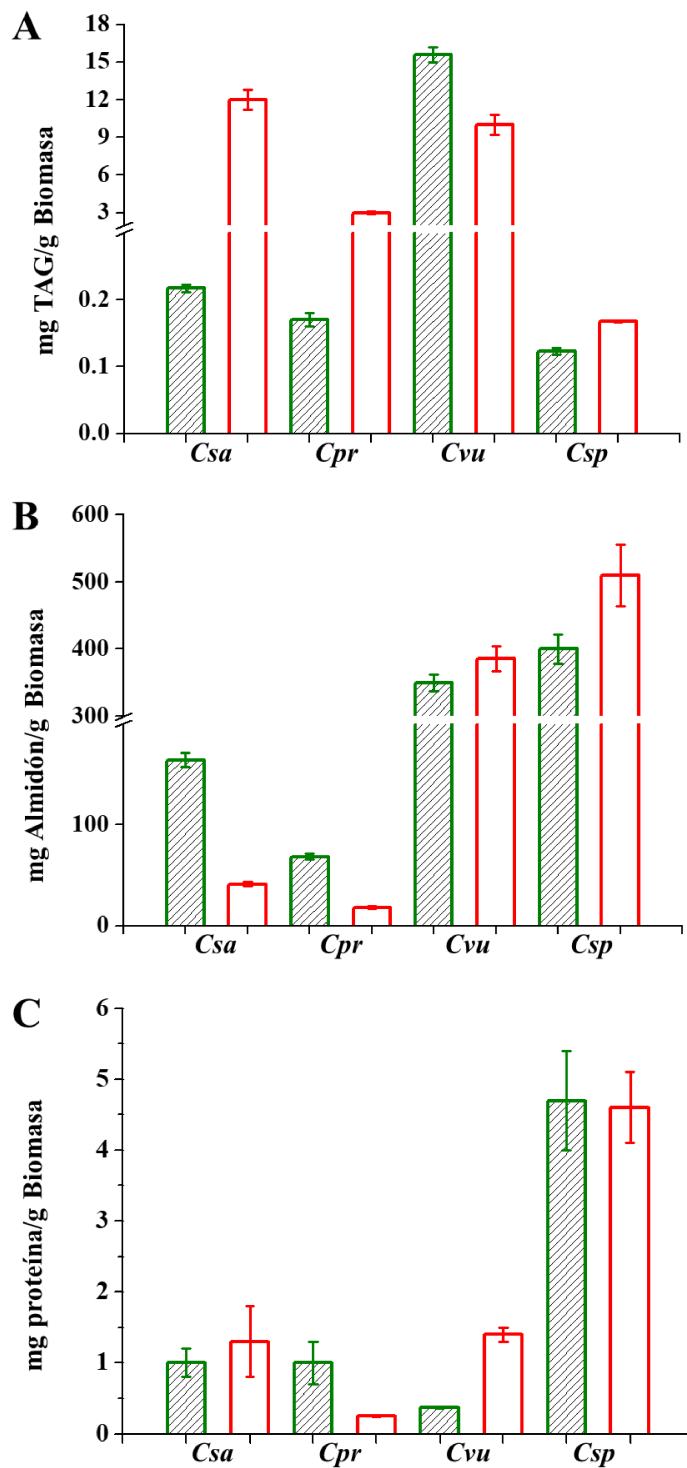


Figura 16. Análisis de los compuestos de reserva en *Chlorella* spp. Cuantificación del contenido de TAG (A), almidón (B) y proteínas totales (C) en células de *Chlorella saccharophila* (*Csa*), *C. protothecoides* (*Cpr*), *C. vulgaris* (*Cva*) y *C. sp.* (*Csp*) crecidas en condiciones autotróficas (barras verdes) y heterotróficas (barras rojas).

Determinación de la actividad de distintas enzimas de *Chlorella* spp.

Para avanzar en la comprensión del metabolismo de *Chlorella* en diferentes condiciones de cultivo y tener evidencias de cómo se modifican las actividades de algunas enzimas y su relación con la acumulación de compuestos de reserva (TAG y almidón), nos propusimos caracterizar enzimas del metabolismo del carbono. Por un lado, ensayamos sus actividades en extractos proteicos de células de *Chlorella* spp. crecidas en diferentes condiciones tróficas y determinamos por inmunodetección la presencia de tales proteínas. Además, a las enzimas que nos interesaban estudiar las clonamos, expresamos en forma recombinante. Las enzimas que pudimos producir en forma recombinante fueron purificadas y caracterizadas en sus propiedades cinéticas y estructurales.

Determinación de la actividad de enzimas en extractos de *Chlorella* spp.

La gran variabilidad que han demostrado las diferentes especies de *Chlorella* en el tipo de compuesto de reserva que acumulan es reflejo de modificaciones del flujo de carbono y energía entre diferentes vías metabólicas. Para avanzar en el entendimiento de los cambios en las actividades de determinadas enzimas en respuesta a las condiciones de cultivo y poder inferir su impacto en la acumulación de un tipo u otro de compuesto de reserva, medimos la actividad y determinamos la presencia por inmunodetección de las mismas. Específicamente, analizamos tres enzimas: Ga3PDHasa (GapC, EC 1.2.1.12), np-Ga3PDHasa (GapN, EC 1.2.1.9) y ADP-Glc PPasa (EC 2.7.7.27). A partir de las células lisadas de *Chlorella* sp. crecidas en condiciones auto y heterotróficas, se realizó una extracción proteica en medios adecuados específicos para poder mantener activas a cada una de las enzimas de interés.

Los resultados de los valores de actividad enzimática se muestran en la Tabla 4. La actividad de las enzimas se expresó como unidades por mg de proteínas totales. A partir de los resultados obtenidos, se puede remarcar que la actividad de la ADP-Glc PPasa fue ~4 veces mayor en los extractos de *Chlorella* sp. cultivadas en condiciones autotróficas, en comparación con las células crecidas heterotróficamente. Si relacionamos esto con la determinación del contenido de TAG y almidón (Figura 12 B), se podría concluir que el aumento de la actividad de la ADP-Glc PPasa en las células crecidas en condiciones autotróficas impacta en una mayor acumulación de almidón (~3 veces más) cuando se compara con lo cuantificado en condiciones heterotróficas. Además, se puede resaltar que esto impacta de manera negativa en la acumulación de TAG, que es menor (~3 veces) en condiciones autotróficas. Por su parte, la actividad de la Ga3PDHasa fue ~6 veces mayor en condiciones heterotróficas. En sentido contrario a como impacta la actividad de la ADP-Glc PPasa,

un aumento en la actividad de la Ga3PDHase resulta en una mayor acumulación de TAG y menor acumulación de almidón en condiciones heterotróficas. Con respecto a la np-Ga3PDHase sólo pudo detectarse actividad de la enzima en condiciones autotróficas, mientras que la actividad de la Ga3PDHaseA se mantuvo similar en ambas condiciones de cultivo (Tabla 4).

Los resultados obtenidos, concuerdan con los publicados por otros autores que han observado que: (I) una inactivación del gen que codifica para la ADP-Glc PPase en *Chlamydomonas reinhardtii* resulta en un aumento de ~10 veces en la cantidad de TAG en condiciones autotróficas [100]; y (II) en *Chlorella fusca*, la presencia de glucosa en el medio de cultivo (condición similar a lo que ocurre en condiciones heterotróficas) resulta en una disminución de la actividad de la np-Ga3PDHase [92].

En la Figura 17 pueden observarse los perfiles proteicos y la inmunodetección de la ADP-Glc PPase, np-Ga3PDHase y Ga3PDHase en los extractos de células de *Chlorella* sp. cultivadas en condiciones autotróficas y heterotróficas. En la Figura 17 A, los anticuerpos específicos para la ADP-Glc PPase (obtenidos utilizando como antígeno la enzima heterotetramérica de hojas de espinaca) reconocen tres polipeptidos en el extracto proveniente del cultivo heterotrófico, mientras que reconocen sólo dos en el proveniente de las condiciones de cultivo autotróficas. Cabe señalar que las células presentan mayor actividad ADP-Glc PPase en las condiciones autotróficas. En la Figura 17 B, cuando se utilizaron anticuerpos específicos para la np-Ga3PDHase, puede observarse en los extractos provenientes del cultivo autotrófico un polipéptido (~50 kDa) que está marcadamente disminuido en las condiciones heterotróficas, en las cuales tampoco pudo detectarse actividad de esta enzima. Por último, en la Figura 17 C, donde se utilizaron anticuerpos específicos para la Ga3PDHase, se pueden observar en los extractos provenientes de condiciones autotróficas dos polipéptidos para la Ga3PDHase; mientras que se detecta sólo uno para la condición heterotrófica. Esta última condición corresponde a la que pudo determinarse mayor actividad de esta enzima. En la Figura 17 D se muestra un gel idéntico a los utilizados para cada una de las inmunodetecciones pero teñido con coomassie blue. Los resultados obtenidos muestran que en *Chlorella* sp., tanto las actividades de las enzimas estudiadas como los perfiles de expresión de las mismas, varían según las condiciones de cultivo y estas diferencias impactan en los perfiles de acumulación de compuestos de reserva y en la velocidad de crecimiento celular.

	Actividad (U/mg)	
	Heterotrófico	Autotrófico
ADP-glc PPasa	63 ± 2	282 ± 5
GapC	1080 ± 50	174 ± 15
GapN	no detectado	14 ± 2
GapA	97 ± 10	122 ± 14

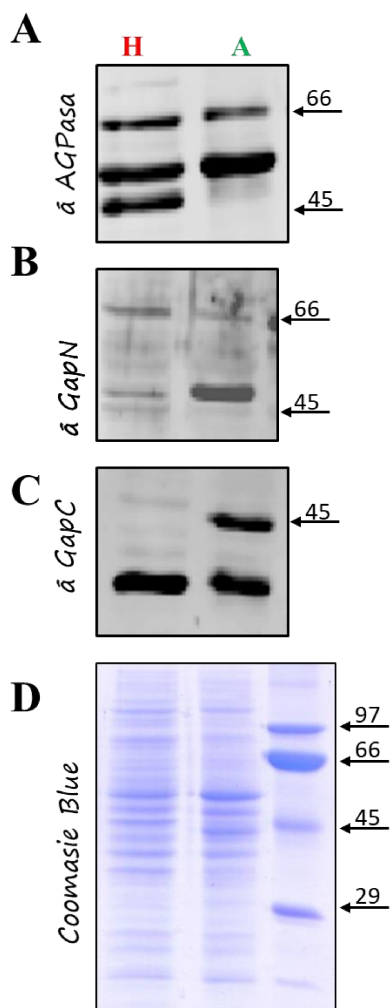


Figura 17. Inmunodetección en extractos crudos de *Chlorella* sp. Las proteínas en los extractos fueron separadas electroforéticamente mediante SDS-PAGE 12%, luego electrotransferidas y analizadas utilizando anticuerpos contra (A) AGPasa: ADP-Glc PPasa, (B) GapN: np-Ga3PDHasa y (C) GapC, Ga3PDHasa. Las cantidades de proteínas totales se encuentran normalizadas.

Teniendo en cuenta lo arriba detallado, decidimos evaluar el comportamiento de la Ga3PDHasa durante todo el período de cultivo, es decir desde el momento de ser inoculados hasta el inicio de la fase de crecimiento estacionario. Para poder realizar este estudio comparativo, ambos cultivos se

inocularon con 1×10^6 células provenientes de un cultivo autotrófico y se tomaron muestras cada 24 h hasta alcanzar la fase estacionaria. A cada muestra se le realizó recuento celular y luego se extrajeron las proteínas totales. A partir de las muestras obtenidas, se determinó la actividad enzimática de la Ga3PDHasa (U/mg) y se realizó una inmunodetección (Figura 18). Como puede observarse en el gráfico de la Figura 18 A, ambos cultivos comienzan con una actividad Ga3PDHasa similar y se pudo detectar dos polipéptidos para la enzima al momento del inóculo. Luego, en condiciones heterotróficas, la actividad de la enzima comenzó a aumentar con el tiempo de cultivo, alcanzando una actividad hasta ~ 4 veces mayor que la inicial. Sin embargo, en condiciones autotróficas la actividad de la enzima se mantuvo prácticamente invariable a lo largo del cultivo e incluso disminuyó hacia el final del mismo.

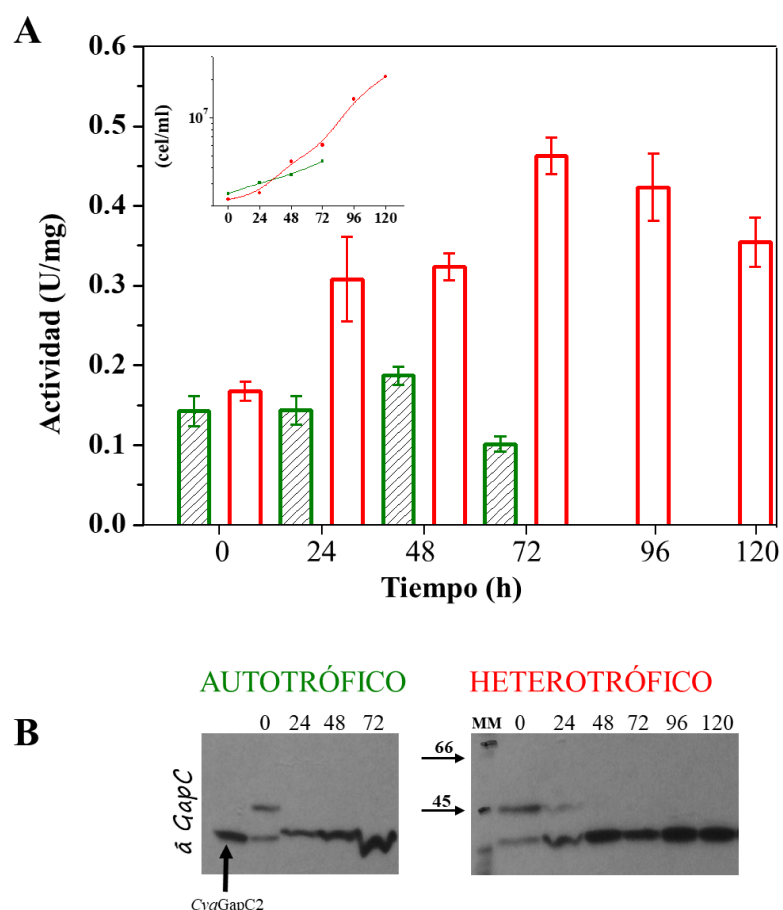


Figura 18. Análisis de la Ga3PDHase en extractos proteicos de *Chlorella* sp. Perfiles de actividad (A) e inmunodetección (B) de la Ga3PDHase en extractos proteicos provenientes de células de *Chlorella* sp. cultivadas en condiciones autotróficas (verde) y heterotróficas (rojo). La Figura inserta en A, muestra las curvas de crecimiento obtenidas por recuento celular en cada una de las condiciones de cultivo.

Los resultados obtenidos indican que la actividad de la Ga3PDHase aumenta cuando las células se cultivan en condiciones heterotróficas y que lo observado anteriormente es un cambio metabólico que ocurre en respuesta a las condiciones de cultivo. Esto, a su vez, impacta en el tipo de compuesto de reserva que las células acumulan, favoreciendo la síntesis de TAG en detrimento de la síntesis de almidón. No resulta evidente si la adaptación metabólica responde a un aumento en la cantidad de enzima que se expresa, si hay más de una isoforma de la enzima que se están expresando diferencialmente o si responde a otro tipo de regulación posttraduccional de la misma. El tipo de cambio que ocurre en esta enzima en función de las condiciones de cultivo resulta interesante para investigar en trabajos futuros.

Clonado, expresión heteróloga, producción recombinante y caracterización de enzimas de *Chlorella* sp. involucradas en el metabolismo del carbono.

Para avanzar en la caracterización cinética de enzimas que participan en la partición de carbono en *Chlorella* sp. diseñamos la obtención de las mismas en forma recombinante, utilizando *E. coli* como huésped de expresión. Esto facilita la obtención de las enzimas en grandes cantidades y permite incorporar etiquetas que facilitan el proceso de purificación. Para lograr este objetivo, comenzamos haciendo una búsqueda en las bases de datos de secuencias de ADN los genes que codifican para la ADP-Glc PPasa, np-Ga3PDHase, Ga3PDHase y Ga3PDHaseA en *Chlorella* spp. Para esta búsqueda seleccionamos secuencias de proteínas homólogas ya caracterizadas en *Arabidopsis thaliana* o las provenientes de *Chlamydomonas reinhardtii* y las usamos como molde para encontrar por similitud de secuencias las proteínas y los genes correspondientes. Las secuencias encontradas, que se detallarán más adelante en este capítulo, pertenecían a secuencias putativas provenientes de *Chlorella variabilis*. A partir de estas secuencias de ADN, diseñamos oligonucleótidos específicos que nos permitieran amplificar los genes a partir del mRNA extraído (y copiado a ADN) de *Chlorella* sp.

Extracción de RNA

En primer lugar, se tuvieron que evaluar diferentes técnicas de extracción del ARNm a partir de células crecidas en diferentes condiciones tróficas. Para la extracción de ARNm de células de *Chlorella* sp. crecidas en condiciones heterotróficas, fue más efectivo el uso de fenol ácido (F) en lugar de Trizol (T) (Figura 19 A). A partir del ADNc obtenido, se realizó una PCR para amplificar con oligonucleótidos específicos de la ACTINA2 (proteína de expresión constitutiva) como un gen que nos permitiera evaluar la calidad del ARNm extraído. En ambos tipos de extracción se pudo

amplificar el gen que codifica para la actina, con mejores resultados de amplificación en la extracción de ARNm con fenol ácido (Figura 19 B). A partir de estos resultados, se prosiguió con la amplificación de los genes de interés utilizando el ADNc obtenido a partir del ARNm extraído con fenol ácido. Sin embargo, y a pesar de haber evaluado una gran cantidad de condiciones de reacción, ninguno de los genes de interés se logró amplificar. Por este motivo, y para poder continuar con este objetivo, se decidió enviar a sintetizar los genes *de novo* por síntesis química.

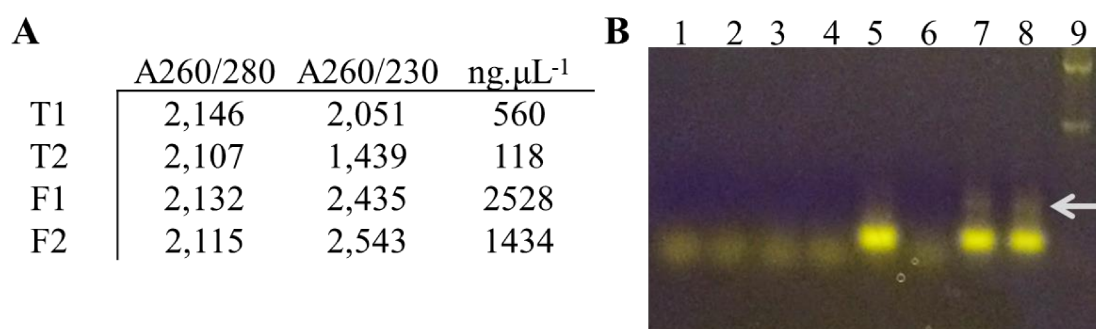


Figura 19. Evaluación del ARN extraído de células de *Chlorella* sp. (A) Cuantificación de ARN en NanoDrop2000 para las muestras extraídas de células de *Chlorella* sp. mediante técnica de trizol (T1 y T2) y fenol ácido (F1 y F2). (B) Amplificación de la ACTINA2 mediante PCR a partir de el ADNc obtenido con el ARNm extraído con Trizol (calle 5) o fenól ácido (calle 7y 8). Las reacciones de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1 %. Blancos de reacción para cada ADNc en los que no se adicionó ADN polimerasa (Calles 1-4), blanco de reactivos sin ADNc (calle 6), marcador de masa molecular λ Hind (calle 9). La flecha señala el producto de PCR correspondiente a la amplificación del gen *ACTINA2*.

Para sintetizar los genes de manera química, se consideró como estrategia de clonado diseñar los mismos de manera de poder insertarlos en alguno de los sitios de multiple clonado (smc) del vector pETDuet-1, que permite expresarlos en *E. coli* y en el smc del vector p_Chlamy3, el que es de utilidad para la expresión en *Chlamydomonas* y *Chlorella*. Para clonar en el smc1 del vector pETDuet-1, se incorporaron los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI/*Not*I; excepto para el gen GapC2, al que se le adicionaron los sitios de restricción para *Bam*HI/*Hind*III. Para subclonar en el smc2 del pETDuet-1, se adicionaron los sitios de restricción para *Nde*I/*Xho*I en todos los casos y los sitios de restricción *Bg*III/*Not*I para poder subclonarlos en el vector p_Chlamy3. A partir de los genes obtenidos comercialmente en forma sintética, se realizaron los subclonados, la

transformación de una serie de cepas de *E. coli*, la selección y los ensayos de expresión en diferentes medios de cultivo. Cuando la respectiva proteína fue producida en forma soluble y activa, se procedió a la purificación y posterior caracterización cinética, según lo que se detalla a continuación.

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante (np-Ga3PDHasa; GapN)

Búsqueda de la secuencia que codifica para la np-Ga3PDHasa

Cuando se utilizó como molde la secuencia que codifica para la np-GA3PDHasa de *Ath* (Q1WIQ6) y *Cre* (XP_001694180) para buscar en las bases de datos, se encontró en *Chlorella variabilis* (*Cva*) una secuencia putativa (XP_005842757.1) que comparte un 55% de identidad con las secuencias molde y que codificaría para la np-Ga3PDHasa. Dicha enzima es activa en forma de homotetrámero en todos los organismos donde se la ha estudiado y caracterizado hasta la actualidad, habiéndose encontrado que es codificada por un único gen [125] [46] [55]. La secuencia encontrada, se utilizó para diseñar el gen sintético que se empleó en los ensayos de expresión.



Figura 20. Alineamiento de secuencias proteicas de np-Ga3PDHasa (GapN, E.C. 1.2.1.9). *Chlorella variabilis* (*Cva*, XP_005842757.1), *Arabidopsis thaliana* (*Ath*, Q1WIQ6) y *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*, XP_001694180).

Expresión recombinante de np-Gap3PDHasa en E. coli

Para realizar la expresión recombinante de la proteína codificada por el gen *Cva*GapN, subclonado en el sitio smc1 del plásmido pETDuet, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 CodonPlus® (DE3)-RIL y *E. coli* BL21 CHAP3 (DE3). Los ensayos de expresión se realizaron en medio líquido TB o YT2X, evaluándose temperaturas de entre 15-37 °C

para la etapa de inducción de la expresión del gen. Una ventaja para el análisis de expresión de esta enzima es que al no encontrarse naturalmente en las cepas de expresión empleadas, se puede evaluar fácilmente su expresión mediante ensayos de actividad enzimática.

En la Figura 21 se muestran los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE teñidos con Coomassie Brilliant Blue) correspondientes a los extractos proteicos de los cultivos de *E.coli* separados en fracción insoluble (FI) y fracción soluble (FS) mediante centrifugación. Cuando se utilizó como huésped de expresión la cepa de *E. coli* BL21 (Figura 21 A), no se evidenciaron proteínas con expresión diferencial ni en la fracción insoluble ni en la soluble, tampoco se detectó actividad np-Ga3PDHase en los extractos solubles. Cuando se analizó por SDS-PAGE el ensayo de expresión en la cepa de *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3-RIL) (Figura 21 B), se observó una proteína sobreexpresada diferencialmente en la fracción insoluble respecto al control sin transformar. Este resultado se obtuvo indistintamente al medio de cultivo empleado y a una temperatura de cultivo al momento de la inducción de 28 °C. Sin embargo, no pudo detectarse actividad np-Ga3PDHase en ninguna de las fracciones solubles, ni recuperarse enzima mediante purificación por IMAC. Incluso, se evaluó también la expresión del gen en la cepa *E.coli* BL21 CHAP3 (DE3), que favorece la solubilidad de proteínas expresadas en forma recombinante, pero los resultados fueron los mismos a los antes descritos para la cepa de *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3-RIL) (no mostrado).

A pesar de todos los ensayos realizados y todas las condiciones de expresión evaluadas para el gen *cvaGapN*, no fue posible obtener la enzima en forma soluble y activa, por lo cual la caracterización cinética de esta enzima se desestimó en este trabajo de Tesis.

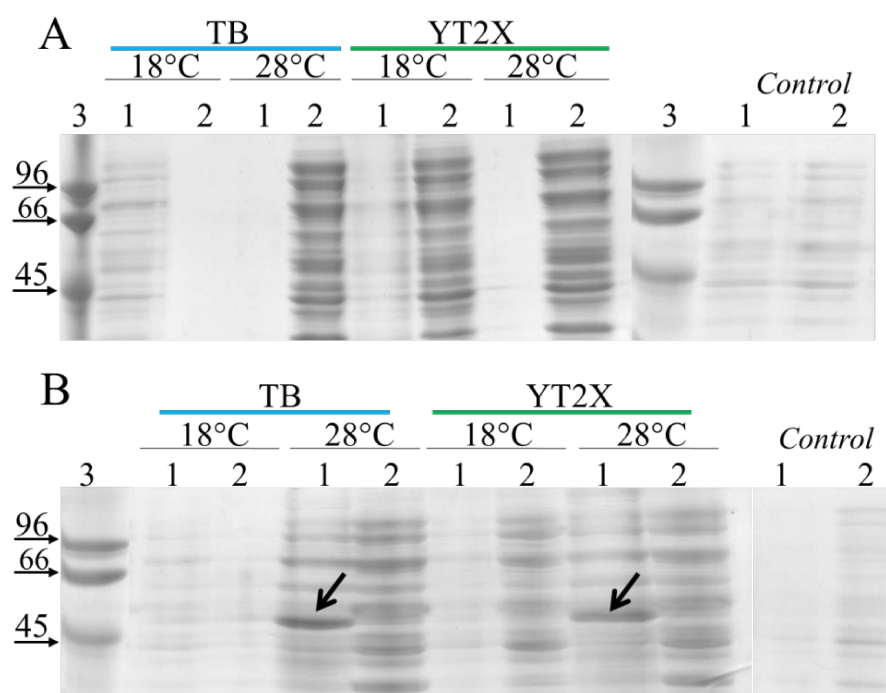


Figura 21. Ensayos de expresión para obtener la np-Ga3PDHasa en forma recombinante. Perfiles de proteínas resultados por electroforesis para los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) (A) y *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3-RIL) (B) resultantes de los ensayos de expresión del gen *CvaGapN*. Se muestran los SDS-PAGE (12%) teñidos con Coomassie Brilliant Blue. En todos los casos: 1- fracción insoluble, 2- fracción soluble y 3- marcador de masa molecular. Las flechas señalan el polipéptido que se expresa diferencialmente respecto a los extractos de *E. coli* que le corresponde pero sin transformar (Control). En la parte superior se detallan los medios en los que se realizó el cultivo y las temperaturas de incubación al momento de la inducción.

ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGlc-PPasa)

Búsqueda de las secuencias de los genes que codifican para la ADP-Glc PPasa

La ADP-Glc PPasa es una enzima que presenta diversidad de conformaciones estructurales en los organismos en los que se la ha estudiado. Su estructura cuaternaria es homotetramérica en algunas bacterias como *E. coli* y en cianobacterias como *Synechococcus*; mientras que es heterotetramérica en bacterias como *Bacillus subtilis*, algas verdes unicelulares como *C. reinhardtii* y plantas superiores [126].

Cuando se utilizó como molde las secuencias de proteínas de las subunidades large (L) y small (S) de *Ath* (L, P55229; S, P55228) y *Cre* (L, XP_001693447.1; S, XP_001691854.1), se encontraron en *Chlorella variabilis* tres secuencias diferentes con similitud a las empleadas como molde. La secuencia XP_005842916.1 (Figura 22), presentó mayor identidad (59%) con las subunidades large utilizadas como molde. La secuencia XP_005851797.1 (Figura 23), tiene mayor identidad (43%) con las subunidades small empleadas como molde. Por su parte, la secuencia XP_005848434.1 (Figura 24) presentó un 32% de identidad con cualquiera de las subunidades empleadas como molde. Al no poder clasificar a esta última secuencia como S o L, decidimos nombrarla con el pseudónimo “*Smarge*” que resulta de la combinación de las palabras *small* y *large*.

```

1
Cva LARGE (1) -----MQQVAIDRVAMP--AAGRIGTAKCSSFKQSVRGTRLQQHKARRAAGQPGLLQLGAVQAVAAPERGAEAAASHSQTNVMAVILGGGAG
Cre LARGE (1) -----MSRPPRP--APARCCMLMATPGFGSCAVRGGQGCCEAAASSRRVEESCPASLCAGCCYVLSDREQDRQPRGEVCSIIILGGGAG
Ath LARGE (1) MSSMQFSSVLPLEGGKACISPVRRBGSASERLKVGDSSSIIRHERASRRMCMNGGRGPAATGAQCVLTSDASPADTLVLRTSFRRNYADPNEVAAILGGGTG
101
Cva LARGE (87) TRLYPLTKNRAKPAVPIGGAYRLIDV PMSNCINSGISKIYILTQFNSTSLNRHLARTYNFASGVRFGGEGFVEVLAATQTP-TDKEWFQGTADAVRQYA
Cre LARGE (82) TRLFPLTKSRAKPAVPIGGAYRLIDV PMSNCINSGISKIYILTQFNSTSLNRHLGRAYNMG-SGVRFGGDFVEVLAATQTP-TDKEWFQGTADAVRQYS
Ath LARGE (101) TQLFPLTSTRATPAVPIGGCYRLIDI PMSNCFNSGINKIFVMTQFNASLNRHIHRTYLG--GINFT-DGSVEVLAATQMPGEAAGWFRGTADAVRKF
201
Cva LARGE (186) WLFERDIK-NRNVEDIVILSGDHLRYRMDYMKFVDHHRATGADVTIGCLPVDATRASDFGLMKIDNEGRITFEFAEKP-KGEALEKMRVDTTVLALS PAAVKQ
Cre LARGE (180) WLLEDTK-NRAIEDVILSGDHLRYRMDYMKFVNYHRETNADITIGCIAYGSDRAKEFGLMKIDEKRRVTSFAEKPKTQEALDAMKVDTVLGLTPEEAAE
Ath LARGE (198) WVLEDYYKNKSI EHIILILSGDQLYRMDYMELVQKHVDDNADITLSCAPVGESRASEYGLVKFDSGVRVQFSEKP-KGDDLEAMKVDTSFLNFAIDDDPAK
301
Cva LARGE (284) QSFASMGIVYFKKSLMLDWL-DVNKTS HDFGGEIIPQAKDHKVMAYLFNGYWEDIGTIESFFNANLALHNP PNFQFHDPQGP IYTS PRFLPPAKVIK
Cre LARGE (279) KPYIASMGIVYFKKSVLLQLLND SYAKANDFGGEIIPSAAKDHN VVAYFYGWEDIGTIKSFFEENLKL CRHPATFEFYDPQSP IYTS PRVLP PATVRN
Ath LARGE (297) YPYIASMGVYVFKRDVLLNLLKSRYAE LHDGSEI LPRALHDHN VQAYVFTDYWEDIGTIRSF DANMALCEQP PKFEFYDPKTPFFTS PRYLPPTKSDK
401
Cva LARGE (383) SKLTD AIVSHG SYLRECNVNHAI IGLRSRINEGVTTIQDAMIMGCDYYESDAQRAALMEAGGVPMGIGAGSTLRNVIVDKNARI GDNVQI INKEGVQE AAR
Cre LARGE (379) CKVTD AIIAQGSFVSDCTINNAVIGIRSIIGQNC TIIQDALVMGADYYESDDQRATLLKKGVPVGI GANSVITNAI IDKNARV GKNVKI VNKEGVTEGTR
Ath LARGE (397) CRIKEA IISHGCFLECKIEHSI IGVRSRINSGSELKNAMMGADSYETEDETSRLMSEGKVP IGVGENTKISNCI IDMNARI GRDVVISNKEGVQEADR
501
Cva LARGE (483) EEEGYFIRSGIVVLRNQTI PSGTII
Cre LARGE (479) EAEGYIRSGIVVIDKGALVPDNTII
Ath LARGE (497) PEEGYIRSGIVVIQKNATIKDGTVV
526

```

Figura 22. Alineamiento de secuencias proteicas de la subunidad large de ADP-Glc PPasa (E.C. 2.7.7.27). *Chlorella variabilis* (*Cva*, XP_005842916.1), *Arabidopsis thaliana* (*Ath*, P55229) y *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*, XP_001693447.1).

```

1
Cva SMALL (1) MRCAELTAQPAGKGVGRHFRHCWEGQSLASRSSALRGSQLAVPTPCRKTVRPKVAQPTQAVQVDAKTQAHAQKITVSTNGSEFGATEMSRTVLGIILGG 100
Cre SMALL (1) --MALKMRVSRQALGSQTFVCPHGSVVRKAVSSKAR-----AVSRQAQVVRAQAVSTPVETKVANGVAASSAAGTQNDPAGDISKTVLGIILGG
Ath SMALL (1) --MASVSAIGVLKVPPASTSNSTGKATEAVPTRTLSFSSSVTSSDDKISLKSTVSRLCKSVVRRNPIIVSPKAVSDSQNS-QTCLDPDASSSVLGIILGG
101
Cva SMALL (101) GAGSRLYPLTKKRAKPAVPLGANYRLIDIPVSNCINSGVNKIYCLTQFNSASLNRHLSAYNSNVGGYNSRGFVEVLAASQTTTTKEWFQGTADAVRQYM 200
Cre SMALL (90) GAGTRLYPLTKKRAKPAVPLGANYRLIDIPVSNCINSNVTKIYCLTQFNSASLNRHLSQAYNSVGGYNSRGFVEVLAASQSSSANKSWFQGTADAVRQYM
Ath SMALL (98) GAGTRLYPLTKKRAKPAVPLGANYRLIDIPVSNCINSNSIKIYVLTQFNSASLNRHLSRAYASNMGGYKNEGGFVEVLAASQSSPENPNWFQGTADAVRQYL
201
Cva SMALL (201) WLFDEACRDGVEDFLILSG-----AAAALPRRQQ----- 300
Cre SMALL (190) WLFEEAVREGVEDFLILSGDHLYRMDYRDFVRKHRNSGAAITIAALPCAEKEASAFGLMKIDEEGRVIEFAEKPKGEALTKMRVDTGILGVDPDATAAAKP
Ath SMALL (198) WLFEEHN---VLEYLILAGDHLYRMDYEKFIQAHRETDADITVAALPMDEQRATAFGLMKIDEEGRVIEFAEKPKGEHLKAMKVDTTILGLDDDQRAKEMP
301
Cva SMALL (231) -----HDFGSDIIPGAKELGCKVQAHLFKGYWEDIGTVRAFYESNLALTDSPNPNFRCGGGGGVGVWG----- 400
Cre SMALL (290) YIASMGIYVMSAKALRELLNRMPGANDDFNEVIPGAKDAGFKVQAFAFDGYWEDIGTVEAFYNANLALTDPEKAQFSFYDKDAPIYTMSRFLPPSKVMD
Ath SMALL (295) FIASMGIYVVSRDVMLDLLRNQFPGANDFGSEVIPGATSLGLRVQAYLYDGYWEDIGTIEAFYNANLGITKPKVPDFSFYDRSAPIYTQPRYLPPSKMLD
401
Cva SMALL (295) GDVERSILDGCIVEPDAKIHHSVIGLRSIIREGCVIEDSLLMGADYYEQYEECEAFAD--CLPLGVGKGTHIKGAIVDKNARIGFKCKIVNAEGIQESF 500
Cre SMALL (390) CDVNMSIIGDGCVIKAGSKIHNSIIGIRSLIGSDCIIDSAMMGSDYETLEECEYVPG--CLPMGVGDGSIIRRAIVDKNARIGPKQLINKDGVKEAN
Ath SMALL (395) ADVTDSVIGEGCVIKN-CKIHHSVVGLRSCISEGAIIEDSLLMGADYETATEKSLLSAKGSVPIGIGKNSHIKRAIDKNARIGDNVKIINSDNVQEAA
501 528
Cva SMALL (393) KTEEQGWVIRDGVVVVIKDSNIPDGTII
Cre SMALL (488) R-EDQGFVIKDGIVVIKDSHIPAGTII
Ath SMALL (494) R-ETDGYFKSGIVVIKDALIPTGTVI

```

Figura 23. Alineamiento de secuencias proteicas de la subunidad small de ADP-Glc PPasa (E.C. 2.7.7.27). *Chlorella variabilis* (Cva, XP_005851797.1), *Arabidopsis thaliana* (Ath, P55228) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre, XP_001691854.1).

```

1
Cva LARGE (1) MQQVAIDRVAMPAAGRIG-----TAKCSSFKQSVRGTRLQQHKARRAAGQPGLLQLGAVQVAAAPERGAEAASAHSQTN-----SVMAVIL 100
Cva SMALL (1) --MRCAELTAQPAGKGVGRHFRHCWEGQSLASRSSALRGSQLAVPTPCRKTVRPKVAQPTQAVQVDAKTQAHAQKITVSTNGSEFGATEMSRTVLGIIL 100
Cva SMARGE (1) -----MSRTVRGVIL 200
101
Cva LARGE (82) GGGAGTRLYPLTKNRAKPAVPIGGAYRLIDVPMSNCINSGISKIYILTQFNSTSLNRHLARTYNFGASGVRFGGEGGFVEVLAATQTPTDKEWFQGTADAV 200
Cva SMALL (99) GGGAGSRLYPLTKKRAKPAVPLGANYRLIDIPVSNCINSGVNKIYCLTQFNSASLNRHLSAYNSNVGGYNS--RGFVEVLAASQTTTTKEWFQGTADAV
Cva SMARGE (11) AG--GETKNPLTKYRAMPVPLGSSLLMVDVPVNNCLQAGINKIYVLTQFSHTLNSHIAASYPPMKLGAPD-QQAWVDVLAAQQTVTEREWYQGSADAV
201
Cva LARGE (182) RQYAWLFRDIKN--RNVEDIVILSGDHLYRMDYMKFVDHHRATGADVTIGCLPVDATRASDFGLMKID-NEGRITEFAEKPKGEALEKMRVDTTVLLALSP 300
Cva SMALL (197) RQYMWLFDEACR--DGVEDFLILSG-----AAAA 400
Cva SMARGE (108) RKNLGELKDEARGITPARDYVILSGSAVYKMDFQKLVAFHREKNADVTIAMHTCGEADARTKGIAQVHPSSGKVMFKLEKPTADDLGLSLRREDAAAAPGA
301
Cva LARGE (279) AAVKQSFSASMGYVFKKSLMLDLDVNKTSHDFGGEIIP-QTAKDHKVMAYLFNGYWEDIGTIESFFNANLALTHNP-PNFQFHDPQGIYTSSPRFLP 400
Cva SMALL (224) ALPRRQ-----QHDFGSDIIPGAKELGCKVQAHLFKGYWEDIGTVRAFYESNLALTDSPNPNFRCGGGGG----- 500
Cva SMARGE (208) EFLASMGYVFKREALFRQAG---VLIDRPQLVHIGHHVIPNLAQEMKVYAYQHDGYWHDVSSLKDFFETNLDLADPDALMGTIDDMTG---RRGASLP
401
Cva LARGE (377) PAKVIKSLTDAIVSHGSYLR-ECNVNHAIIGLRSRINEGVTIQDAMIMGCDYYESDAQRALMEAGGVPMGIGAGSTLRNVIVDKNARIGDNVQIINKE 500
Cva SMALL (289) GVGWVGGDVERSILDGCIVEPDAKIHHSVIGLRSIIREGCVIEDSLLMGADYYEQYEECEAFADC--LPLGVGKGTHIKGAIVDKNARIGFKCKIVNAE
Cva SMARGE (302) PAMMQDVELDRVIVGDGSVLV-GCKISNSVLGESTYVGRTIVENALILGNAWMSDLDRKQALERGRVYGVGDNCFLRCVDENATIGNNVQIINKS
501 534
Cva LARGE (476) GVQEAAAREEE-GYFIRSGIVVLRNQTIPSGTII
Cva SMALL (387) GIQESFKTEEQGWVIRDGVVVVIKDSNIPDGTII
Cva SMARGE (401) GVAEADRSES-GFMVQDGIVVMRNAVLPDGTIV

```

Figura 24. Alineamiento de secuencias proteicas de la subunidad smarge con las subunidades small y large de la ADP-Glc PPasa (E.C. 2.7.7.27). *Chlorella variabilis* (Cva, large: XP_005842916.1, small: XP_005851797.1, smarge: XP_005848434.1).

Expresión recombinante de la ADP-Glc PPasa de *Chlorella variabilis*

Para realizar la expresión recombinante de los genes que codifican para la ADP-Glc PPasa de *C. variabilis*, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* BL21 CodonPlus® (DE3)-RIL y *E. coli* BL21 CHAP3 (DE3) con las construcciones plásmidicas indicadas en cada caso. Los ensayos de expresión se realizaron en medio líquido TB o YT2X, evaluándose

temperaturas de entre 15-37 °C para la etapa de inducción de la expresión del gen. Debido a que la evaluación directa de la actividad de la enzima en los extractos totales de *E. coli* puede quedar enmascarada por la propia actividad ADP-Glc PPasa de la bacteria, a partir de los extractos obtenidos en los ensayos de expresión se realizó una purificación mediante IMAC y luego se midió actividad de la enzima. En la Figura 25 se muestran los perfiles proteicos obtenidos en los ensayos de expresión en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3).

Cuando se analizó por SDS-PAGE el ensayo de expresión de la subunidad L en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) se observó un polipéptido sobreexpresado diferencialmente en la fracción insoluble respecto al control sin transformar (Figura 25 A). Este resultado se obtuvo indistintamente al medio de cultivo empleado y principalmente a una temperatura de cultivo al momento de la inducción de 28 °C. Analizando el resultado electroforético correspondiente a la elusión obtenida mediante purificación IMAC, se pudo observar un polipéptido de 55 kDa expresado diferencialmente respecto al control, pero el mismo no tuvo actividad ADP-Glc PPasa. Incluso, cuando se evaluó la expresión del gen en otras cepas de *E. coli* BL21, CodonPlus® (DE3)-RIL y CHAP3 (DE3), que favorecen la solubilidad de proteínas expresadas en forma recombinante, los resultados fueron los mismos a los antes descritos (no mostrado).

Con respecto a la subunidad S de la ADP-Glc PPasa, cuando se analizaron los ensayos de expresión en la cepa *E. coli* BL21 (DE3), se observó en el perfil proteico resuelto mediante electroforesis (SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue) un polipéptido sobreexpresado diferencialmente en la fracción insoluble respecto al control sin transformar (Figura 25 B). Este resultado, al igual que para la subunidad L, se obtuvo indistintamente al medio de cultivo empleado y principalmente a una temperatura de cultivo al momento de la inducción de 28 °C. Cuando determinamos actividad ADP-Glc PPasa en todas las fracciones del proceso (fracción insoluble, soluble y elusión purificada), los valores no se diferenciaron respecto al control.

En cuanto al análisis por SDS-PAGE del ensayo de expresión de la subunidad *smarge* en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) se observó en la fracción insoluble y en la elusión proveniente de la purificación mediante IMAC, un polipéptido a 45 kDa expresado diferencialmente respecto al control (*E. coli* BL21 (DE3) sin transformar) (Figura 25 C). Este resultado se obtuvo indistintamente de las condiciones de cultivo empleadas al momento de la inducción de la expresión del gen *CvaAGPSm*. Para evaluar mediante actividad enzimática si había expresión de la subunidad en las diferentes fracciones, se realizaron medidas en comparación con las fracciones obtenidas de células sin transformar y no se evidenció diferencia entre ellas.

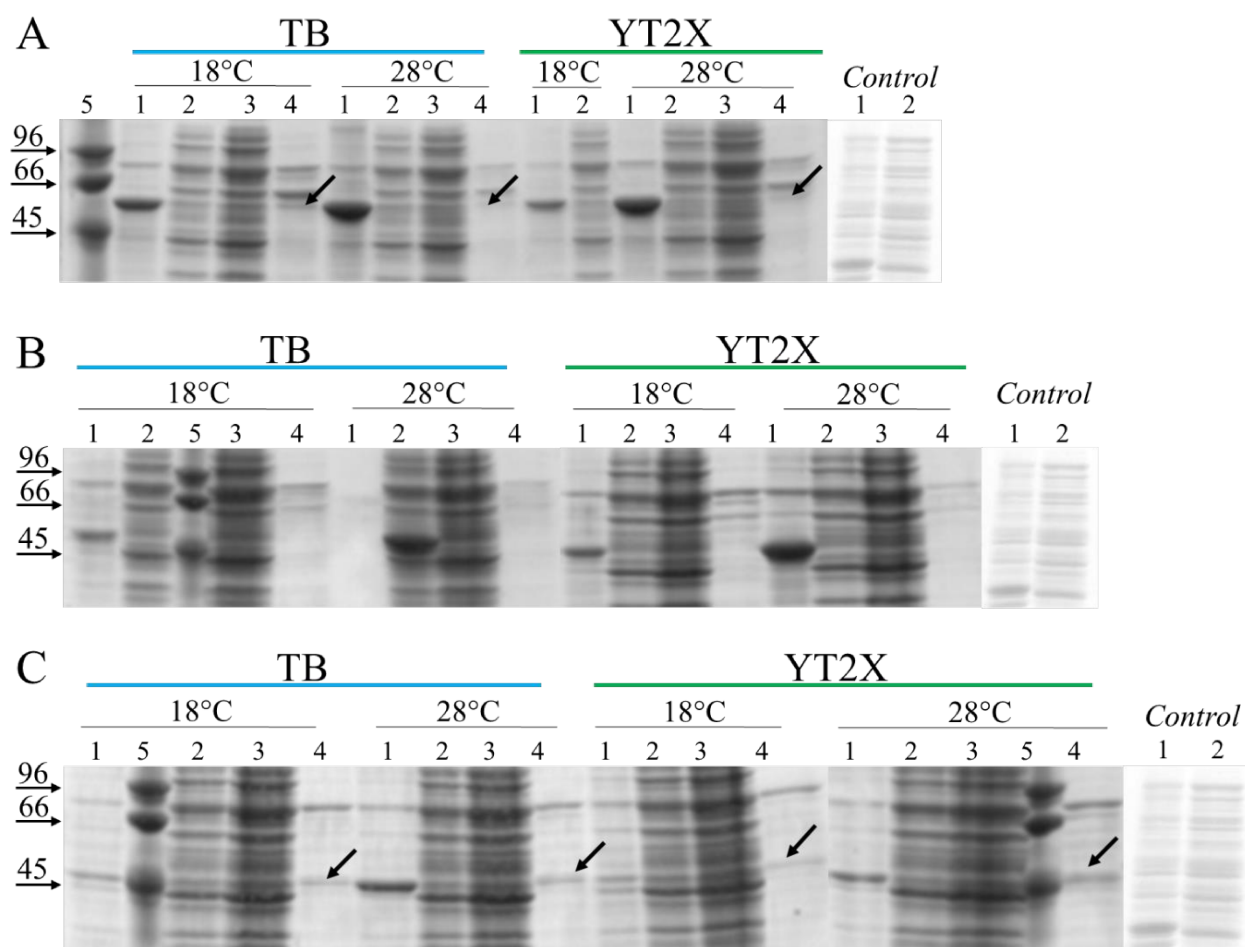


Figura 25. Ensayos de expresión de las diferentes subunidades de la ADP-Glc PPasa en forma individual. Perfiles de proteínas resueltos por electroforesis para los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) resultantes de los ensayos de expresión de los genes *CvaLarge* (A), *CvaSmall* (B) y *CvaSmarge* (C). Se muestran los SDS-PAGE (12%) teñidos con Coomassie Brilliant Blue. En todos los casos: 1-fracción insoluble, 2-fracción soluble, 3-fracción excluida de la IMAC, 4-elución proveniente de la IMAC y 5-marcador de masa molecular. Las flechas señalan la banda polipeptídica que se expresa diferencialmente respecto a los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar (Control). En la parte superior se detallan los medios en los que se realizó el cultivo y las temperaturas de incubación al momento de la inducción.

Para las proteínas con estructura cuaternaria compuesta por más de una subunidad, la actividad enzimática de la misma puede llegar a depender de su correcto ensamblado y de la presencia de todas las subunidades en la relación estequiométrica adecuada. Es por eso que decidimos clonar las distintas subunidades de manera conjunta. Para esto las construcciones génicas fueron tres y se

realizaron empleando un vector petDuet: (I) Clonamos en el *smc1* la subunidad L y en el *smc2* la S, (II) o la Sg y (III) *smc1* Sg y *smc2* S. Transformamos las cepas de *E. coli* BL21 y las crecimos en medio líquido LB, TB e YT2X. En la Figura 26 se puede observar los resultados obtenidos en un SDS-PAGE (12%).

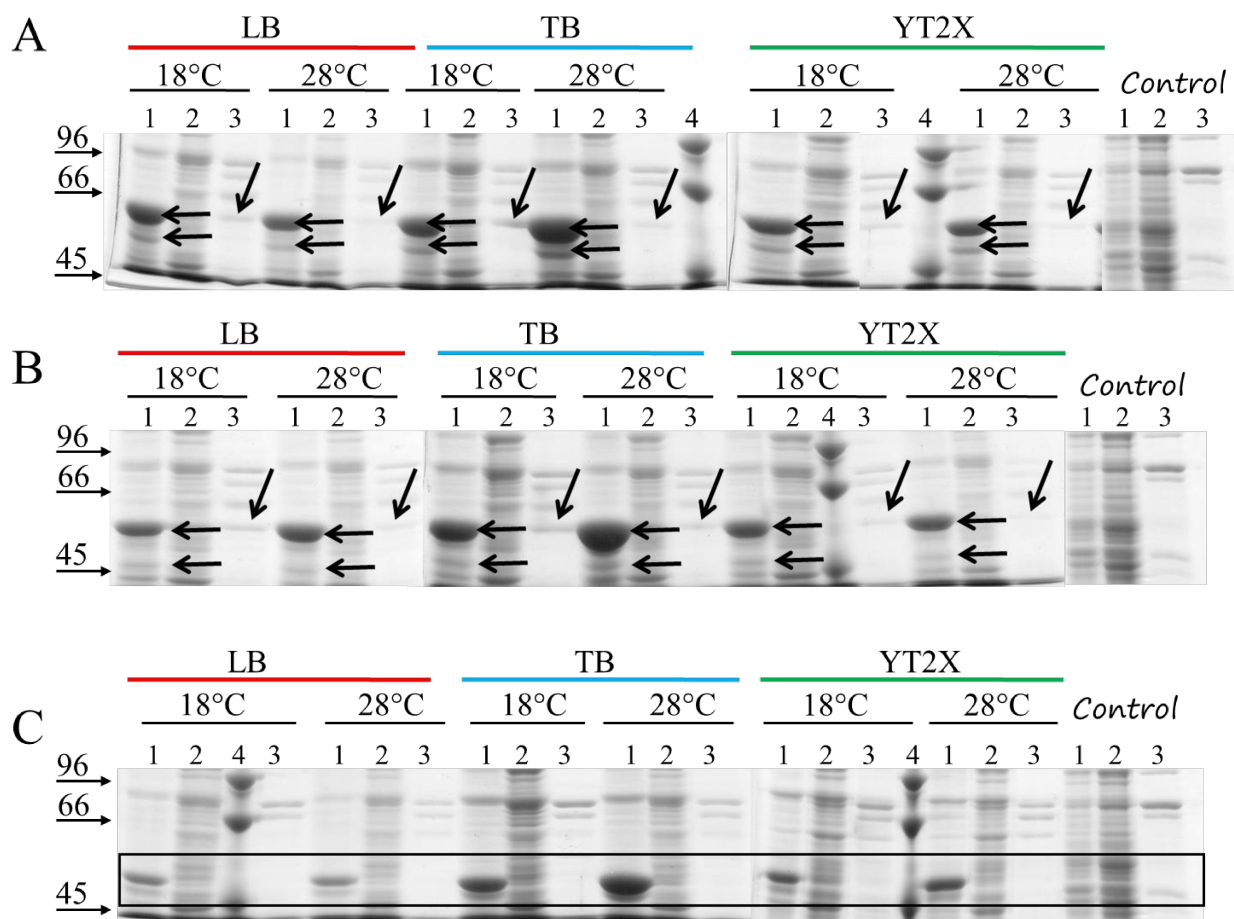


Figura 26. Ensayos de co-expresión de las diferentes subunidades de la ADP-Glc PPasa. Perfiles de proteínas resueltos por electroforesis para los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) resultantes de los ensayos de co-expresión de los genes que codifican las subunidades: *large-small* (A), *large-smarge* (B) y *smarge-small* (C). Se muestran los SDS-PAGE (12%) teñidos con Coomassie Brilliant Blue. En todos los casos: 1-fracción insoluble, 2-fracción soluble, 3-elución proveniente de la IMAC y 4-marcador de masa molecular. Las flechas señalan la banda polipeptídica que se expresa diferencialmente respecto a los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar (control). En la parte superior se detallan los medios en los que se realizó el cultivo y las temperaturas de incubación al momento de la inducción.

Cuando se co-expresaron las subunidades L y S, se pudo observar en la fracción insoluble (Figura 26 A calles 1) la expresión de dos polipéptidos que no están presentes en el control. Sin embargo, luego de realizar la purificación a partir de la fracción soluble solo se detectó el polipéptido que correspondería a la subunidad L. Cuando determinamos actividad ADP-Glc PPasa, ninguna de las fracciones presentó diferencia con el control (fracción soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar). Resultados similares se obtuvieron cuando se realizó el ensayo de coexpresión de las subunidades L y Sg (Figura 26 B). Cuando se evaluó la co-expresión de las subunidades Sg y S (Figura 26 C), se observó en la fracción insoluble la expresión de dos polipéptidos que no están presentes en el control, pero ninguno de ellos pudo recuperarse en la elusión luego de la purificación a partir de la fracción soluble. En todos los ensayos de co-expresión, solo la subunidad clonada en el *smc1* tiene incorporada la secuencia de (His)₆ que permite su purificación por IMAC. Esto indica que, de no purificarse, las dos subunidades podrían estar en la fracción soluble pero no interaccionar de manera adecuada. Para evaluar si había expresión de las subunidades en la fracción soluble, se realizaron medidas de actividad en comparación con la fracción soluble de células sin transformar. Ninguna de las fracciones presentó actividad ADP-Glc PPasa por encima del control.

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante cloroplastídica (Ga3PDH_{asaA}; GapA)

Búsqueda de la secuencia que codifica la Ga3PDH_{asaA}

La Ga3PDH_{asaA} que funciona en el cloroplasto de los organismos fotosintéticos es una enzima que presenta estructuras cuaternarias tanto homoméricas como heteroméricas según de que organismo se trate. En el caso de ser una enzima heteromérica, está compuesta por subunidades que se denominan A y B, formando una enzima que se denomina Ga3PDH_{asaA/B} (EC 1.2.1.13). Para el caso de cianobacterias, algas rojas y algunas plantas superiores, se ha determinado que la estructura cuaternaria de la enzima es homotetramérica del tipo A₄ [127]; pero en otra gran variedad de plantas superiores la enzima presenta una estructura heterotetramérica del tipo A₂B₂ [128] [129]. Empleando como molde las secuencias de la Ga3PDH_{asaA} de *A. thaliana* (P25856) y *C. reinhardtii* (P50362), se encontró en *C. variabilis* un único gen que codifica para una proteína con 58% y 67% de identidad a las secuencias molde, respectivamente (Figura 27). Cuando se empleó como molde la Ga3PDH_{asaB} de *A. thaliana* (P25857), se encontró la misma secuencia de *C. variabilis* que comparte a nivel de proteína un 51% de identidad con la secuencia molde (Figura 28). En función de las identidades entre las proteínas, al gen de *C. variabilis* se lo considera de la familia de las

Ga3PDHasaA ya que tiene mayor identidad con ellas y se empleó para el diseño del gen sintético a fin de poder expresarla en forma recombinante en *E. coli*.

Debido a que aún no se ha informado acerca de la expresión recombinante de otras Ga3PDHasasA/B, se decidió también sintetizar químicamente los genes que codifican para las dos subunidades de la enzima en *A. thaliana* (*AthGapA*, At3g26650 y *AthGapB*, At3g42970). Esto, nos da la posibilidad de co-exresar combinaciones de las enzimas para estudiar la relación de estructura/función de cada una de las subunidades.

```

1                                                                                               100
Cva GAPA (1) -----MAASGSKQVTVSAKKIRVAINGFGRIGRQFLRCVEGRGDASNLEVVAVNDSGGV
Cre GapA (1) -----MAAMMQSAFTGSAVSSKSGVRAKARAVVDVRAEKKIRVAINGFGRIGRNFRLCWHGR-QNTLLDVVAINDSGGV
Ath GapA (1) MASVTFVSPKGFTEFSGLRSSASLPFGKLLSDEFVSIVSFQTSAMGSSGGYRKGVTEAKLKVAINGFGRIGRNFRLCWHGR-KDSPLDIIAINDTGGV
101                                                                                               200
Cva GAPA (55) KQASHLLKYDSTMGTFNADV KIVSEDSFSINGKVIKVVSRDPTKLPWADMKVLDVIEGTGVFIDEAGAGKHIEAGAKKVLITAPAKGSGIPTVYVGVNA
Cre GapA (76) KQASHLLKYDSTLGTFAADV KIVDDSHISVDGKQIKIVSSRDPLQLPWKEMNIDLVIIEGTGVFIDKVGAGKHIQAGASKVLITAPAKDKDIPTFVVGVNE
Ath GapA (100) KQASHLLKYDSTLGTFDADV KPSGETAISVDGKI IQVSNRNP SLPWKELGIDIVIEGTGVFVDRREGAGKHIEAGAKKVIITAPAKG-DIPTVYVGVNA
201                                                                                               300
Cva GAPA (155) DDYKHS DIIISNASCTTNCLAPFVKVLDKFKGIVKGTMTTTHSYTGDQRLLDASHRDLRRARAAALNIVPTTTGAAKAVLVLPKLGKLNGLVALRVPTP
Cre GapA (176) GDYKHEYPIISNASCTTNCLAPFVKVLEQKFGIVKGTMTTTHSYTGDQRLLDASHRDLRRARAAALNIVPTTTGAAKAVSLVLPKLGKLNGLIALRVPTP
Ath GapA (199) DAYSHDEPIISNASCTTNCLAPFVKVLDQKFGI IKGTMTTTHSYTGDQRLLDASHRDLRRARAAALNIVPTTSTGAAKAVLVLPKLGKLNGLIALRVPTP
301                                                                                               399
Cva GAPA (255) TVSVVDLVVQVEKKTFAEEVNEAFREAANGPLKGLIGVSDPLVSCDFKMTNVSSTIDSSLTMVMGDDMVKVVAWYDNEWGYSQRVVDLAEVTAANWE-
Cre GapA (276) TVSVVDLVVQVEKKTFAEEVNAAFREAANGPMKGVLHVEDAPLVSIDFKCTDQSTSIDASLTMVMGDDMVKVVAWYDNEWGYSQRVVDLAEVTAKKWVA
Ath GapA (299) NVSVVDLVVQVSKKTFAEEVNAAFRDSA EKELKGLILDVCDPLVSVDFRCSDFSTTIDSSLTMVMGDDMVKVI AWYDNEWGYSQRVVDLADIVANWVK-

```

Figura 27. Alineamiento de secuencias proteicas de GapA (E.C. 1.2.1.13). *Chlorella variabilis* (*Cva*, XP_005843104.1), *Arabidopsis thaliana* (*Ath*, P25856) y *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*, P50362).

```

1                                                                                               100
Cva GapA (1) -----MAASGSKQVTVSAKKIRVAINGFGRIGRQFLRCV
Cre GapA (1) -----MAAMMQSAFTGSAVSSKSGVRAKARAVVDVRAEKKIRVAINGFGRIGRNFRLCWHGR-QNTLLDVVAINDSGGV
Ath GapB (1) MATHAALAVSRIPVTQRLQSKSAIHSFPAQCSSKRLEVAEFSGLRMSSIGGEASFDAVAAQII PKAVTSTPVRGETVAKLKVAINGFGRIGRNFRLCWHGR
101                                                                                               200
Cva GapA (35) EGRGDASNLEVVAVNDSGGVKQASHLLKYDSTMGTFNADV KIVSEDSFSINGKVIKVVSRDPTKLPWADMKVLDVIEGTGVFIDEAGAGKHIEAGAKKVLITAPAKGSGIPTVYVGVNA
Cre GapA (57) HGR-QNTLLDVVAINDSGGVKQASHLLKYDSTLGTFAADV KIVDDSHISVDGKQIKIVSSRDPLQLPWKEMNIDLVIIEGTGVFIDKVGAGKHIQAGASKVLITAPAKDKDIPTFVVGVNE
Ath GapB (101) HGR-KDSPLEVVVLDNSGGVKNASHLLKYDSMLGTFAEAVKIVDNETISVDGKLIKVVSNRDLKLPWAEELGIDIVIEGTGVFVDPGAGKHIEAGAKKVLITAPAKGSGIPTVYVGVNA
201                                                                                               300
Cva GapA (135) LITAPAKGSGIPTVYVGVNADDYKHS DIIISNASCTTNCLAPFVKVLDKFKGIVKGTMTTTHSYTGDQRLLDASHRDLRRARAAALNIVPTTTGAAKAVLVLPKLGKLNGLVALRVPTP
Cre GapA (156) LITAPAKDKDIPTFVVGVNEGDYKHEYPIISNASCTTNCLAPFVKVLEQKFGIVKGTMTTTHSYTGDQRLLDASHRDLRRARAAALNIVPTTTGAAKAVSLVLPKLGKLNGLIALRVPTP
Ath GapB (200) IITAPAKGADIPTVYVVGNEQDYGHVDVANIISNASCTTNCLAPFAKVLDEKFGIVKGTMTTTHSYTGDQRLLDASHRDLRRARAAALNIVPTTSTGAAKAVLVLPKLGKLNGLIALRVPTP
301                                                                                               400
Cva GapA (234) ALVLPKLGKLNGLVALRVPTPTVSVVDLVVQVEKK-TFAEEVNEAFREAANGPLKGLIG-----
Cre GapA (255) SLVLPKLGKLNGLIALRVPTPTVSVVDLVVQVEKK-TFAEEVNEAFREAANGPMKGVLHVEDAPLVSIDFKCTDQSTSIDASLTMVMGDDMVKVVAWYDNLVLPKLGKLNGLIALRVPTP
Ath GapB (300) SLVLPKLGKLNGLIALRVPTPNVSVVDLVINVEKGLTAEDVNEAFRKAANGPMKGLDVCDAPLVSVDFRCSVSTTIDSSLTMVMGDDMVKVVAWYDNLVLPKLGKLNGLIALRVPTP
401                                                                                               448
Cva GapA (292) -WGYSQLRVVDLAEVTAANWE-----
Cre GapA (354) EWGYSQRVVDLAEVTAKKWVA-----
Ath GapB (400) EWGYSQRVVDLAHLVASKWPGA EAVGSGDPLEDFCKTNPAD ECKVYD

```

Figura 28. Alineamiento de secuencias proteicas de GapA y GapB (E.C. 1.2.1.13). GapA de *Chlorella variabilis* (*Cva*, XP_005843104.1) y *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*, P50362) y GapB de *Arabidopsis thaliana* (*Ath*, P25857).

Expresión recombinante de Ga3PDHasaA de C. variabilis y de Ga3PDHasaA y Ga3PDHasaB de A. thaliana en E. coli

Para realizar la expresión recombinante de los genes *CvaGapA*, *AthGapA* y *AthGapB* en forma individual, estos se clonaron en el *smc1* del vector de expresión pETDuet, que les confiere un His-Tag N-terminal que facilita su purificación mediante IMAC. Además, ambos genes que codifican para Ga3PDHasaA se clonaron en el *smc2* del vector de expresión pETDuet (que no les confiere un His-Tag), y se utilizaron para realizar los ensayos de co-expresión con Ga3PDHasaB y los ensayos de expresión individual. Con las construcciones obtenidas se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) y se realizaron ensayos de expresión en medio LB, variando la temperatura de cultivo al momento de la inducción entre 15-37 °C. A partir de los extractos obtenidos en los ensayos de expresión se realizó una purificación mediante IMAC y luego se midió actividad enzimática Ga3PDHasaA/B.

Cuando se analizó por SDS-PAGE (teñido con Coomassie Brilliant Blue) el ensayo de expresión realizado, se observó que, indistintamente a las construcciones empleadas, la condición de inducción que evidencia expresión diferencial respecto al control es siempre a 18 °C y 0,2 mM de IPTG (Figura 26). La Figura 29 A muestra los perfiles de proteínas obtenidos a partir de la expresión recombinante de las construcciones génicas que contienen el His-Tag en el extremo N-terminal. Con respecto a la Ga3PDHasaA/B de *A. thaliana*, se observó para ambas subunidades, en la fracción insoluble, un polipéptido a la altura esperada (A: 45 kDa y B: 50 kDa) expresado diferencialmente respecto al control [*E. coli* BL21 (DE3) sin transformar]. Para el caso específico de la subunidad B, se apreció también un polipéptido en la fracción obtenida luego de realizar una purificación IMAC a la fracción soluble. Independientemente de los resultados logrados por electroforesis, se midió actividad Ga3PDHasaA en las fracciones solubles y purificadas y las mismas no presentaron un valor diferencial respecto al control. Como dijimos anteriormente, en el caso de proteínas con estructura cuaternaria compuesta por más de un tipo de monómero, la actividad enzimática de la misma puede llegar a depender de su correcto ensamblado y de la presencia de todas las subunidades. Es por eso que decidimos clonar las distintas subunidades de manera conjunta. Para esto las construcciones génicas fueron dos y se realizaron empleando un vector petDuet: (I) Clonamos en el *smc1* a *AthGapB* y en el *smc2* a *AthGapA* o (II) en el *smc2* a *CvaGapA*. Transformamos las cepas de *E. coli* BL21 y las crecimos en medio líquido LB. En la Figura 29 B se pueden observar los resultados obtenidos mediante un SDS-PAGE (12%). En ambos casos se apreció un polipéptido que se expresa diferencialmente respecto al control, con una masa mayor a 45 kDa pero sin actividad Ga3PDHasaA/B.

Teniendo en consideración que el agregado de aminoácidos en el extremo N-terminal puede afectar el plegamiento de la estructura proteica, decidimos realizar un ensayo de expresión clonando *AthGapA* y *CvaGapA* en el scm2 del vector de expresión petDuet y transformando *E. coli* BL21 (DE3). En la Figura 29 C se observa que en ambos casos se obtuvo en la fracción insoluble, un polipéptido expresado diferencialmente respecto al control. Con respecto a la Ga3PDHasaA de *C. variabilis*, se apreció un polipeptido diferencial en la fracción soluble e insoluble. Esto podría indicar que el agregado del His-Tag en el extremo N-terminal afectaba su solubilidad de la proteína, tal como se observó en otros trabajos [130] [131] [132].

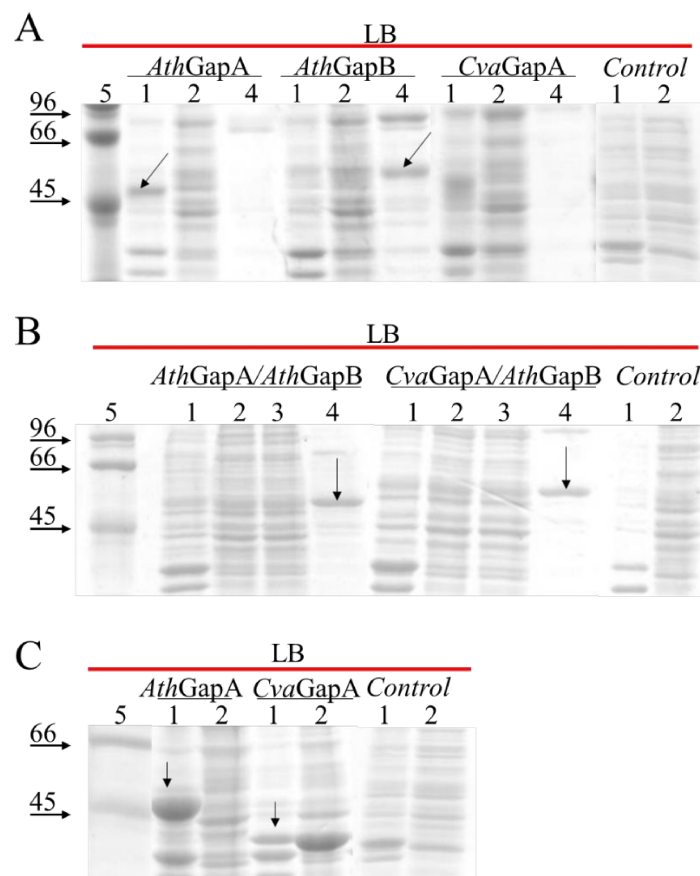


Figura 29. Ensayos de expresión de Ga3PDHasaA de *C. variabilis* y Ga3PDHasa A y B de *A. thaliana*. Perfiles proteicos resueltos por electroforesis para los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) resultantes de los ensayos de expresión de los genes *CvaGapA*, *AthGapA* y *AthGapB*. Se muestran los SDS-PAGE (12%) teñidos con Coomassie Brilliant Blue obtenidos en la expresión independiente de los genes (A y C) y la co-expresión (B). En todos los casos: (1) fracción insoluble, (2) fracción soluble, (3) exclusión, (4) elusión y (5) marcador masa molecular. Las flechas señalan la banda polipeptídica que se expresa diferencialmente respecto a los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar (Control). En la parte superior se detalla el medio de cultivo empleado en el ensayo.

Una vez obtenida la enzima Ga3PDHase de *C. variabilis* expresada en la fracción soluble, decidimos escalar el cultivo del clon de expresión para poder purificar y determinar la actividad de la enzima. Para la purificación de la enzima sin His-Tag a partir del extracto proteico de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas, se procedió según se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 30 A se observa el perfil electroforético (SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie Brilliant Blue) obtenido a partir de los extractos proteicos de los cultivos de *E.coli* separados en fracción insoluble (FI) y fracción soluble (FS) mediante centrifugación. Además se observan los perfiles proteicos obtenidos luego de realizar sucesivas purificaciones mediante precipitación salina con sulfato de amonio de las fracciones solubles. En todas las fracciones obtenidas del proceso de purificación se observó un polipéptido de ~35 kDa (Figura 26). Para analizar la identidad de dicho polipéptido, se determinó actividad Ga3PDHaseA y se obtuvo un valor de 67,2 mU/ml en la fracción soluble y de 3 mU/ml en el control de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar. Sin embargo, luego de la precipitación salina la actividad Ga3PDHaseA no pudo detectarse.

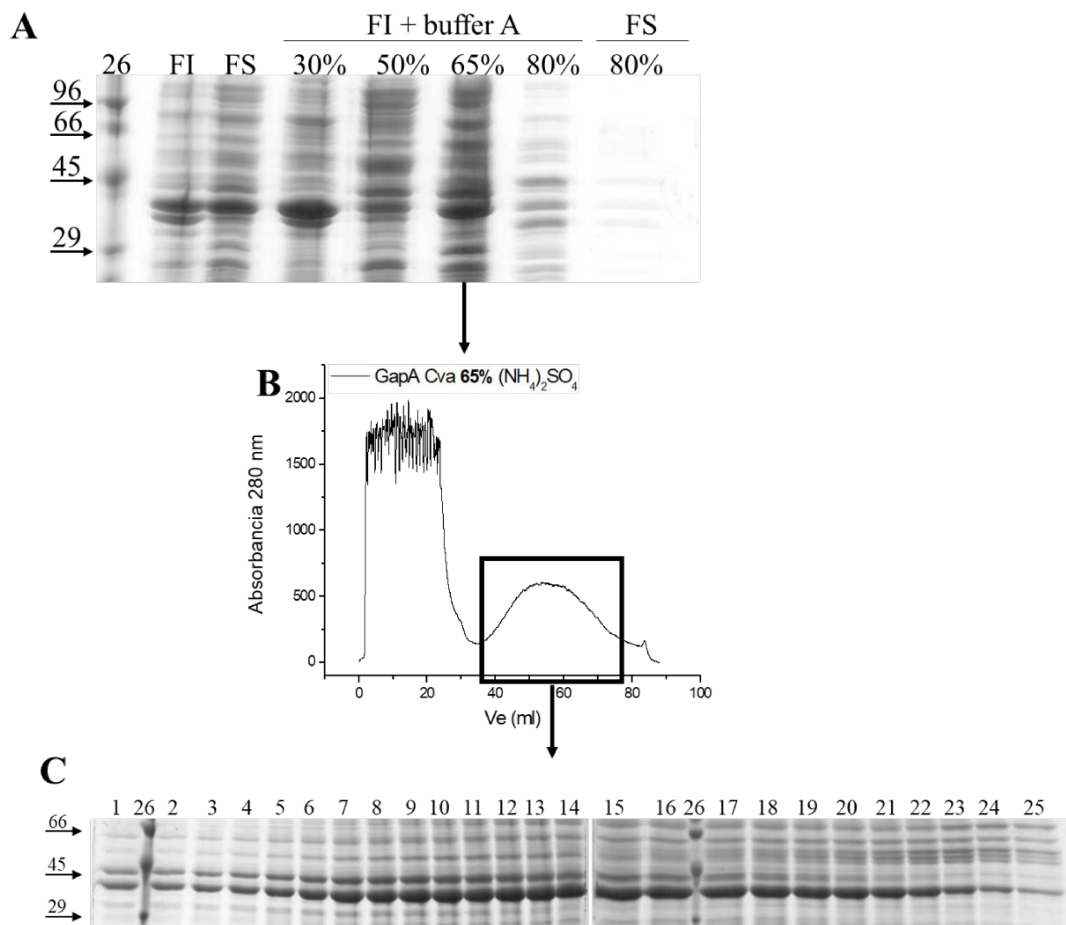


Figura 30. Purificación de la Ga3PDHaseA de *C. variabilis*. (A) Perfil electroforético del fraccionamiento salino con sulfato de amonio (30, 50, 65 y 80% de saturación): FI (fracción insoluble); FS (fracción soluble). (B) medida de la absorbancia a 280 nm de las eluciones obtenidas luego de una cromatografía hidrofóbica de las proteínas recuperadas por precipitación con 65% de saturación de sulfato de amonio. El rectángulo indica las fracciones seleccionadas para resolver el perfil proteico mediante SDS-PAGE 12% (C). Las calles 1 a 25 corresponden a las eluciones obtenidas de la cromatografía. La calle 26 es el marcador de masa molecular.

La fracción de proteínas obtenida al precipitar con 65% de sulfato de amonio, se disolvió empleando *buffer A* y se utilizó para realizar una cromatografía hidrofóbica (columna de fenilsefaroasa). A cada elusión proteica se le determinó absorbancia a 280 nm obteniendo el perfil que se muestra en la Figura 30 B. Con el fin de analizar el perfil proteico obtenido en dichas eluciones, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE 12%) que se puede observar en la Figura 30 C.

En función de los resultados, la técnica cromatográfica no fue resolutive ya que se obtuvo en todas las fracciones el mismo perfil de proteínas. A partir de las 25 fracciones obtenidas se armaron 3 mezclas: (I) fracciones de 1-5, (II) fracciones de 6-15 y (III) fracciones de 16-25. A cada mezcla se le determinó actividad Ga3PDHaseA, pero ninguna de ellas presentó actividad incluso cuando se probó variar el cofactor NADP⁺ por NAD⁺. Pensando en que alguno de los componentes de *buffer* podría estar afectando su actividad, decidimos lavar la proteína empleando un dispositivo de ultracentrifugación y *buffer* A, pero tampoco pudimos detectar actividad de la enzima.

Teniendo en cuenta que las enzimas Ga3PDHase presentan la particularidad de precipitar por encima del 70% de saturación con (NH₄)₂SO₄, decidimos precipitar la mezcla de proteínas con 80% de saturación de sulfato de amonio [133] [132]. Las proteínas precipitadas se disolvieron en *buffer* A y se sembraron en una columna de filtración por gel. A cada una de las eluciones colectadas se les determinó actividad enzimática en sentido de la oxidación del Ga3P. En la Figura 31, se representa la actividad de cada fracción y se puede observar que la misma es mayor en las fracciones 12 a 17. Luego de mezclar dichas fracciones, se determinó actividad enzimática en la mezcla obteniéndose un valor de 75 mU/ml. Este valor fue muy inferior a los reportados para esta enzima en *C. reinhardtii* [131] pero similar a los obtenidos en *T. aestivum* cuando la misma se somete a diferentes efectos de estrés [134].

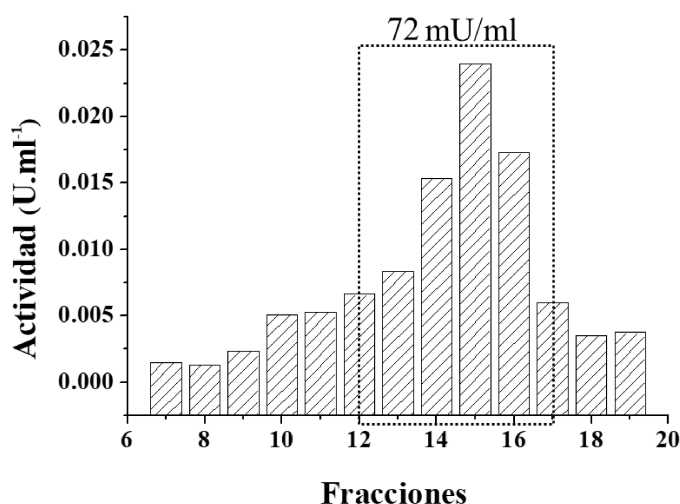


Figura 31. Gráfico que representa la actividad enzimática de la Ga3PDHaseA determinada en las fracciones colectadas en la cromatografía de filtración por gel. El rectángulo delimita las fracciones que presentaron mayor actividad enzimática en comparación con el valor obtenido para el control de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar. En la parte superior del recuadro se observa el valor de AEE que se obtuvo cuando se mezclan dichas eluciones.

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante citosólica (Ga3PDHasa; GapC)

Búsqueda de la secuencia que codifica para la Ga3PDHasa

La Ga3PDHasa citosólica es una enzima que presenta una estructura cuaternaria homomérica y puede ser codificada por uno u otro de dos genes que presentan un porcentaje de identidad muy elevado que varía entre las diferentes especies. En *A. thaliana* existen dos genes que codifican para dos proteínas con un alto porcentaje de identidad (At1g13440 y At3g04120; 97% de identidad). Lo mismo puede observarse para *C. reinhardtii*, presenta dos isoformas (P49644.1 y A8JHR9) con 92% de identidad de secuencia. Empleando como molde cualquiera de ellas se encontraron en *Chlorella variabilis* dos secuencias, GapC1 (XP_005851158.1) y GapC2 (XP_005845921.1), que presentaron un porcentaje de identidad del 60% y 70%, respectivamente. (Figura 32). Las secuencias encontradas se utilizaron para diseñar los genes sintéticos que se emplearon en los ensayos de expresión.



Figura 32. Alineamiento de las secuencias proteicas de la Ga3PDHasa (EC 1.2.1.12): *Chlorella variabilis* (Cva, GapC1- XP_005851158.1, GapC2- XP_005845921.1), *Arabidopsis thaliana* (Ath, GapC1- At1g13440, GapC2- At3g04120) y *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre, GapC1- P49644.1, GapC2- A8JHR9).

Expresión recombinante de la Ga3PDHasa de C. variabilis.

Para realizar la expresión recombinante de los genes *CvaGapC1* y *CvaGapC2*, los genes se clonaron en el *smc1* del vector de expresión pETDuet, que les confiere un His-Tag N-terminal que facilita su purificación. Con las construcciones obtenidas se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) y se realizaron ensayos de expresión. Para evaluar los ensayos de expresión, los extractos totales de las células se separaron por centrifugación para obtener la fracción soluble (FS) e insoluble (FI). A partir de la fracción soluble se realizó una purificación por IMAC y a la fracción eluida de la columna se le determinó actividad. Para expresar ambas enzimas se emplearon los medios TB, LB e YT2X, realizando la inducción de la expresión del gen recombinante con 0,2 mM de IPTG e incubando los cultivos entre 15-37 °C durante la inducción. En todos los casos, las dos Ga3PDHasas de *C. variabilis* se obtuvieron en forma soluble y activa.

Para escalar los cultivos y producir la enzima en grandes cantidades, elegimos realizar la expresión de los genes en el medio de cultivo LB y emplear una temperatura al momento de la inducción de 28 °C, ya que es la condición estándar empleada en el laboratorio y de fácil escalado. En la Figura 33 A y B, se muestran los perfiles de proteínas para la expresión y purificación de las dos isoformas de la Ga3PDHasa de *C. variabilis*. Luego de purificar las proteínas por IMAC y medir su actividad, para conocer mejor sus características moleculares se procedió a determinar la masa molecular nativa de las proteínas puras mediante una cromatografía de filtración por gel (Figura 33 C). La resolución de la cromatografía se siguió por absorción a 280 nm y actividad enzimática, obteniéndose picos de elución a volúmenes de 13,67 ml para Ga3PDHasa 1 y 14,57 ml para Ga3PDHasa 2, lo que corresponde a masas moleculares de 220 y 146 kDa respectivamente.

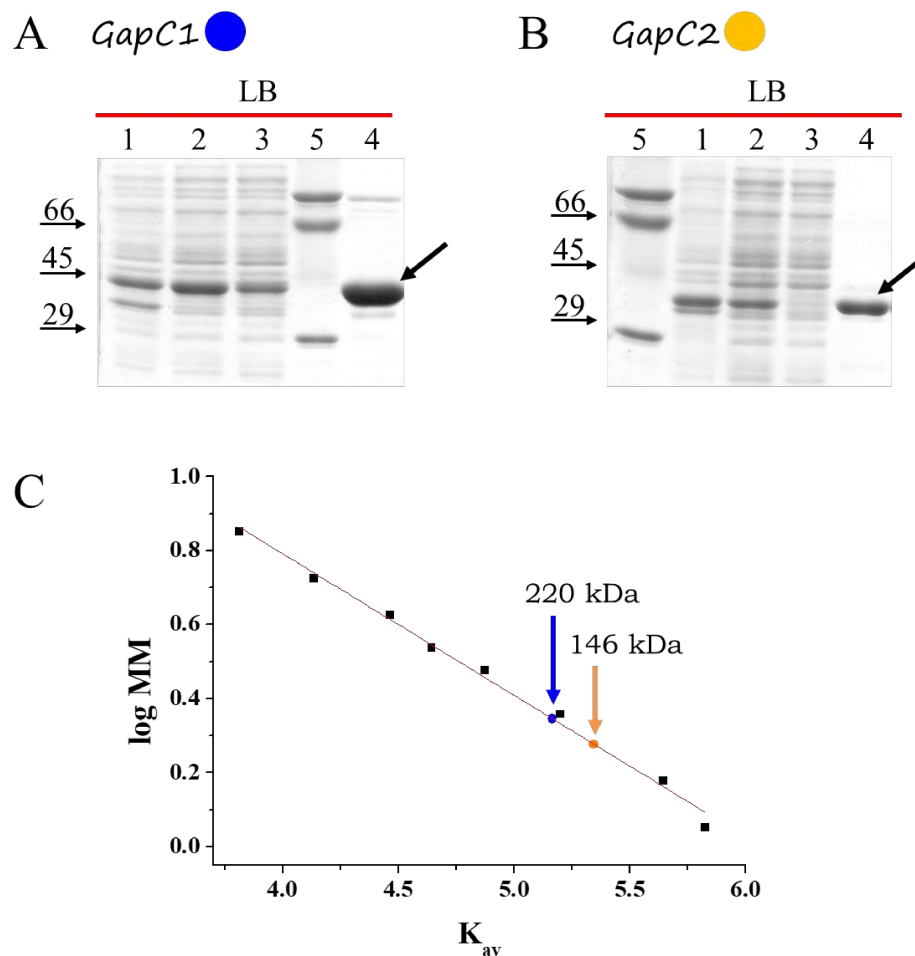


Figura 33. Expresión recombinante y determinación de la masa molecular de ambas isoformas de Ga3PDHase. Perfil de proteínas resuelto por electroforesis para los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) resultantes de los ensayos de expresión de los genes *CvaGapC1* (A) y *CvaGapC2* (B). Se muestran los SDS-PAGE (12%) teñidos con Coomassie Brilliant Blue. En todos los casos: 1- fracción insoluble, 2- fracción soluble, 3- exclusión, 4- elusión y 5- marcador de masa molecular. Las flechas señalan la banda polipeptídica que se expresa diferencialmente respecto a los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar. En la parte superior se detalla el medio de cultivo en el que se realizó el ensayo. (C) Determinación de la masa molecular nativa mediante filtración por gel empleando una columna de Superdex 200. La columna se calibró empleando moléculas de masa molecular conocida (cuadrados negros). Las flechas señalan los círculos azul y naranja que corresponden a Ga3PDHase 1 y 2, respectivamente.

En función de los resultados y considerando la masa molecular teórica de cada monómero, se determinó que Ga3PDHase 1 tiene una estructura cuaternaria homohexamérica, mientras que Ga3PDHase 2 tiene una estructura activa del tipo homotetramérica. Los resultados obtenidos para Ga3PDHase 1 difieren de lo que está generalmente informado para las Ga3PDHases ya caracterizadas, siendo la mayoría activa en su forma homotetramérica tal como ocurre para la Ga3PDHase 2 [135]. Una especulación es que la estructura hexamérica de Ga3PDHase 1 tenga relación con el extremo N-terminal propio de la proteína que posee 27 aminoácidos que no son frecuentes en las Ga3PDHases y que tampoco están en la secuencia de la Ga3PDHase 2 (ver alineamiento, Figura 32). Para intentar encontrar una explicación, se realizaron análisis *in silico* de esta secuencia en distintos predictores de péptidos señal pero en ninguno se pudo determinar la naturaleza de este péptido adicional.

Debido a que las enzimas estudiadas en este caso se producen en forma recombinante, decidimos ahondar en los estudios de la Ga3PDHase en extractos de células de *Chlorella* sp. crecidas en condiciones autotróficas (BOLD3N) y heterotróficas (M16). Luego de obtener las células en las distintas condiciones de cultivo, las mismas se lisaron, se separó la fracción soluble, se determinó la actividad Ga3PDHase y se realizó una cromatografía de filtración por gel para resolver la masa molecular en la que se determina la actividad de la enzima. En la Figura 34 A, se representa un esquema del procedimiento realizado. En la Figura 34 B se muestra la inmunodetección de la Ga3PDHase en los extractos de proteínas solubles provenientes de células de *Chlorella* sp. crecidas en las dos condiciones tróficas, en paralelo con las proteínas recombinantes producidas. Como puede observarse en la imagen superior, se puede observar que las proteínas recombinantes tienen diferente masa molecular y que en los extractos obtenidos en condiciones heterotróficas se detecta un único polipéptido que coincide con la masa molecular que presenta la Ga3PDHase 2. Sin embargo, en los extractos que provienen de las células crecidas en condiciones autotróficas se pudieron determinar dos polipéptidos que tienen masas moleculares que coinciden tanto con la Ga3PDHase 1 y 2. A partir de estos resultados, se especula que en las células de *Chlorella* sp. que crecen en condiciones heterotróficas solo se estaría expresando una de las isoformas de la Ga3PDHase (codificada por el gen *CvaGapC2*), mientras que se estarían expresando ambas isoformas en las células que crecen en condiciones autotróficas.

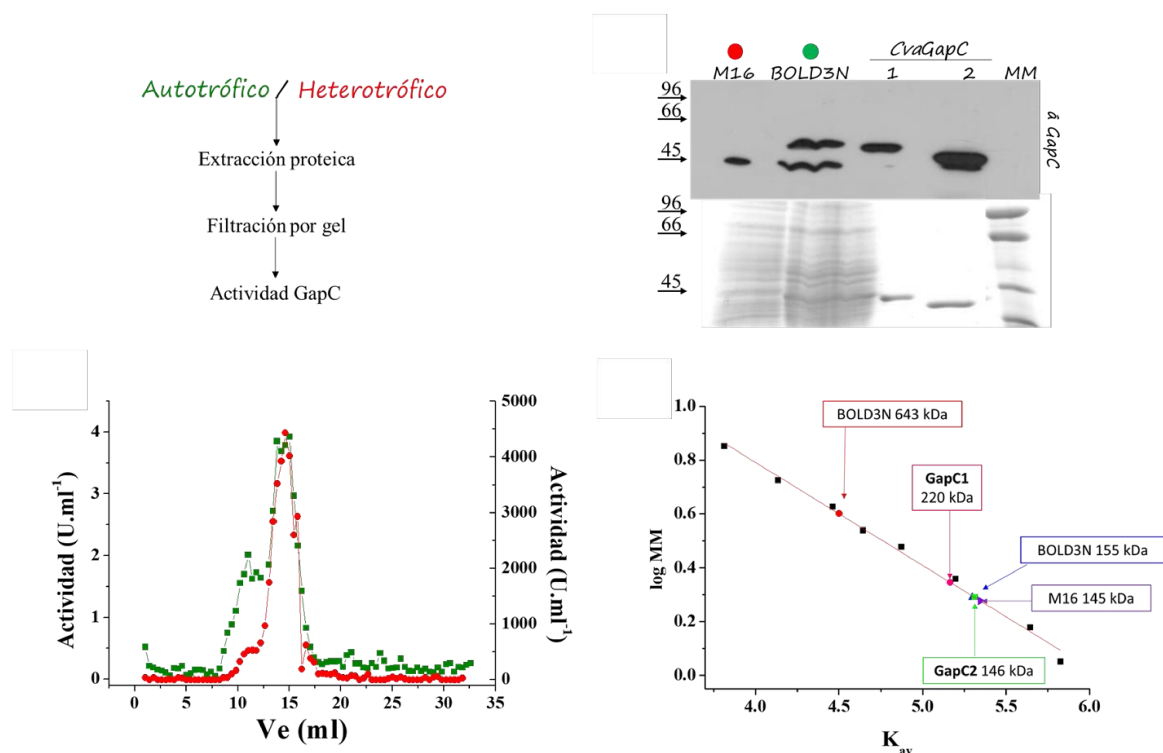


Figura 34. Análisis proteico y actividad Ga3PDHase en extractos provenientes de células de *Chlorella* sp. crecidas en condiciones auto- y heterotróficas. (A) Esquema de los pasos seguidos en el ensayo. (B) Superior: Inmunodetección de Ga3PDHase (GapC) resuelta por electroforesis (SDS-PAGE 12%). (B) Inferior: Perfil proteico, empleado para la inmunodeterminación, obtenido mediante SDS-PAGE 12% y tenido con Coomassie Brilliant Blue. En la parte superior se detalla lo que se sembró en cada calle. M16: células de *Chlorella* sp. crecida en medio de cultivo M16. BOLD3N: células de *Chlorella* sp. crecida en medio de cultivo BOLD3N. CvaGapC 1 y 2: enzimas Ga3PDHase 1 y 2 de *C. variabilis* obtenidas de forma recombinante. MM: marcador de masa molecular (C) Gráfico que representa la actividad Ga3PDHase determinada en cada una de las fracciones obtenidas de la filtración por gel. y (D) Determinación de la masa molecular nativa mediante filtración por gel empleando una columna de Superdex 200. La columna se calibró empleando moléculas de masa molecular conocida (cuadrados negros). Las flechas señalan los círculos que corresponden a Ga3PDHase obtenidas de manera diferente: recombinante GapC1 (círculo lila) y GapC2 (círculo rosado), a partir de extracto crudo de células de *Chlorella* sp. crecidas en medio de cultivo BOLD3N (círculos azul y rojo) y crecidas en medio de cultivo M16 (círculo verde).

Al analizar la actividad de la Ga3PDHasa en los extractos de *Chlorella* sp. resueltos por cromatografía de exclusión molecular, se observó que en ambas condiciones tróficas de cultivo el pico de actividad se obtiene en el volumen de elusión que corresponde a 14,62 ml (Figura 34 C). Este volumen de elusión, según la curva de calibrado de masa molecular de la columna, corresponde a una masa molecular de 145 kDa (Figura 34 D). Para los extractos provenientes de la condición autotrófica, se obtuvo además un segundo pico de actividad a un volumen de elusión de 10,75 ml (Figura 34 C, círculos verdes). Dicho volumen de elusión es muy cercano al límite que puede resolver la matriz empleada en la separación cromatográfica por lo que en estas condiciones no se puede calcular fehacientemente la masa molecular de esa estructura oligomérica. Todos estos resultados indicarían que *in vivo* no habría una isoforma activa de la enzima con una estructura cuaternaria homohexamérica.

Caracterización cinética de las dos isoformas de la Ga3PDHasa de C. variabilis producidas en forma recombinante.

Para poder conocer las características cinéticas de cada isoforma recombinante de la Ga3PDHasa de *C. variabilis*, realizamos una caracterización de su actividad y determinamos los parámetros cinéticos para cada una de las enzimas purificadas, tal como se describe en Materiales y Métodos. En la Tabla 5 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para la enzima en ambos sentidos de la reacción, oxidación de Ga3P y reducción de 1,3bisPGA. Comparando los valores obtenidos para cada una de las enzimas, se obtiene que la Ga3PDHasa 1 tiene aproximadamente el doble de afinidad por el D-Ga3P y la mitad de la afinidad por el NAD⁺ que la Ga3PDHasa 2. Mientras que, las isoformas no presentaron diferencias significativas con respecto a la velocidad máxima en sentido de oxidación del D-Ga3P. En el sentido inverso de reacción, la velocidad de reducción del 1,3bisPGA es dos veces mayor cuando ocurre mediante la Ga3PDHasa1, sin observarse diferencias en la afinidad por los sustratos con la Ga3PDHasa2.

Tabla 5. Caracterización cinética de ambas isoformas de <i>CvaGapC</i> recombinante en sentido de la oxidación del D-Ga3P y de la reducción del 1,3bisPGA.				
Enzima	Sustrato	K_m (mM)	V_{max} (U.mg⁻¹)	k_{cat}/K_m (M⁻¹.s⁻¹)
GapC 1	D-Ga3P	0,37 ± 0,04	65 ± 3	1,2 x 10 ⁵
	NAD	0,07 ± 0,01		6,3 x 10 ⁵
	1,3bisPGA	(6,2 ± 0,9) x 10 ⁻⁴	47 ± 2	5,2 x 10 ⁷
	NADH	0,17 ± 0,02		1,9 x 10 ⁵
GapC 2	D-Ga3P	0,71 ± 0,04	50 ± 2	4,4 x 10 ⁴
	NAD	0,031 ± 0,002		1,0 x 10 ⁶
	1,3bisPGA	(6 ± 0,1) x 10 ⁻⁴	20 ± 1	2 x 10 ⁷
	NADH	0,13 ± 0,01		9,4 x 10 ⁴

Las propiedades y los valores de los parámetros cinéticos determinados a partir de la caracterización cinética de Ga3PDHasa 1 y 2, fueron similares a lo ya descrito para la Ga3PDHasa de otros organismos [136] [137].

Modificación genética de *Chlorella* sp.

Varias especies de *Chlorella* se emplean actualmente a escala industrial para obtener aminoácidos esenciales, proteínas de alta calidad, ácidos grasos, minerales y compuestos bioactivos. Estos compuestos tienen aplicación en la industria alimenticia o la de biodiésel, por nombrar algunas, y su producción en *Chlorella* spp. está directamente relacionada a las condiciones en las que se cultiva a las células. Las condiciones de cultivo pueden variar dependiendo de la presencia o no de luz y de fuentes externas del carbono, activando en las células las vías metabólicas necesarias para un metabolismo autotrófico o heterotrófico que afectan el tipo de compuestos sintetizados y almacenados por las células. Con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, también es posible incidir en las vías metabólicas de las células mediante el aumento o disminución de la expresión de genes específicos. Esto podrá impactar en una o más vías metabólicas, dependiendo de los sustratos y productos que derivan de la reacción o de otras funciones asociadas a la proteína seleccionada. La modificación genética definida y fundada, permite incidir de manera concreta en las vías metabólicas y destinar mejor los recursos hacia la síntesis de compuestos con aplicación en la industria.

En este trabajo, luego de estudiar el metabolismo de *Chlorella* sp. en las diferentes condiciones de cultivo, nos propusimos evaluar la modificación genética de estas células. Con la idea de estudiar vías metabólicas relacionadas al metabolismo del carbono y el poder reductor, elegimos sobreexpresar el gen que codifica para la np-Ga3PDHase (codificada cuando sea necesario como CPRasa). Esta enzima es una de las alternativas que tiene la célula para oxidar el Ga3P proveniente desde la glucólisis (vía predominante en ausencia de luz y presencia de fuentes de carbono externas) o de la fotosíntesis (vía predominante en presencia de luz). La np-Ga3PDHase se expresa en bajas proporciones en las células [55] [46], sin embargo tiene la capacidad de producir poder reductor (NADPH) en el citosol como consecuencia de la oxidación de las triosas-P. Aunque esto ocurre en detrimento de la síntesis de ATP (que deriva de la vía de oxidación del Ga3P mediante la Ga3PDHase), esta modificación podría impactar en vías metabólicas que dependen del poder reductor.

Evaluación de diferentes metodologías de transformación de Chlorella sp.

Existen varios métodos de transformación descritos para algunas algas verdes unicelulares [138] [139] [107] [140], todos con resultados muy variables en cuanto a eficiencia de transformación, niveles de expresión y de estabilidad de las cepas transformadas. Con el fin de encontrar una técnica que nos permita transformar *Chlorella* evaluamos cuatro metodologías diferentes: (I) electroporación de protoplastos, (II) transformación de protoplastos con PEG, (III) transformación de células intactas con *A. tumefaciens* y (IV) electroporación de células intactas.

Para evaluar la eficiencia de transformación de la cepa de *Chlorella* sp. que utilizamos en nuestros estudios, se emplearon los plásmidos comerciales pCambia1302 (diseñado para plantas, pero que ya ha sido utilizado con éxito en cepas de algas [141]) y el plásmido comercial p_Chlamy3, disponible para expresión de genes en *Chlamydomonas* (*GeneArt*® *Chlamydomonas TOPO*® *Engineering Kit, Life technologies*). Ambos plásmidos contienen un gen que les confiere resistencia a Higromicina a las células que incorporan el plásmido. Esta capacidad, es la que se empleó para evaluar los ensayos de transformación.

En primer lugar, se determinó la concentración de antibiótico que hay que utilizar para la selección de las células de *Chlorella* sp. transformadas. Para esto, se cultivaron las células del alga en presencia de concentraciones variables del antibiótico empleado como marcador de selección. El ensayo consistió en un crecimiento en placa de entre 8×10^6 o 2×10^8 células empleando un medio

de cultivo semisólido BOLD3N-glc 1,5% agar, con concentraciones variables de higromicina entre 0-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Luego de incubar las placas por 10 días, incluso las que contenían mayor concentración de células, no presentaron desarrollo en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina (Figura 35). De esta manera, podemos asegurarnos que la presencia de colonias en la placa con antibiótico podría ser por una resistencia al mismo y no por una deficiencia en el marcador de selección o una resistencia natural de las células de *Chlorella* sp.

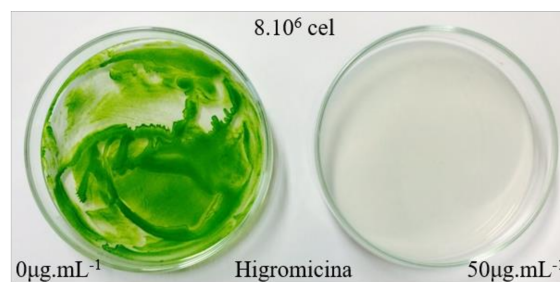


Figura 35. Estudio de la resistencia natural de *Chlorella* sp. al antibiótico higromicina. Fotografía del crecimiento celular de *Chlorella* sp. en medio BOLD3N-glc 1% agar con 0 y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del antibiótico higromicina. Al inicio se sembraron 8×10^6 células. La foto se tomó a los 10 días.

Electroporación de protoplastos

Los protoplastos se generaron incubando 5×10^8 células con 10 ml de celulasa de *Trichoderma longibrachiatum* 4% (p/v) en *buffer* fosfato salino (PBS) durante 24 h a 23 °C, tal como se describe en Materiales y Métodos. Para evaluar la eficiencia de generación de protoplastos, se realizó un recuento celular mediante cámara de Neubauer a partir de una alícuota de la solución con protoplastos (100% células intactas más protoplastos). Luego se incorpora a la solución detergente Nonidet P-40 a una concentración de 0,1% o 0,004%. Teniendo en cuenta que las células intactas contienen pared celular y eso las protege frente al Nonidet P-40, realizamos nuevamente un recuento celular en la mezcla (% de células intactas) resultando en una eficiencia del 30% de generación de protoplasto.

Una vez obtenidos los protoplastos los mismos fueron sometidos a electroporación. En todos los casos se realizó un control de viabilidad para asegurarse que la técnica no mataba las células y un control negativo para corroborar que las células no resistan naturalmente al marcador de selección (higromicina). Luego de mantener las células en placa con medio de cultivo sólido

BOLD3N-glc 1,5% agar durante 10 días, no se presenció crecimiento celular de las células transformadas. Por otro lado, se observó crecimiento celular en el control de viabilidad indicando que las células eran capaces de resistir la técnica empleada pero no de incorporar el gen que les otorgaba resistencia al marcador de selección.

Transformación de protoplastos empleando PEG

Dado que la transformación de protoplastos no nos permitió tener células transformadas, evaluamos la técnica de transformación mediante el uso de PEG y microesferas de vidrio como se describe en Materiales y Métodos. Las células de *Chlorella* sp. tratadas fueron sembradas en placas con medio de cultivo BOLD3N-glc 1.5% agar con 50 µg/ml de higromicina y se realizaron los controles pertinentes. A los 7 días se observó crecimiento de las células transformadas y el resultado esperado en los controles. Las colonias obtenidas se repicaron tanto en medio líquido BOLD-3N como en medio sólido BOLD3N-glc 1.5% agar con 50 µg/ml de higromicina. Sin embargo, luego de 10 días de cultivo, ninguna de las colonias logró desarrollarse tanto en condiciones de cultivo auto como heterotróficas. Debido a esto decidimos continuar evaluando otras técnicas de transformación.

Transformación de células intactas con A. tumefaciens

En un nuevo intento de transfectar las células de *Chlorella*, se decidió probar una técnica que es muy efectiva y utilizada en el instituto para transformar plantas. En esta técnica se emplea la bacteria *A. tumefaciens* transformada con el vector p_CAMBIA1302 como se explicó en Materiales y Métodos. Las células de *Chlorella* sp. y *A. tumefaciens* se co-cultivaron en medio inductor sólido (BOLD3N-agar + acetociringona) y luego de dos días, se crecieron en medio selectivo líquido (BOLD3N + higromicina) en condiciones autotróficas. A las 48 h, se separó la fracción soluble de la insoluble mediante centrifugación y la fracción insoluble fue plaqueada en medio selectivo sólido. En ambos casos celulares, luego de cinco días, se observó crecimiento y por lo tanto, resistencia al marcador de selección. Debido a que las células de *A. tumefaciens* también demostraban resistencia a higromicina, decidimos promover el cultivo de *Chlorella* sp. o desalentar el de *A. tumefaciens*, realizando un cultivo en condiciones autotróficas empleando medio de cultivo selectivo. Sin embargo, luego de varios repiques, no pudimos separar las células de *Chlorella* sp. de las de *A. tumefaciens*. Por este motivo decidimos probar la técnica de electroporación de células intactas que se describe a continuación.

Electroporación de células intactas

Para electroporar las células intactas, se emplearon células de *Chlorella* sp. y el vector de clonado p_Chlamy3 tal como se describe en Materiales y Métodos. Previa a la electroporación, se ensayaron dos soluciones para tratar las células de *Chlorella* sp.: (I) sorbitol y manitol 0,2 mM y (II) *GeneArt® MAX Efficiency® Transformation Reagent*. Posterior a la electroporación, las células se resuspendieron en medio de cultivo líquido (BOLD3N-Glc) y se mantuvieron en condiciones heterotróficas durante 20 h, momento en el que se plaquearon en medio selectivo sólido (BOLD3N-Glc, 1,5% agar y 50 mg/l de higromicina). Luego de 5 días de crecimiento mixotrófico, se observó crecimiento de las células tratadas con *GeneArt® MAX Efficiency® Transformation Reagent*, a diferencia del control negativo que no presentó crecimiento celular. Las células resistentes al marcador de selección se evaluaron mediante PCR y en cuanto a su capacidad de sintetizar diferentes compuestos de reserva (lípidos y almidón). En todos los casos los resultados se analizaron comparando con los valores obtenidos en las células de *Chlorella* sp. sin transformar.

Transfección de Chlorella sp. y selección de los clones que contienen el gen de interés

Para poder expresar el gen que codifica para la np-Ga3PDHase de *A. thaliana* en *Chlorella* sp., se clonó el gen *AthGapN* en el vector p_Chlamy3 entre los sitios *Bgl*III y *Not*I. En el manual del kit empleado, el fabricante recomendaba linealizar el plásmido empleando la enzima de restricción *Sca*I para aumentar la eficiencia de transformación. Sin embargo, luego de realizar un análisis de la secuencia de *AthGapN*, se observó que presentaba un sitio *Sca*I que escindía el gen a la mitad. Por este motivo se evaluó detalladamente el mapa génico del vector de expresión y se encontró, previo al promotor, un sitio para la enzima *Pvu*I, que fue la que utilizamos para linealizar el plásmido.

Para la transformación, se crecieron células en condiciones autotróficas, y se transformaron con 4 µg de la construcción plasmídica pChlamy_3/*AthGapN* linealizado. Las células transformadas con la construcción de interés, se codificarán en adelante como CPRasa⁺. Luego de 5 días de cultivo mixotrófico, posteriores a la transformación, se observaron colonias en la placa CPRasa⁺ a diferencia del control negativo que no tuvo desarrollo celular. De la placa con las células CPRasa⁺ transformadas, se tomaron 30 colonias y se repicaron en medio de cultivo semisólido BOLD3N-agar 1,5% con 50 mg/l de higromicina. Luego de 5 días de cultivo autotrófico, crecieron 8 colonias que se pasaron a cultivo líquido con antibiótico empleando los medios de cultivo GOLGI y ENVA para las condiciones autotróficas y heterotróficas, respectivamente. Los cultivos de cada uno de

estos clones, se amplificaron a fin de obtener la biomasa requerida para realizar los estudios necesarios. Para conservar las células transformadas, 1×10^8 células/ml de cada colonia se resuspendió en el *buffer* A del kit GeneArt™ Cryopreservation Kit for Algae (Cod. Sigma: A24228) y se conservaron a -80 °C.

Para evaluar la inserción del gen de interés en los clones de *Chlorella* sp., se seleccionaron 4 colonias (col. 7, 8, 11 y 24), se extrajo su ADN genómico y se amplificó el gen *AthGapN* por PCR. En la Figura 36 se muestra el gel de agarosa 1% obtenido luego de realizar una PCR empleando oligos para la *AthGapN* y como molde ADN genómico (ADNg) de células de *Chlorella* sp. col 7, 8, 11 o 24, crecidas en condiciones heterotróficas en presencia/ausencia de antibiótico. Como se puede ver en la figura, no hubo amplificación en los controles negativos (ADNg de *Chlorella* sp. wt y blanco de reactivo sin ADNg). Por otro lado, en las colonias 7, 8 y 24 hubo amplificación del gen que codifica para la *AthGapN* al igual que en el control positivo (vector p_Chlamy3/*AthGapN*).

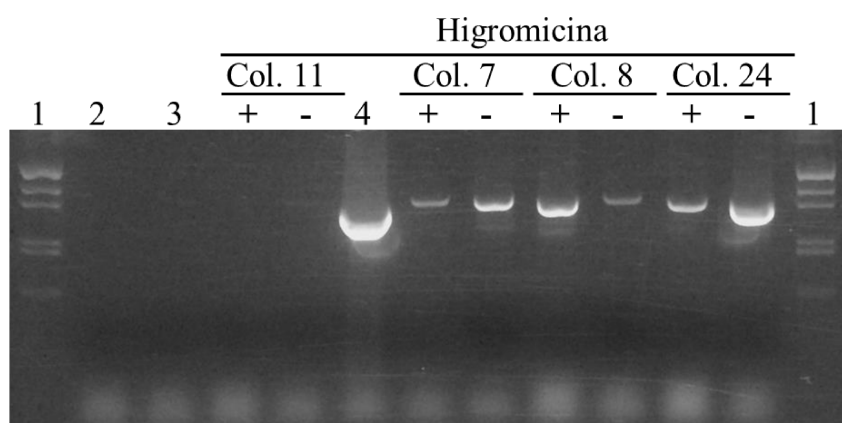
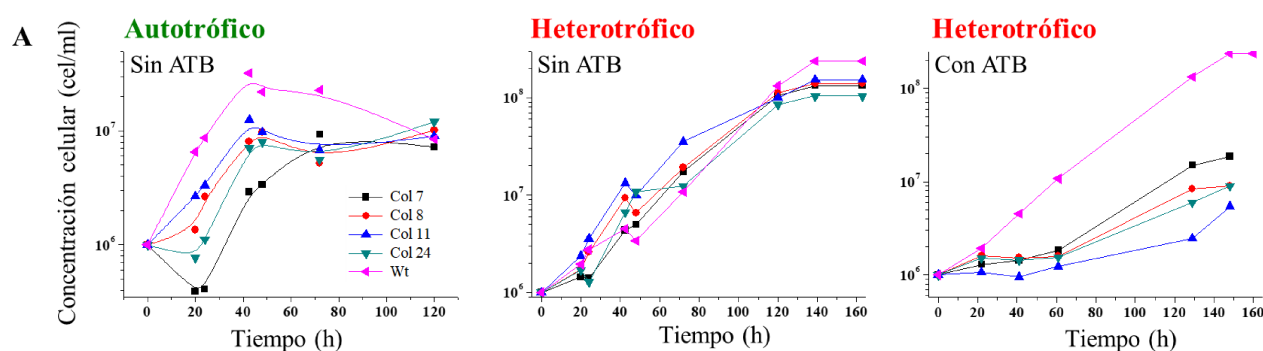


Figura 36. Evaluación mediante PCR de la inserción de *AthGapN* en el genoma de *Chlorella* sp. Gel de agarosa 1% obtenido de una PCR realizada empleando oligos para *AthGapN* y ADNg de las colonias 11, 7, 8 y 24 crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de higromicina. En todos los casos: (1) marcador de masa molecular, (2) blanco de reactivos (sin ADNg), (3) control negativo (con ADNg de *Chlorella* sp. wt) y (4) control positivo (con p_Chlamy3/*AthGapN*).

Caracterización bioquímica de los clones de *Chlorella* sp. CPRasa⁺

Para el escalado de cultivo y posterior caracterización, las células se cultivaron en presencia o no de higromicina y en condiciones autotróficas utilizando el medio de cultivo GOLGI o en condiciones

heterotróficas en el medio ENVA. Los cultivos se realizaron en erlenmeyers en condiciones agitadas (160 rpm) a 23-25 °C con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 h para las condiciones autotróficas o en total oscuridad para la condición heterotrófica. Se tomaron muestras del cultivo cada 24 h y se realizó un recuento celular empleando una cámara de Neubauer hasta que cada cultivo llegó a la fase estacionaria. En la Figura 37 se muestran las cinéticas de crecimiento celular para cada condición de cultivo.



B

	velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1})		
	ENVA	GOLGI	ENVA + ATB
Wt	$0,040 \pm 0,004$	$0,082 \pm 0,005$	
Col 7	$0,039 \pm 0,002$	$0,07 \pm 0,01$	$0,028 \pm 0,003$
Col 8	$0,037 \pm 0,002$	$0,067 \pm 0,009$	$0,024 \pm 0,002$
Col 11	$0,051 \pm 0,004$	$0,059 \pm 0,005$	$0,015 \pm 0,003$
Col 24	$0,036 \pm 0,003$	$0,088 \pm 0,008$	$0,0202 \pm 0,0003$

Figura 37. Cinética de proliferación para *Chlorella* sp. wild type (wt) y transgénicas. (A) Caracterización del cultivo de *Chlorella* sp. wt y las sobreexpresantes de *AthGapN* (colonias 7, 8, 11 y 24) crecidas sin presencia de higromicina (ATB) en condiciones autotróficas y heterotróficas y en presencia de ATB en condiciones heterotróficas. (B) Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento para cada caso.

Como se observa en la Figura 37, las células crecidas en ausencia de higromicina y en condiciones autotróficas alcanzaron la fase estacionaria a las 40 h de comenzado el cultivo. El comportamiento de crecimiento fue muy similar entre las distintas colonias presentando un valor de $\sim \mu: 0,08 \text{ h}^{-1}$ a pesar de que el cultivo wt obtuvo 3 veces mayor concentración celular que las células modificadas genéticamente.

Con respecto al comportamiento de las células cultivadas en condiciones heterotróficas y en ausencia de antibiótico, se observó una velocidad de crecimiento 2 veces menor que en condiciones autotróficas (μ : 0,04 h⁻¹) lo que se vio reflejado en una fase exponencial más extensa en el tiempo. La máxima concentración celular se obtuvo a las 140 h, momento en el que el cultivo alcanza la fase estacionaria, presentando un orden de magnitud mayor al obtenido en la condición autotrófica. Cuando se analizó el crecimiento de células en condiciones heterotróficas pero en presencia de higromicina, el valor de μ en las *Chlorella* sp. transformadas disminuyó a la mitad con respecto a la cepa wt (que crecía en ausencia de antibiótico).

Con el fin de evaluar la acumulación de lípidos en las células, se realizó un ensayo cualitativo empleando un microscopio de epifluorescencia y el colorante fluorescente Rojo Nilo que puede unirse a los ácidos grasos de manera específica. Como puede observarse en la Figura 38, en las colonias 8 y 24 aparecen partículas esféricas fluorescentes formadas por lípidos neutros tanto en condiciones autotróficas como heterotróficas. Por otro lado, en las células wt, están ausentes en las células crecidas en condiciones autotróficas (GOLGI). Además, cuando se determinó cuantitativamente la concentración de TAG y almidón en ambos cultivos (Tabla 6), resultó que en comparación con la cepa wt, la cantidad de TAG fue mayor en las cepas transformadas independientemente de las condiciones de cultivo. A su vez, eso se vio reflejado en un detrimento del contenido de almidón obteniéndose valores máximos en las cepas wt.

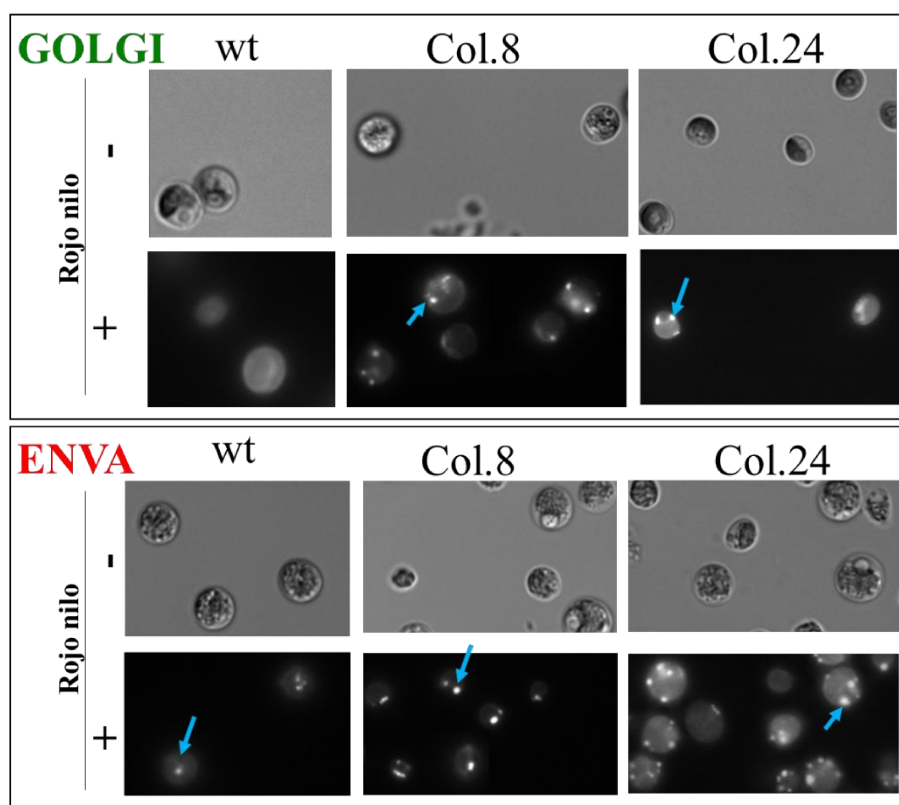


Figura 38. Ensayo cualitativo de la acumulación de lípidos neutros en *Chlorella* sp. Microfotografías de células de *Chlorella* sp. wt (wild type) y las transgénicas colonia 8 y 24 incubadas en presencia (+) o ausencia (-) del colorante fluorescente Rojo nilo (RN). Las células crecieron en condiciones autotróficas con medio de cultivo GOLGI o heterotróficas con ENVA. Las flechas celestes señalan partículas de TAG teñidas con el colorante fluorescente Rojo Nilo.

Tabla 6. Cuantificación del contenido de TAG y almidón en los extractos crudos de células de *Chlorella* sp. wt (wild type) y transgénicas (colonias 7, 8 y 24) crecidas en condiciones heterotróficas (ENVA) y autotrófica (GOLGI).

	mg TAG/g biomasa		mg almidón/g biomasa	
	Heterotrófica	Autotrófica	Heterotrófica	Autotrófica
Wt	0,167 ± 0,001	0,122 ± 0,005	510 ± 46	400 ± 22
Col 24	7,92 ± 0,02	0,621 ± 0,004	280 ± 13	125 ± 9
Col 8	6,72 ± 0,02	0,276 ± 0,004	263 ± 11	76 ± 6
Col 7	6,16 ± 0,03	0,329 ± 0,003	218 ± 11	83 ± 7

Tomando cada cepa en particular y comparando con los valores obtenidos para la cepa wt:

- Colonia 7 acumuló ~37 veces más TAG y ~2 veces menos almidón en condiciones heterotróficas, mientras que, en condiciones autotróficas, acumuló ~3 veces más TAG y ~5 veces menos almidón.

- Colonia 8 acumuló ~40 veces más TAG y ~2 veces menos almidón en condiciones heterotróficas, mientras que, en condiciones autotróficas, acumuló ~2 veces más TAG y ~5 veces menos almidón.

- Colonia 24 acumuló ~47 veces más TAG y ~2 veces menos almidón en condiciones heterotróficas, mientras que, en condiciones autotróficas, acumuló ~5 veces más TAG y ~3 veces menos almidón.

La investigación del metabolismo del carbono en algas eucariotas ha proporcionado información fundamental sobre muchos procesos celulares básicos, particularmente la fotosíntesis [142]. Recientemente, las algas han resurgido como potenciales materias primas para biocombustibles como el biodiésel y el bioetanol [143] [144] [145], y han atraído un considerable interés de los sectores público y privado. Se han caracterizado distintas algas que tienen altas tasas de crecimiento fotoautotrófico y pueden acumular lípidos en más de la mitad de su biomasa en peso seco [117], incluyendo TAG y una serie de productos farmacéuticos y nutracéuticos de alto valor [146]. Sin embargo, en comparación con las plantas agrícolas, las algas no poseen los rendimientos necesarios para la producción económica de biocombustibles [143], Por este motivo, se requieren herramientas robustas de biología molecular para la optimización de las cepas [147].

Los resultados obtenidos demuestran, no sólo el desarrollo de un sistema de transformación de *Chlorella* sp. eficiente, sino también la optimización de cepas capaces de sintetizar mayor acumulación de lípidos, incluso en condiciones autotróficas. Estos resultados aportan una buena perspectiva para la mejora biotecnológica de *Chlorella* sp. y su potencial aplicación a nivel industrial.

Discusión

Chlorella es un alga verde unicelular que presenta un metabolismo muy flexible lo que permite que cualquier variación del entorno durante su crecimiento, modifique la síntesis de almidón, lípidos y proteínas, entre otras cosas. En los últimos años se ha profundizado el estudio sobre la variación del metabolismo del carbono en *Chlorella* spp. realizando modificaciones de diferentes factores involucrados en su crecimiento: (I) la composición del medio de cultivo [91] [148] [149], (II) la cantidad, calidad y tipo de luz [150] [151] [152] y (III) el sistema empleado para su crecimiento [96] [112].

En este trabajo se demostró que la modificación de diferentes factores durante el crecimiento de *Chlorella* spp. se refleja en variaciones del metabolismo del carbono. Incluso cuando se emplearon diferentes cepas de la misma, un cambio en el crecimiento auto- a heterotrófico, favoreció la síntesis de lípidos o almidón de manera diferencial. En la Figura 39 se muestra un esquema representativo de la acumulación de los diferentes compuestos de reserva para las cepas de *Chlorella* estudiadas. Son de resaltar las diferencias que hay entre ellas en cuanto a la cantidad y tipo de la fuente de carbono de reserva.

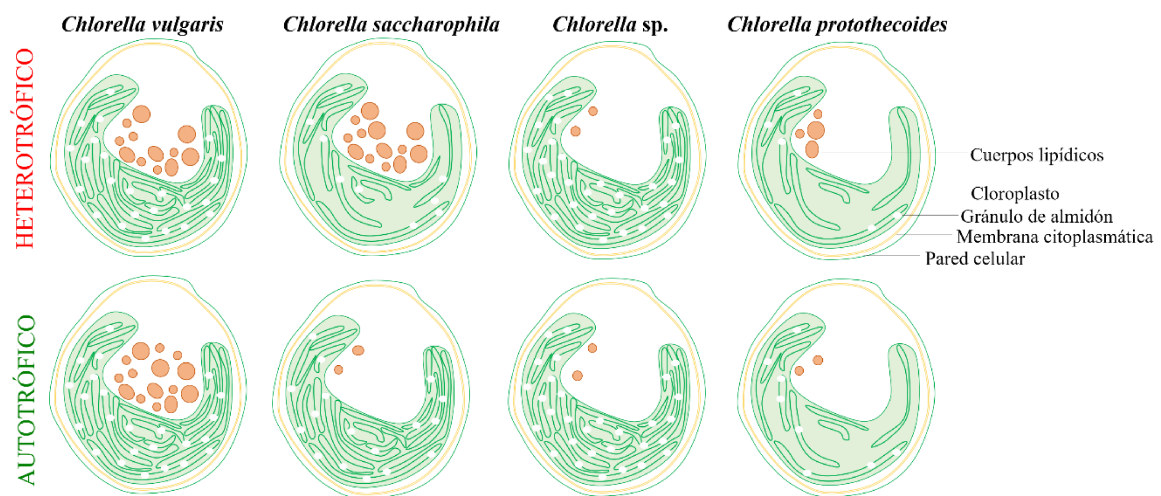


Figura 39. Esquema representativo de la acumulación de TAG y almidón en las diferentes cepas de *Chlorella* creciendo en ambas condiciones tróficas de cultivo (autotrófico y heterotrófico).

Resultados similares han sido obtenidos por otros autores. Por ejemplo, en un trabajo publicado por Z. Ikarán y col., [153] se describió cómo varía la acumulación de TAG y almidón en *C. vulgaris* cuando se modifican los componentes del medio de cultivo. En condiciones de alta concentración de nitrógeno, las células presentaban mayor velocidad de crecimiento y acumulación de almidón que en condiciones de baja concentración, donde acumulan principalmente TAG. Analizando esta

variación en la síntesis de los compuestos de reserva en los cambios del contexto metabólico, los autores sugirieron que el carbono fotosintéticamente fijado se dirigía hacia la síntesis de lípidos porque la deficiencia de nitrógeno detiene la síntesis de carbohidratos. En un trabajo publicado por Tingting Li y col, [91] se mostró que, cuando *Chlorella sorokiniana* crecía en condiciones heterotróficas o mixotróficas, la acumulación de lípidos aumentaba concomitantemente con la disminución de almidón. En dicho trabajo se demostró, mediante cuantificación de transcritos relacionados al catabolismo del almidón (a partir de ARNm extraído en cada condición trófica), que el aumento de la síntesis de lípidos se relacionaba con el aumento de los niveles de ARNm de iso-amilasa y beta-amilasa. Además, en las condiciones donde se acumulaba mayor cantidad de almidón, el transcripto para la enzima ADP-Glc PPasa se mantuvo elevado, reflejando un equilibrio catabolismo/anabolismo más favorecido hacia la ruta biosintética. En el caso de *Chlorella protothecoides*, en condiciones heterotróficas la alga acumulaba 4 veces más lípidos y sólo 1,4 veces menos almidón en comparación con la condición autotrófica [96].

La biosíntesis de almidón y lípidos ha sido menos estudiada en algas, en comparación con plantas superiores, a pesar de su importancia potencial en aplicaciones como la producción de bioetanol y biodiésel. Está descrito en la bibliografía que la partición del carbono en las plantas se produce entre dos tipos de tejidos diferentes: fotosintético (o autótrofo) y no fotosintético (o heterótrofo). Por lo tanto, los fotosintatos deben dividirse no solo dentro de la célula, sino también entre los diferentes tejidos. En general, la partición de carbono intracelular se produce entre el cloroplasto y el citosol mediante las triosa-P; mientras que la Suc es el principal metabolito involucrado en la partición del carbono intercelular. Sin embargo, en las algas verdes unicelulares, las condiciones fotosintéticas y heterotróficas tienen lugar dentro de la misma célula, dependiendo únicamente de las condiciones tróficas del cultivo.

Para estudiar la partición de carbono dinámico analizamos células de *Chlorella* sp. crecidas en diferentes condiciones tróficas de cultivo. Estas células presentaron diferentes perfiles proteicos y mostraron no solo una expresión diferencial de proteínas específicas involucradas en pasos claves del metabolismo del carbono sino también diferencias en la actividad enzimática de las mismas. Al igual que para el caso de *C. sorokiniana* [91] donde los niveles de transcritos para la ADP-Glc PPasa aumentaban concomitantemente con la síntesis de almidón, en *Chlorella* sp. se pudo determinar un aumento en la actividad enzimática de la misma. Por otro lado, cuando el metabolismo del carbono se vio favorecido hacia la síntesis de lípidos, se obtuvo mayor actividad de la enzima Ga3PDHase. Un estudio transcriptómico realizado en *Chlorella vulgaris* por Feifei Chu y col [154] mostró cómo la regulación de la expresión de distintas enzimas estaba

estrechamente relacionada con las condiciones tróficas del cultivo. Cuando el alga crecía en escasas de nitrógeno pero con altas concentraciones de fósforo (N^-P^+), se veía favorecida la expresión de los genes que codifican para las enzimas relacionadas a la fijación del CO_2 , glucólisis, síntesis de piruvato, ciclo del TCA y síntesis de ácidos grasos en comparación con N^-P^- o N^+P^+ . Resultados similares se obtuvieron para *Chlorella pyrenoidosa* [123].

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis enfatizan la importancia de caracterizar el metabolismo del carbono en algas. Estudiamos, principalmente, las enzimas relacionadas al metabolismo del Ga3P: I- np-Ga3PDHasa, II- Ga3PDHasaA/B y III- Ga3PDHasa debido a que su transporte y metabolismo dentro de la célula, esta involucrado en el tipo de compuesto de reserva que se sintetizará.

Mediante homología de secuencias, pudimos encontrar los genes que codificaban para las enzimas. Para el caso de np-Ga3PDHasa, debido a que el genoma de *Chlorella variabilis* no estaba totalmente secuenciado, sólo encontramos en la base de datos un secuencia trunca, con ~ 74 aminoácidos menos en el extremo C-terminal. En la bibliografía está reportado que dichos aminoácidos están involucrados en la unión de la enzima con el sustrato [155] por lo que se debe obtener, como primera medida, una secuencia completa para su posterior caracterización cinética. Con respecto a Ga3PDHasaA/B, en diferentes trabajos publicados, se informa que, en *Chlorella* spp., es una enzima con estructura cuaternaria del tipo homotetramérica [127] [129]. La enzima Ga3PDHasaA se produjo de forma recombinante y se purificó mediante precipitación salina seguida de filtración por gel, tal como se reportó para otros organismos [131] [132] [130]. Luego se determinó actividad enzimática obteniéndose un valor inferior a lo observado en bibliografía para otras células vegetales. En un trabajo publicado por Ferri y col. [132] purifican Ga3PDHasaA de hoja de espinaca (de la misma manera) y obtienen una actividad enzimática total de 7200 U, siendo de 0.216 U el obtenido para *C. variabilis*. Para el caso de *Triticum aestivum*, I. I. Chernyad'ev and O. F. Monakhova [134], miden actividad en el extracto crudo de hojas y semillas obteniendo una AEE de 0,24 y 0,154 U/mg, respectivamente.

No hay en la actualidad trabajos en los que hayan caracterizado cinéticamente la GapA de algas verdes unicelulares por lo que la comparación no puede ser exacta. Pero de igual manera, se debe mejorar la producción y estabilidad de la enzima ya que por estas razones no pudimos avanzar en su caracterización cinética. Con respecto a la Ga3PDHasa, se encontraron dos genes que codifican para la enzima citosólica. La existencia de dos isoformas citosólicas se vio también en *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlamydomonas reinhardtii* y *Arabidopsis thaliana* [123] [156] [157] [158]. Ambos genes se clonaron, se expresaron y se purificaron mediante IMAC. Mediante filtración por gel

detectamos la masa molecular nativa para GapC1 (220 kDa) y GapC2 (146 kDa) correspondiendo a una estructura cuaternaria homohexamérica y homotetramérica, respectivamente. La estructura hezamerica llama la atención ya que no se observaron para ninguna otra Ga3PDHasa, la bibliografía se informa que las Ga3PDHasas son enzimas con estructura cuaternaria homotetramérica [135] [158] [159]. Cuando se analizó mediante filtración por gel los extractos crudos de *Chlorella* sp. crecida en condiciones auto- y heterotróficas, se concluyó que la estructura que se corresponde con la actividad enzimática analizada, constaría de 4 monómeros iguales. En función de lo obtenido para la estructura cuaternaria de la GapC1, especulamos que puede deberse a la presencia de unos 27 aminoácidos adicionales presentes en el extremo N-terminal, habría que clonar el gen y expresarlo sin ese extremo para corroborar esta hipótesis. Ambas isoformas de la Ga3PDHasa de *C. variabilis* se pudieron caracterizar cinéticamente. En el sentido correspondiente al de la glucólisis, se obtuvieron valores de actividad enzimática específica similares a los reportados para *A. thaliana* pero el doble de lo informado para *T. aestivium* [160] [158]. Además, se determinaron los parámetros cinéticos en sentido de la gluconeogénesis, demostrando que ambas isoformas son específicas para el par NAD^+/NADH . Muy poco se ha estudiado sobre la cinética de reacción de las diferentes isoformas de la Ga3PDHasa citosólica y su comportamiento en sentido reducción del 1,3bisPGA, por lo que estos resultados aportan conocimiento sobre el comportamiento de ambas enzimas en células vegetales.

La información que se ha obtenido mediante el estudio del metabolismo del carbono en *Chlorella* spp. permite especular sobre la manipulación genética racional y fundada, con el objetivo de conseguir maximizar la producción de ácidos grasos y/o almidón. Por ejemplo la sobreexpresión de la enzima malato deshidrogenasa (MDH) promueve la conversión de oxaloacetato en malato que produce CO_2 a partir de los descarboxilatos. A través de este proceso, el CO_2 puede canalizarse hacia el ciclo TCA y la vía de fijación de carbono para la acumulación de biomasa y otros metabolitos [154]. Se ha informado que MDH está relacionado con el suministro de NADPH para la desaturación de ácidos grasos y la biosíntesis de lípidos [161]. En *C. vulgaris*, el NADPH producido por MDH, preferiblemente se canaliza hacia la biosíntesis de lípidos en lugar de hacia la desaturación de ácidos grasos [161] [154]. Toda esta información se obtuvo mediante análisis transcriptómico [154]. Otra manera de aumentar la síntesis de NADPH en el citosol de estas células, es mediante la reacción de oxidación del Ga3P catalizada por np-Ga3PDHasa. En el laboratorio se observó que una sobreexpresión de dicha enzima, en *A. thaliana*, resulta en un aumento de la producción de lípidos por semilla, mayor biomasa y menor velocidad de crecimiento. Estos resultados destacan la importancia de relacionar la información bioquímica conocida sobre el

metabolismo de carbono, con las tecnologías que permiten modificaciones genéticas y así optimizar la producción de compuestos con interés industrial a partir de un determinado microorganismo.

En este trabajo, transformamos genéticamente *Chlorella* sp. mediante electroporación y obtuvimos clones que sobreexpresan la np-Ga3PDHasa. Se obtuvieron resultados positivos cuando se empleó también, la electroporación, en *Chlorella pyrenoidosa* y *vulgaris* [140] [124] pero empleando sistemas de expresión utilizados en plantas superiores. En las cepas de *Chlorella* sp. que sobreexpresan el gen CPRasa⁺, el crecimiento celular no fue diferente a la cepa WT. Sin embargo, cuando se analizaron los compuestos de reserva, fue notable el aumento en el contenido de TAG en los clones de las cepas modificadas genéticamente. Con la modificación realizada, se pudo incidir sobre el flujo metabólico, obteniéndose cepas de *Chlorella* sp. capaces de acumular entre 20-50 veces más mg TAG por gramo de biomasa. No se han informado previamente resultados similares para algas verdes unicelulares. Además, teniendo en cuenta la importancia y la necesidad que ha generado últimamente la obtención de biocombustibles, éste es un resultado con grandes potenciales para su aplicación industrial.

Asimismo, logramos encontrar una metodología de transformación para *Chlorella* spp. exitosa y fácilmente aplicable, que permite realizar cualquier estudio genotípico/fenotípico inicial en células vegetales sin tener que acudir a la transformación de plantas superiores. *Chlorella* posee modificaciones postraduccionales, que permiten la síntesis de proteínas funcionales, como las utilizadas para vacunas, hormonas y medicamentos [162] [163]. Además, permite una optimización en numerosas aplicaciones de *Chlorella* spp. como alimentos y suplementos nutricionales [164] [62] e inmunoestimulantes y posible agente antitumoral [165] [166]. Recientemente, Guarnieri y col. [167] secuenciaron el genoma de *C. vulgaris* UTEX 395 y depositaron las secuencias en NCBI GenBank (LDKB00000000), lo que podría ofrecer una nueva vía para la identificación de genes funcionales y, por lo tanto, una mejor comprensión de la biología en el caso de *C. vulgaris*. El rápido desarrollo de las técnicas de secuenciación de última generación permitió la secuenciación económica de todo el transcriptoma de una célula, lo que permite una visión global de las respuestas celulares a diversas condiciones de cultivo y tensiones ambientales.

Conclusiones

1- Caracterizamos el crecimiento de *Chlorella* spp. en condiciones autotróficas y heterotróficas obteniendo mayor concentración celular en el crecimiento heterotrófico.

2- Optimizamos la técnica de extracción de lípidos y posterior determinación de TAG al igual que para almidón. Observamos que un cambio en la condición trófica durante el crecimiento celular genera que las células modifiquen sus compuestos de reserva favoreciendo, la síntesis de almidón en condiciones autotrófico y la de lípidos en heterotrófico.

3- Pudimos obtener microfotografías de células de *Chlorella* sp. teñidas con el colorante Rojo Nilo, observando mayor acumulación de lípidos neutros en condiciones heterotróficas.

4- Pusimos a punto una técnica de lisado y extracción proteica pudiendo conservar las propiedades fisicoquímica de las proteínas. Determinamos la actividad enzimática de dichas enzimas las cuales son claves en el metabolismo del carbono.

5- Obtuvimos diferencias en los perfiles proteicos de la ADP-Glc PPasa, np-Ga3PDHasa y Ga3PDHasa cuando las células de *Chlorella* sp. crecían en diferentes condiciones tróficas. Demostramos que los cambios en los compuestos de reserva se pueden deber a modificaciones en el metabolismo del carbono.

6- Analizamos, de manera comparativa con *Chlorella* sp. el crecimiento celular y la fuente de carbono de reserva de otras especies de *Chlorella protothecoides*, *vulgaris* y *saccharophila*. Observamos que el comportamiento frente a diferentes condiciones tróficas de cultivo varía entre cepas de la misma especie.

7- Optimizamos una técnica de extracción de ARNm y ADN genómico que utilizamos para realizar ensayos de PCR.

8- Encontramos, mediante un ensayo *in silico*, los genes que codifican para las enzimas claves del metabolismo del carbono: ADP-Glc PPasa, np-Ga3PDHasa, Ga3PDHasaA/B y Ga3PDHasa de *Chlorella variabilis* y a la Ga3PDHasa A/B de *A. thaliana*. Pudimos clonarlos y producirlos de forma recombinante.

- ADP-Glc PPasa: produjimos de forma recombinante las tres subunidades de manera individual y co-expresadas. En todos los casos, la subunidad large y smarge pudieron

purificarse y obtenerse en la fracción soluble pero no presentaron actividad ADP-Glc PPasa.

- np-Ga3PDHasa: produjimos de forma recombinante a la enzima pero expresada en la fracción insoluble. No pudimos determinarle actividad enzimática por la falta de 70 aa en el extremo C-terminal.
- GapA y GapB de *Ath*: produjimos de forma recombinante de manera individual cada enzima o co-expresadas. Purificamos GapB pero no presentó actividad enzimática. GapA se expresó en la fracción insoluble e inactiva.
- GapA de *Cva*: pudimos producirla de manera recombinante y purificarla en forma activa mediante precipitación salina y posterior filtración por gel.
- GapC: Pudimos producir y purificar ambas isoformas. Determinamos su masa molecular nativa mediante filtración por gel y, teniendo en cuenta su perfil electroforético, concluimos que sus estructuras cuaternarias son homohexaméricas y homotetraméricas para GapC2 y GapC2, respectivamente. Realizamos una filtración por gel de los extractos crudos de *Chlorella* sp. crecida en condiciones auto- y hetero-tróficas y pudimos concluir que la estructura hexamérica de GapC1 se debe a la extensión entra de 27 aa que presenta en el extremo N-terminal.

9- Caracterizamos cinéticamente ambas isoformas en ambos sentidos de la reacción de oxidación del Ga3P. GapC1 obtuvo con respecto a GapC2:

- 1,3 veces mayor velocidad máxima en sentido de la oxidación del Ga3P
- 2,35 veces mayor velocidad máxima en sentido de la reducción del 1,3bisPGA.
- 2 veces mayor afinidad por el sustrato D-Ga3P pero 2 veces menor por el sustrato 1,3bisPGA.

10- Optimizamos una técnica de transformación de *Chlorella* spp. mediante electroporación de células intactas.

11- Obtuvimos células de *Chlorella* sp. sobreexpresantes de np-Ga3PDHasa de *A. thaliana*

12- Caracterizamos el crecimiento celular de las cepas transgénicas en comparación con la cepa wt y pudimos determinar los compuestos de reserva, almidón y lípidos. Observamos un aumento de 20-50 veces los mg TAG por gramo de biomasa.

Capítulo 2: *Nitrosomonas europaea*

Introducción

La vida depende del elemento nitrógeno, el cual está presente en todos los seres vivos formando parte de varias biomoléculas, por ejemplo las proteínas. En la naturaleza, el nitrógeno existe principalmente en seis estados de oxidación $-III$ (NH_3), 0 (N_2), $+I$ (N_2O), $+II$ (NO), $+III$ (NO_2^-), $+IV$ (NO_2), y $+V$ (NO_3^-) [168]. La interconversión de estos estados constituye un ciclo que involucra a todos los seres vivos para mantener el nitrógeno en la naturaleza (Figura 40) [21].

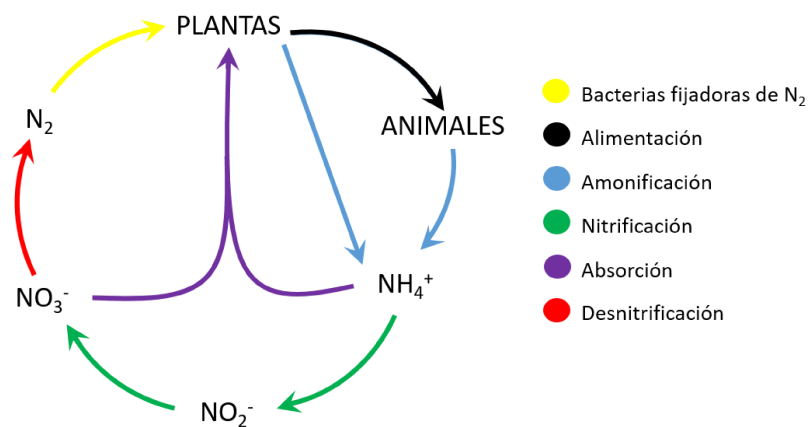


Figura 40. Esquema simplificado del ciclo biogeoquímico del nitrógeno.

El ciclo consta de un conjunto cerrado de diferentes procesos que se basan en el suministro de este elemento a los seres vivos y que pueden clasificarse como: fijación del nitrógeno, amonificación, nitrificación y desnitrificación. El primer paso en el ciclo es la fijación del nitrógeno de la atmósfera (N_2) a formas distintas susceptibles de incorporarse a la composición del suelo o seres vivos. Esto puede ocurrir por un proceso abiótico (la ocurrencia de rayos en la atmósfera) o biótico (por acción de microorganismos). El vínculo entre el N_2 atmosférico y la biósfera, ocurre a través de la simbiosis entre plantas y bacterias fijadoras de nitrógeno que lo convierten en nitrógeno orgánico fácilmente movilizable por los vegetales. A su vez, cuando los animales o plantas mueren, son descompuestos por bacterias que forman el ion amonio NH_4^+ a través del proceso llamado amonificación. Este ión amonio, también proveniente de fertilizantes como el sulfato de amonio y la urea, es parcialmente absorbido por las plantas (no todas tienen la capacidad de hacerlo) y el resto es oxidado a NO_2^- (nitrito) por la acción de las bacterias oxidantes del amonio. Esto último es el inicio del proceso de nitrificación, el que es crítico para evitar la pérdida del nitrógeno del suelo utilizable por las plantas. El NO_2^- resulta ser tóxico para las plantas y no es absorbido por las mismas, siendo procesado por las bacterias oxidantes que lo convierten a NO_3^- (nitrato). Este

compuesto, es empleado como fuente de nitrógeno por las plantas y resulta indispensable para su correcto desarrollo. La parte del NO_3^- que no es absorbida continúa su ciclo, siendo reducido nuevamente a N_2 por la acción de las bacterias desnitrificantes que lo devuelven a la atmósfera [21].

Debido a la importancia de la nitrificación y a la capacidad única que tienen los microorganismos que la realizan, la bioquímica del proceso impulsó fuertemente la investigación en las vías metabólicas y las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno [169]. Si bien se lograron avances muy significativos, la concentración de los esfuerzos en esta vía metabólica fue en detrimento del estudio de otras también importantes para el desarrollo de estos microorganismos, como por ejemplo el metabolismo del carbono [170]. La falta de información en este sentido hizo, por ejemplo, que *Nitrosomonas europaea* sea considerada por un largo tiempo como una bacteria quimiolitotrófica obligada. Luego, estudios realizados con isótopos marcados evidenciaron la incorporación de diferentes compuestos orgánicos [171] [172] [173] [174], lo que la convirtió en una bacteria quimiolitotrófica facultativa o quimilitoorganotrófica [26].

Como se detalló en la Introducción general, el carbono y la energía pueden ser incorporados a la célula desde una fuente externa (crecimiento heterotrófico) mediante transportadores específicos presentes en la membrana celular o ser sintetizados internamente mediante la conversión de compuestos químicos inorgánicos y la fijación del CO_2 atmosférico (crecimiento autotrófico). En el caso de *N. europaea*, los estudios realizados mediante la incorporación de ^{14}C en células intactas y en extractos libres de células, han logrado concluir (hace 50 años) que su mecanismo de fijación de CO_2 es similar al ciclo de BBC que ocurre en los organismos fotosintéticos (plantas verdes, algas y cianobacterias) [175]. Por otro lado, también se ha demostrado que *N. europaea* puede incorporar pequeñas cantidades de compuestos orgánicos a sus vías metabólicas cuando el oxígeno se vuelve limitante. A pesar de que los rendimientos de asimilación de carbono inorgánico han mostrado ser superiores respecto al orgánico, en las condiciones óptimas de crecimiento [26] [176], no son mutuamente excluyentes. En condiciones mixotróficas, es decir en presencia de CO_2 y compuestos orgánicos externos, los rendimientos de asimilación y crecimiento aumentan respecto a las condiciones de crecimiento exclusivamente autotróficas o heterotróficas [26].

Analizando el genoma de *N. europaea* se observó que hay una escasez de genes que codifican para las enzimas asociadas al catabolismo y transporte de compuestos orgánicos al interior de la célula [25]. Este hecho limitaría a la célula para incorporar fuentes de carbono y energía externas que le permitan crecer en condiciones heterotróficas. Por ejemplo, sólo se ha encontrado un gen putativo que codificaría para un transportador de membrana (PTS) con similitud a transportadores de fructosa y manosa, pero ninguno similar a los transportadores de glucosa claves en otros organismos

heterotróficos. En cambio, si se han identificado los genes que codifican para las enzimas involucradas en las vías metabólicas necesarias para su crecimiento en condiciones autotróficas. Las enzimas del BBC están casi todas codificadas en el genoma de *N. europea*, excepto aquellos correspondientes a la pseudoheptulosa-1,7-bisP fosfatasa y la gliceraldehído-3P deshidrogenasa dependiente de NADPH (EC 1.2.1.13). Chain y col. [25] propusieron que estas enzimas podrían sustituirse por la Fru-1,6-bisP fosfatasa y la gliceraldehído-3P deshidrogenasa fosforilante dependiente de NADH (EC 1.2.1.12) que son claves en la gluconeogénesis y la glucólisis [25]. Estas enzimas podrían tener funciones ambiguas y participar tanto en la glucólisis como en el ciclo de BBC ya que al tratarse de un organismo procariota todas las vías metabólicas están confinadas al citoplasma. Así, el carbono asimilado puede entrar a circular en numerosas vías metabólicas siendo el 3-PGA un intermediario clave para conectar una vía con otra. El 3-PGA, resultante de la fijación del CO₂ puede ingresar a la glucólisis (Embden–Meyerhof–Parnas) y convertirse en Pyr, el cual puede ingresar al ciclo del TCA (ciclo de los ácidos tricarboxílicos, o ciclo Krebs) que provee de compuestos carbonados a la síntesis de aminoácidos, lípidos y otros compuestos orgánicos.

Se ha propuesto que, en *N. europea*, el ciclo del TCA sería incompleto, ya que en los estudios bioquímicos primariamente realizados no se pudo detectar la actividad de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (que convierte el α -cetoglutarato en succinil-CoA) [177] [178] [179] [180]. Sin embargo, si se han identificado los genes que codifican para las subunidades E1, E2, y E3 de la α -cetoglutarato deshidrogenasa [25] e incluso se ha probado que estos genes se transcriben [181] [182] [183] [184] [185]. Esta información resulta en parte contradictoria, ya que existen los genes pero no se ha detectado la actividad de la enzima. A pesar de que los antecedentes no son coherentes, los resultados obtenidos llevaron a los autores a proponer que el ciclo de Krebs en *N. europaea* se defina en forma de herradura [26] [181] [179]. Esta definición, fue discutida en los últimos años, especulándose que quizás el ciclo del TCA es completo pero ocurre mediante enzimas alternativas, que no son tradicionalmente consideradas parte del ciclo, tal como ocurre en algunas otras bacterias, cianobacterias, algas y plantas [186] [187] [188] [189] [190].

Los antecedentes para entender el metabolismo del carbono en *N. europea* son aún escasos, aunque serían relevantes. Es clave comprender cada paso involucrado en el metabolismo de fijación y asimilación del CO₂, la glucólisis y el ciclo del TCA en esta bacteria (así como en otros microorganismos involucrados en el proceso de nitrificación en general), para entender cómo se alimentan y cuáles son las condiciones que favorecen o disminuyen su desarrollo. En tal sentido, la identificación y caracterización de enzimas involucradas en pasos críticos del metabolismo

energético y redox es de particular importancia para la comprensión del flujo del carbono y el nitrógeno en los organismos con capacidades tróficas diferenciales.

Objetivos

Estudiar enzimas claves del metabolismo del carbono en *Nitrosomonas europaea* tales como Ga3PDHasa, np-Ga3PDHasa y SSADHasa. Se realizarán estudios *in vitro*, con las proteínas producidas en forma recombinante, caracterizando sus propiedades cinéticas y estructurales.

Materiales y Métodos

Además de los mencionados en el capítulo anterior, se emplearon los siguientes Materiales y Métodos:

Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y antibiótico

Plásmidos

- a. pRSFDuet (Novagen): tiene como marcador de selección el antibiótico kanamicina.
- b. pETDuet (Novagen): tiene como marcador de selección el antibiótico ampicilina.

Cepas bacterianas y antibióticos

- a. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen)
- b. *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen)

El medio de cultivo y las condiciones de crecimiento se especificarán según corresponda. Las células transformadas con vectores plasmídicos fueron seleccionadas y crecidas en presencia de un antibiótico adecuado: ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml) o higromicina (50 µg/ml).

Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla a continuación:

Cultivo de bacterias

- a. Luria-Bertani (LB): 10 g/l triptéina, 5 g/l extracto de levadura, 5 g/l NaCl y H₂O.
- b. LB-agar: Compuesto por medio LB más 1,6% (p/v) agar-agar.

Obtención de biomasa bacteriana

El cultivo de las bacterias se realizó empleando alguno de los medios detallados anteriormente y erlenmeyers de distintos volúmenes manteniendo siempre una proporción de volumen de medio líquido correspondiente al 25% del volumen total del erlenmeyer. Las condiciones de cultivo estándares se mantuvieron a 37 °C en agitación a 200 rpm empleando un agitador orbital con temperatura controlada.

Métodos bioquímicos básicos

Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de ADN se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1% (p/v) con *buffer* TAE [40 mM Tris, 40 mM ácido acético y 1 mM EDTA pH 8,0] en presencia del colorante Gel Green (Biotium). Las muestras se acondicionaron con 3% (v/v) glicerol y 0,05% (p/v) Azul de Bromofenol antes de realizar la siembra. Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 V constantes durante el tiempo necesario. Las bandas se visualizaron con un transiluminador de luz led azul.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizó según la técnica descrita por Laemmli (1970). La concentración del gel de separación varió entre 10-15%, dependiendo de las masas de las proteínas a separar. A las muestras de proteínas a separar por electroforesis en condiciones reductoras (SDS-PAGE reductor) se les adicionó 1/3 (v/v) de *buffer* de muestra reductor (240 mM Tris-HCl pH 6,8, 8% (p/v) SDS, 40% (v/v) glicerol, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 0,04% (v/v) Azul de Bromofenol). Cuando se

quisieron preservar las condiciones de oxido-reducción originales de las muestras en la electroforesis (SDS-PAGE no reductor), se utilizó un *buffer* de muestra sin 2-mercaptoetanol. Los marcadores de masa molecular empleados fueron de GE Healthcare. Terminada la electroforesis, cada gel fue coloreado con una solución de *Coomassie Brilliant Blue R-250 (Coomassie Blue)*, salvo en los casos que se realizaron electrotransferencia e inmunodetección.

Cuantificación del contenido proteico

La determinación de la concentración de proteínas en solución se realizó por el método de Bradford [101], utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar.

Electrotransferencia seguida de inmunodetección (WB)

Para las inmunodetecciones, una vez realizada la corrida electroforética en el SDS-PAGE, se efectuó una electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa durante 60 min a 180 mA en un equipo *Mini Protean III* (Bio-Rad) con una solución de 0,025 M Tris-HCl pH 8,3; 0,192 M glicina y 20% (v/v) metanol. Finalizada la electrotransferencia, la membrana se bloqueó incubándola 1 h a 25 °C con una solución de TBS Tween [50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl y 0,05% (p/v) Tween 20] adicionada de leche descremada en polvo al 5% (p/v). Luego, se lavó con solución de TBS-Tween 10 min a 25 °C y se incubó 16 h a 25 °C con la misma solución suplementada con leche descremada al 1 % (p/v) que contenía una dilución adecuada del anticuerpo primario preparado en conejo. Se lavó nuevamente con solución de TBS Tween 10 min a 25 °C y se procedió al revelado de la membrana. Para tal fin, se incubó durante 1 h a 25 °C en TBS Tween suplementado con una dilución 1/5.000 del anticuerpo secundario conjugado a un colorante fluorescente *Alexa Fluor 647* (Invitrogen) producido en cabra, que permite detectar las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos producidos en conejo. La señal fue detectada mediante la emisión de fluorescencia, utilizando el escáner *Typhoon FLA 7.000* (GE Healthcare).

Anticuerpos

Los sueros inmunes contra las proteínas de interés fueron preparados en el Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina; mediante la inmunización de conejos, acorde a lo

descrito por Vaitukaitis [102]. Como inmunógeno se utilizó las proteínas de interés purificadas a homogeneidad electroforética.

Metodología utilizada en biología molecular

Extracción del ARNm

Las extracciones de ARN en células de algas verdes unicelulares crecidas en condiciones autotróficas, se realizaron utilizando el reactivo de extracción Trizol (0,38% (v/v) de fenol ácido, 0,8 M de tiocianato de guanidina, 0,4 M tiocianato de amonio, 0,1 M de NaAc (pH 5,0), 5% (v/v) de glicerol). Para dichas extracciones 1×10^8 células se pulverizaron con nitrógeno líquido en un mortero estéril y la totalidad del polvo obtenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregó 1 ml del reactivo de extracción. Luego de mezclar por inversión varias veces, los tubos se incubaron a temperatura ambiente 10 min y se centrifugaron 10 min a 13.000 xg y 4 °C. A las fracciones solubles obtenidas se les adicionó 200 µl de cloroformo y se incubaron 3 min adicionales a temperatura ambiente. Se centrifugaron 15 min a 13.000 xg a 4 °C y la fase acuosa fue posteriormente precipitada con un volumen de isopropanol incubando los tubos durante 30 min a -20 °C. Pasado el tiempo de incubación, los tubos fueron centrifugados a 13.000 xg durante 15 min a 4 °C y luego fueron lavados con etanol 70% (v/v). El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente para luego ser disuelto en 30 µl de agua bidestilada estéril. La concentración de ARN se determinó en espectrofotómetro a 260 nm.

Transcripción reversa: obtención del ADN copia

Para obtener el ADN copia (ADNc) a partir del ARNm, se realizó una retro-transcripción utilizando la transcriptasa reversa *M-MLV* (Promega), como se indica a continuación. Brevemente, se incubó 1 µg ARNm y 100 pmol de oligo(dT) durante 5 min a 70 °C y luego la mezcla se enfrió rápidamente en hielo. Paso siguiente, la muestra se diluyó a un volumen final de 50 µl en 50 mM TRIS-HCl pH 8,3; 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 200 mM dNTP, 25 U de inhibidor de ribonucleasas (*RNasin ribonuclease inhibitor*, Promega) y 200 U de transcriptasa reversa *M-MLV*. La hebra de ADNc a partir del ARNm se obtuvo incubando la mezcla de reacción anterior a 42 °C durante 60 min.

Cuantificación de ácidos nucleicos

Las concentraciones de ADN y ARN en solución se calcularon a partir de la absorbancia a 260 nm, considerando que una DO (260 nm) = 1 equivale a 50 µg/ml de ADN o a 40 g/ml de ARN. También se midió la absorbancia a 280 nm, pico máximo de absorción de las proteínas, y se descartaron aquellas muestras con una relación de Abs 260 / Abs 280 inferior a 1,7 por considerarlas con una contaminación de proteínas no aceptable para los ensayos subsiguientes.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la Tabla 7, donde se remarcan las secuencias que determinan los sitios de las enzimas de restricción indicadas (en negrita).

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en el Capítulo 2. Las secuencias en negrita corresponden a los sitios de restricción de cada oligonucleótido.		
Oligonucleótidos	Secuencia	Sitio de restricción
<i>Neu cbbG-Fo</i>	GGATCCTATGACAATCAGAATTGC	<i>Bam</i> HI
<i>Neu cbbG-Re</i>	AAGCTTTTATTTACTGGCGATTACTC	<i>Hind</i> III
<i>Neu gabD-Fo</i>	GAGCTCGATGCAGACATACACACCC	<i>Sac</i> I
<i>Neu gabD-Re</i>	AAGCTTCTAAACCTCTTCCCCACCAT	<i>Hind</i> III

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes de interés se utilizó como molde ADNc. Las reacciones se realizaron con 2 µl de ADN molde, 2 mM dNTPs, 0,1 mM oligonucleótidos, 2 mM MgCl₂ y 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Fermentas) en un volumen final de 50 µl. El programa básico utilizado fue el siguiente:

1 ciclo de desnaturalización a 95 °C, 5 min

30 ciclos de:

(i) desnaturalización a 95 °C, 1 min

(ii) hibridación a 40-60 °C, 30 s

(iii) elongación a 72 °C, 1 min/kpb

1 ciclo de elongación a 72 °C, 10 min.

Las reacciones se realizaron en un termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf).

Clonado

Los productos amplificados por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. La banda de interés se escindió del gel y se purificó con la herramienta comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Las muestras purificadas se ligaron al vector de clonado pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Subclonado

Para introducir el gen de interés en el vector de expresión correspondiente, se procedió a cortar el vector de clonado con las enzimas de restricción adecuadas para cada caso, de forma de liberar el inserto. Luego, la muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa y la banda de interés se cortó del gel y se purificó con la herramienta comercial *Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System* (Promega). Por otra parte, el vector de expresión se escindió con las mismas enzimas de restricción con las que se liberó el gen de interés del vector de clonado. Luego de la digestión, el vector de expresión cortado se precipitó con 67% (v/v) etanol y 0,1 M acetato de sodio incubando a -20 °C durante 16-18 h. Finalmente, el vector digerido y precipitado se centrifugó a 15.000 xg durante 15 min a 4 °C y resuspendió en agua mQ estéril. El inserto y el vector se ligaron utilizando T4 ADN ligasa (Promega) durante 16 h a 16 °C. Con la mezcla de ligación se transformaron células de *E. coli* TOP10, a fin de amplificar el plásmido. Para evaluar la presencia del inserto de interés en el vector de expresión se realizó un corte con enzimas de restricción adecuadas y se sometió la reacción a una electroforesis en gel de agarosa.

Extracción de ADN plasmídico

Las células de *E. coli* transformadas se cultivaron en medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron a 37 °C durante 16-18 h. Posteriormente las células se cosecharon por centrifugación y se extrajo el ADN plasmídico utilizando la herramienta comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). La obtención del ADN plasmídico se corroboró por electroforesis en gel de agarosa.

Corte con enzimas de restricción

Para evaluar la presencia del inserto de interés en el vector correspondiente, se procedió al corte con enzimas de restricción. El procedimiento típico consistió en la incubación del ADN plasmídico (1-2 µg) con la(s) enzima(s) de restricción correspondiente(s) (10-20 U, en la solución reguladora provista por el fabricante para cada caso) a 37 °C durante 3 h.

Construcciones plasmídicas para la expresión de las enzimas recombinantes

En la Tabla 8 se detallan todas las construcciones plasmídicas que permitieron expresar las proteínas recombinantes utilizadas en esta tesis.

Tabla 8. Expresión de las proteínas recombinantes: construcciones y condiciones empleadas. T: temperatura.					
Enzima	Construcción	Sitios de clonado	Cepa de <i>E. coli</i>	T (°C)	[IPTG] (mM)
Ga3PDHasa	[pETDUET/ <i>Neu cbbG</i>]	<i>BamHI/HindIII</i>	BL21	28	0,5
SSADHasa	[pETDUET/ <i>Neu gabD</i>]	<i>SacI/HindIII</i>	BL21	28	0,5

Para expresar las proteínas recombinantes, se transformaron células de *E. coli* indicadas en la Tabla 8 para cada caso con la construcción correspondiente utilizando el método de transformación por CaCl₂. Luego, las células transformadas obtenidas en las placas con el medio de selección se repicaron a medio LB líquido suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron en agitación a 37 °C hasta su saturación.

Para los ensayos de expresión se inocularon cultivos de 1 l de medios de cultivo LB, YT2X o TB realizando una dilución 1/50. El cultivo inoculado se incubó a 30 °C en agitación orbital a 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ ~ 0,8, momento en el cual se agregó el inductor IPTG. Luego de la inducción, las células continuaron cultivándose a la temperatura adecuada (según Tabla 8) en agitador orbital a 200 rpm durante 16 h más. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 xg durante 10 min y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Transformación de células bacterianas

Las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método del CaCl₂. Se utilizó un cultivo saturado para inocular medio LB fresco en una dilución 1/20. Las células se crecieron hasta DO₆₀₀ ~ 0,4 y luego se cosecharon por centrifugación a 5.000 xg durante 5 min. Luego las células a partir de 1 ml de cultivo se resuspendieron en 500 µl de ST1 [10 mM MOPS-NaOH pH 7,0, 10 mM KCl]. Seguidamente se lavaron con el mismo volumen de ST2 [100 mM MOPS pH 6,5, 10 mM KCl, 100 mM CaCl₂] y se incubaron 15 min en hielo, se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones y luego resuspendieron en 100 µl de ST2. Para transformar las células competentes, a una alícuota de 100 µl se le adicionaron de 2 a 4 µg de ADN plasmídico. La mezcla se incubó en hielo durante 1 h y luego se sometieron las células a un choque térmico a 42 °C por 45 s. Las células se recuperaron en medio LB durante 1 h a 37 °C y se sembraron en medio LB-agar suplementado con el antibiótico correspondiente. Finalmente, las células se cultivaron durante 16-18 h a 37 °C y se seleccionaron distintos clones para su posterior análisis.

Purificación de las enzimas recombinantes

Las células obtenidas en los ensayos de expresión se resuspendieron en *Buffer H* [25 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol y 10 mM imidazol] y se lisaron por ultrasonido. Se centrifugó a 16.000 xg durante 20 min hasta obtener un sobrenadante limpio de partículas en suspensión. La fracción soluble se sembró en una columna *HisTrap HP* de 1 ml (GE Healthcare) previamente equilibrada con *Buffer H*. La elusión de la proteína retenida se realizó con un gradiente de imidazol de 10-300 mM en *Buffer H*. Para el caso en el que no se utilizó el AKTA, las eluciones se realizaron empleando concentraciones crecientes de imidazol en *buffer H* (30, 50, 70, 100 y 300 mM). Las fracciones que contenían actividad enzimática se reunieron y se conservaron a -80 °C.

Todas las proteínas se purificaron siguiendo el protocolo descrito, a excepción de la Ga3PDH_{asa} A clonada en el vector pETDUET smc 2 (Tabla III.3) la cual no contiene etiqueta de *His* incorporada. En este caso, las células se resuspendieron en *Buffer A* [50 mM MOPS pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ y 5% (p/v) de sacarosa] y se lisaron por ultrasonido. Se centrifugó a 16.000 xg durante 20 min hasta obtener un sobrenadante limpio de partículas en suspensión. La fracción soluble se sometió a una precipitación salina sucesiva, entre 30 y 80 % utilizando (NH₄)₂SO₄. Luego se probaron diferentes protocolos con las fracciones obtenidas:

- se lavaron con *Buffer A* empleando un dispositivo de ultracentrifugación.

- se sembraron en una columna de filtración por gel (*Superdex 200 5/100 Tricon*).
- se sembraron en una columna de fenilsefarosa equilibrada con *Buffer C* [*Buffer A* con 1 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$].

En todos los casos se determinó actividad enzimática y se analizó el perfil proteico obtenido mediante electroforesis (SDS-PAGE 12%).

Filtración por gel

La masa molecular de las proteínas se determinó utilizando una columna de *Superdex 200 5/100 Tricorn* (GE Healthcare) equilibrada con solución G (50 mM HEPES pH 8,0 y 100 mM NaCl). LA curva de calibrado se determinó utilizando proteínas estándar de masa molecular conocida (ovoalbúmina, 43 kDa; conalbúmina, 75 kDa; aldolasa, 158 kDa, ferritina, 440 kDa y tiroglobulina, 669 kDa; GE Healthcare). El volumen V_0 fue determinado utilizando Azul de Dextrano (Promega).

Metodología de análisis enzimático

Medida de actividad de la la SSADHasa

Para medir la actividad de la enzima SSADHasa se hizo uso de la propiedad diferencial que tiene la coenzima NAD(P)^+ y su par reducido, NAD(P)H , en su espectro de absorción a 340 nm, longitud a la cual sólo absorbe la forma reducida. De esta manera se puede seguir la actividad de una enzima que utiliza el cofactor NAD(P)^+ , por aumento de la absorción a 340 nm en un espectrofotómetro. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir/consumir 1 μmol de producto/sustrato en 1 min bajo las condiciones específicas para cada ensayo. Para calcular la concentración del NAD(P)H generado en el medio de reacción se utilizó su coeficiente de absorción molar a 340 nm de $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para determinar la actividad de la enzima SSADHasa se utilizó un medio de reacción que contenía: 50 mM Tricina-NaOH pH 8,5, 2,4 mM SSA, 1,5 mM NAD(P)^+ y una cantidad adecuada de enzima, a menos que se indique lo contrario. En reemplazo del SSA se probaron además como sustratos: formaldehído, etanol, (D o L)-Ga3P, glutaraldehído o glicerol. Las reacciones se iniciaron, en todos los casos, por el agregado de SSA (o el sustrato alternativo) y se registró la reducción del NAD(P)^+ a 340 nm a 30 °C.

Caracterización cinética de las enzimas en estudio

Para determinar los parámetros cinéticos de las enzimas en estudio se realizaron curvas de saturación de actividad enzimática en presencia de una concentración fija de uno de los sustratos y concentraciones variables del sustrato analizado. Los datos cinéticos obtenidos se graficaron como velocidad inicial en U/mg versus la concentración del sustrato variable en μM o mM . Los parámetros cinéticos fueron calculados mediante ajuste por regresión no lineal utilizando la ecuación de Hill y el programa informático OriginTM 7.0. Los valores obtenidos implican un promedio de un mínimo de tres determinaciones independientes que fueran reproducibles dentro de un marco de variación de $\pm 10\%$.

Análisis cinético

Los datos de actividad enzimática se graficaron en función de la concentración de sustrato o efector y fueron ajustados a distintos modelos de ecuaciones con el programa Origin 8.1 (OriginLab). Para el caso del cálculo de constantes cinéticas, se ajustaron los datos experimentales a la ecuación de Hill: $v = V_{\max} S^{nH} / (S_{0,5}^{nH} + S^{nH})$; donde $S_{0,5}$ es la concentración de sustrato (S) que produce el 50 % de la velocidad máxima (V_{\max}), y nH es el coeficiente de Hill (Hill 1910) [109]. Una vez verificado un comportamiento hiperbólico (nH no significativamente distinto de 1), el $S_{0,5}$ es equivalente a los valores de K_m determinados. Los valores de las constantes cinéticas son el resultado de al menos tres determinaciones con una variación menor al 10 %. Los valores de las mismas se expresan \pm su error estándar.

Resultados

Identificación y expresión recombinante de genes de *N. europaea* que codifican para aldehído deshidrogenasas (DHasas).

El genoma de *N. europaea* (disponible en la base de datos de NCBI, NC_004757.1) se empleó para identificar, por similitud de secuencias, aquellos genes que codifican para aldehído deshidrogenasas que pudieran estar involucradas en el ciclo de BBC, la glucólisis y/o el ciclo del TCA. Como secuencias molde para realizar la búsqueda mediante BLAST-P en NCBI se emplearon las secuencias de aminoácidos correspondientes a la Ga3PDH_{asa} y np-Ga3PDH_{asa} de *Triticum*

aestivum (EF592180 y Q8LK61, respectivamente). Con tales secuencias molde se pudieron identificar dos genes de *N. europaea*: *cbgG* y *gabD*, cuyos marcos abiertos de lectura se anotaron como CbbG y GabD, respectivamente, cuando se completó el análisis del proyecto genoma [25].

Las secuencias de nucleótidos encontradas se usaron para diseñar oligonucleótidos específicos que nos permitan obtener mediante PCR los genes *cbgG* (NE0327, código otorgado en el proyecto genoma) y *gabD* (NE2000, código otorgado en el proyecto genoma) a partir del ADN genómico de la cepa de *N. europaea* ATCC 19817. La identidad de los genes amplificados se verificó mediante secuenciación del ADN. Para expresar los genes amplificados, los mismos se subclonaron individualmente en el vector de expresión petDUET-1: *cbgG* entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III y *gabD* entre los sitios *Sac*I y *Hind*III. La estrategia de subclonado nos permitió expresarlos como proteínas fusionadas a una etiqueta de poli-histidinas en el extremo N-terminal que facilitó su posterior purificación por IMAC. La expresión recombinante de los genes *cbgG* y *gabD* se realizó transformando células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) que se cultivaron en el medio líquido LB, a una temperatura de 28 °C y 0,5 mM de IPTG para la etapa de inducción de la expresión del gen.

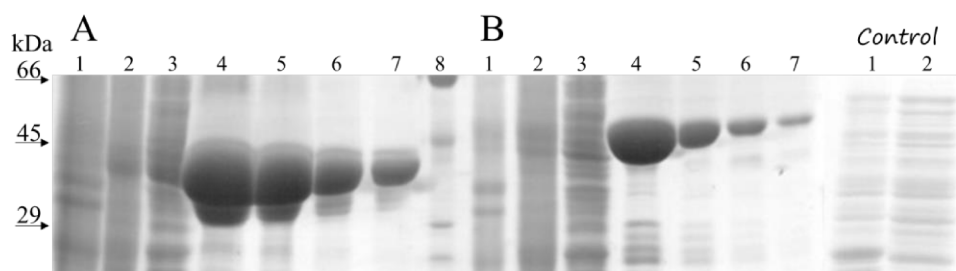


Figura 41. Expresión recombinante de las proteínas CbbG y GabD de *N. europaea*. Perfiles de proteínas resultados por electroforesis para los extractos de *E. coli* BL21 (DE3) resultantes de los ensayos de expresión del gen *cbgG* (A) y *gabD* (B). Se muestran los SDS-PAGE (12%) teñidos con Coomassie Brilliant Blue. En todos los casos: 1- fracción insoluble, 2- fracción soluble, 3- exclusión, 4-7 eluciones de la purificación mediante IMAC y 8- marcador de masa molecular. El control corresponde a los extractos obtenidos de *E. coli* BL21 (DE3) sin transformar.

En la Figura 41 se muestran los perfiles electroforéticos (SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue) obtenidos para los ensayos de expresión de las dos DHAsas producidas en forma recombinante. En ambos casos, se puede observar que las proteínas se expresan en forma soluble y que es posible purificarlas empleando una cromatografía IMAC. Para poder obtener cantidades de las proteínas con alto grado de pureza que permitieran la caracterización funcional y estructural, se escalaron los

cultivos y se purificaron ambas DHasas por cromatografía IMAC. Las proteínas purificadas se conservaron a -80°C hasta ser empleadas en los ensayos que permitieron su caracterización, verificándose que en tales condiciones las enzimas conservaban sus respectivos niveles de actividad.

Para evaluar la identidad de las proteínas recombinantes expresadas, se realizó un alineamiento de su secuencia de aminoácidos con la de otras aldehído deshidrogenasas ya caracterizadas y se determinó el porcentaje de identidad entre ellas.

CbbG

La secuencia de aminoácidos de CbbG se comparó con las correspondientes a la Ga3PDHasa, la Ga3PDHasaA y la np-Ga3PDHasa de varios organismos. En la Figura 42 puede observarse que la identidad de secuencias de la proteína CbbG oscila entre 49-58% cuando se la compara con la secuencia de las Ga3PDHasas (EC 1.2.1.12), mientras que es de 35-42% o 27-30% respecto a la Ga3PDHasaA (EC 1.2.1.13) o la np-Ga3PDHase (EC 1.2.1.9), respectivamente (Figura 43 y 44).

	1		100
Neu CbbG	(1)	-MTIRIGINGFGRIGRMVFRCSIEEF---DDIEVVAIND-LLEPDYLAYMLTHDSVHGRFRG-----DVSVSGNNLIVNGKQ-IRLTAIKDPTELKW	
Ehi A0A060N4W1	(1)	-MSIKVSIINGFGRIGRLVARVVLER---KDFELVAINDPFMDPKYMYVLLKYDTVHRQFEG-----TVEAGENAIIVNGHK-IVVKAERDPAQIGW	
Tae ABQ81648	(1)	MGKIKIGINGFGRIGRLVARVALQS---PDVELVAVNDPFITDYMFMKYDTVHGQWKHH-----EVKVKDSKTLFLFGEKEVAVFGCRNPEEIPW	
Egr Q43311	(1)	MAPVKIGINGFGRIGRMVFQALCDQGLLGTTFDVGVDMDATDADYFAYQMKYDSVHGKFKHTVSTKKSANLAEADIIVNGHEIKCIMATRNPEDLPW	
Sel Q9R6W2	(1)	-MTIRVAINGFGRIGRNFLRCWFGRQ--NTDLEVVAINN-TSDARTAHLLEYDSVLGRFNA-----DISYDENSITVNGKT-MKIVCDRNPLNLPW	
	101		200
Neu CbbG	(87)	DEVGADIVVESTGLFLTKELAQKHIQAGAKKVLVSAPS-KDDTPMYVYGVNDKAYG--GEAII SNASCTTNCLAPIAKVLINDT-WGIKRGLMTTVHAAATA	
Ehi A0A060N4W1	(87)	GALGVYVVESTGVFTTIPKAEAHIKGGAKKVIISAP--SADAPMFVGVNTEAYKP-EMNII SNASCTTNCLAPLAKVINNE-FGIVEGLMTTIHATTA	
Tae ABQ81648	(90)	AAAGAAYVVESTGVFTDKDKAAAHIKGGAKKVIISAP--SKDAPMFVCGVNEKEYKS-DIDIVSNASCTTNCLAPLAKVINDR-FGIVEGLMTTVHAMTA	
Egr Q43311	(101)	GKLGVEYVVESTGLFTEADKARGHLKAGAKKVIISAPG-KGDLKTI VMGVNHTFYQA-SMDVVSNASCTTNCLAPLVHVLKKEGVGVEKGLMTTIHAYTA	
Sel Q9R6W2	(88)	KEWDIDLVIESTGVFVTAEGAASKHIQAGAKKVLITAPGKGEVGVTYIVGVNDSEYRHEDFAVISNASCTTNCLAPVAKVLHDN-FGI IKGTMTTTHSYTL	
	201		300
Neu CbbG	(183)	TQKTVDGSPNKDWRGGRGILENII PSSTGAAKAVGVVPELNNKLTGMAFRVPTSDVSVVDLTVLEKEDASYEDICNAMKEASAGSMKGI LGYTDQKVVS	
Ehi A0A060N4W1	(183)	TQKTVDGSPGKDW RAGRCACANII PASTGAAKAVGKVI PSLNGKLTGMSFRVGT PDVSCVDLTCRLEKEVTVESIKAAIKKASEGEMKGI LGYTEDLVVS	
Tae ABQ81648	(186)	TQKTVDGSPSKDWRGGRRAASFNII PSSTGAAKAVGKVLPELNGKLTGMAFRVPTVDVSVVDLTVRLAKPATYDQIKAAIKKESEGNLKGILGYVDEDLVS	
Egr Q43311	(199)	TQKTVDGSPSKDWRGGRRAAINIIPSTTGAAKAVGEVLPVAVKGLTGMAFRVPTPDVSVVDLTVFLAEKDTSIKEDISLLKKASQTYLKGILGPTDEELVS	
Sel Q9R6W2	(187)	DQRILD-ASHRDLRRRAAAVNIVPTTTGAAKAVALVPELKGKLNGLIALRVPTPNVSVVDLVVQVEKPTITEQVNEVLQKASQTTMKGI IKYSDLPLVS	
	301		358
Neu CbbG	(283)	TDFRGETCTSVFDAEAGIQLDK---NFVKVVS WYDNEWGYSCKLLEMVRVIASK---	
Ehi A0A060N4W1	(283)	SDFVHDNRSSIFDAAATILLNP---HFVKLVSWYDNEWGYSNRVLDLIQIISKVH--	
Tae ABQ81648	(286)	TDFQGDNRSSIFDAKAGIALND---HFVKLVSWYDNEWGYSRVDLIRHMHSTK--	
Egr Q43311	(299)	TDFVHDNRSSIYDSLATLQNNLPGEKRLFKVVS WYDNEWGYSNRVLDLKKHMSGN---	
Sel Q9R6W2	(286)	SDFRGTDESSIVDSSITLVMDG---DLVKVIAWYDNEWGYSQRVVDLAE LAARKWAA	

Figura 42. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de CbbG con diferentes Ga3PDHasas (EC 1.2.1.12). *Entamoeba histolytica* (Ehi), *Triticum aestivum* (Tae), *Nitrosomonas europaea* (Neu), *Euglena gracilis* (Ega) y *Synechococcus elongatus* (Sel). Los aminoácidos fueron coloreados de acuerdo al nivel de conservación entre los residuos. De mayor a menor: rojo, azul, verde y negro.

```

1
Neu CbbG (1) -----MTIRIGINGFGRIGRMVF-----100
Ath P25856 (1) -----MASVTFVSPKGFTEFSGLRSSASLPPGKLLSDEFVSVSF-----QTSAMGSSGGYRKGVTAEAKLVAINGFGRIGRNFL
Cre P50362 (1) -----MAAMMQKSAFTGSAVSSKSG-----VRAKAAR--AVVDVRAEKKIRVAINGFGRIGRNFL
Dvi ABC00187.1 (1) -----MATSMAKSAFTGNMAGLKNF-----QRVQPARGAVKMEVVAQKVRVAINGFGRIGRNFL
Sol P12860 (1) MASHAALAPSRI PASTRLASKASQYSFLTQCSFKRLDVA DFSGLRSSNSVTF TREAS FHDVIAAQLTTKPTGAAPVRGETVAKLVAINGFGRIGRNFL
101 200
Neu CbbG (19) RCS-IEEFDDIEVVAINDLLEPDYLA YMLTHDSVHGRFRGDVSVSG-NNLI VNGKQIRLTAIKD PTELKWD EVGADIVVESTGLFLTKELAQKHIQAGAK
Ath P25856 (78) RCWHGRKDSPLDIIAINDTGGVKQASHLLKYDSTLGI FDADVKPSGETAISVDGKIIQVVSNRNPSLLPWKELGIDIVIEGTGVFVDREGAGKHIEAGAK
Cre P50362 (54) RCWHGRQNTLLD VVAINDSGGVKQASHLLKYDSTLGTFAADVKIVDDSHISVDGKQIKIVSSRDPLQLPWKEMNIDLVI EGTGVFIDKVGAGKHQAGAS
Dvi ABC00187.1 (56) RCWEGRKDSLDDVVCVNDSSGGVKQASHLLKYDSTLTKFDADVKAVDDKTI SVNGKNI AVVSSRDPTQLPWKAMDI DLVIEGTGVFVDTPGAGKHQAGAK
Sol P12860 (101) RCWHGRKDSPLDVVVVNDSSGGVKSATHLLKYDSTLGTFKADV KIIDNETFSIDGKPIKVVSNRDP LKLPWAELGIDIVIEGTGVFVDGPGAGKHQAGAK
201 300
Neu CbbG (117) KVVLSAPSKD-DTPMYVYGVNDKAYGGEAI--ISNASCTTNCLAPIAKVLNDTWGIKRGLMTTVHAAATATQKTVDGPSNKDWRGGRGILENIIPSSTGAA
Ath P25856 (178) KVIITAPGKG-DIPTYVVG VGNADAYSHDEP-IISNASCTTNCLAPFVKVLDQKFGI IKGTMTHSYTGDQRLLD-ASHRDLRRARAAALNIVPTTGAA
Cre P50362 (154) KVLITAPAKDKDIPTFVVG VNEGDKHEYP-IISNASCTTNCLAPFVKVLEQKFGIVKGTMTTHSYTGDQRLLD-ASHRDLRRARAAALNIVPTTGAA
Dvi ABC00187.1 (156) KVLITAPAKGNDIPTFVVG VNCDCYNYHYP-IISNASCTTNCLAPFVKVLEHFKFRIVKGTMTTHSYTGDQRLLD-ASHRDLRRARAAALNIVPTTGAA
Sol P12860 (201) KVIITAPAKGSDIPTYVVG VNEKDYGHDVANIISNASCTTNCLAPFVKVLEDELGI VKGTMTHSYTGDQRLLD-ASHRDLRRARAAALNIVPTTGAA
301 400
Neu CbbG (214) KAVGVVIPLENKLTGM AFRVPTSDVSVVDLTVLEK D-ASYEDICNAMKEASAGSMKGI LGYTDQKVVSTDFRGETCTSVF DAEAGIQLDKNFVKVVS W
Ath P25856 (275) KAVLVLPNLK GKLN GIALRVPTPNVSVVDLVVQVSKK-TFAEEVNAAFRDSAEKELKGI LDVCD EPLVSVDFRCSDFSTTIDSSLTVMVGDDMVKVI AW
Cre P50362 (252) KAVSLVLP SLK GKLN GIALRVPTPTVSVVDLVVQVEKK-TFAEEVNAAFREAAANGPMKGV LHVEDAPLVSIDFKCTDQSTSIDASLTVMVGDDMVKVI AW
Dvi ABC00187.1 (254) KAVLVLPDLK GKLN GVALRVPTPNVSVVDLVVQVEKK-TFAEEVNAAFREAAANGPMSNVLAVADEPLVSADFKGMDQSTATIDASLTVMVGDDMVKVI AW
Sol P12860 (300) KAVSLVLPQLK GKLN GIALRVPTPNVSVVDLVVNI EKVGVTAE DVNNAFRKAAAGPLKGVLDVCDIPLVSVDFRCSDFSTTIDSSLTVMVGDDMVKVI AW
401 452
Neu CbbG (313) YDNEWGYSCKLLEMVRV IASK-----
Ath P25856 (374) YDNEWGYSQRVVDLADIVANNWK-----
Cre P50362 (351) YDNEWGYSQRVVDLAEVTAKKWVA-----
Dvi ABC00187.1 (353) YDNEWGYSQRVVDLAE LTAQRWAA-----
Sol P12860 (400) YDNEWGYSQRVVDLADLVANKWPGLG SVASGDPLEDFCKDNPADEECKLYE

```

Figura 43. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de CbbG con diferentes Ga3PDHasas A/B (EC 1.2.1.13). *Nitrosomonas europaea* (*Neu*), *Arabidopsis thaliana* (*Ath*), *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*, P50362), *Dunaliella viridis* (*Dvi*) y *Spinacia oleracea* (*Sol*). Los aminoácidos fueron coloreados de acuerdo al nivel de conservación entre los residuos. De mayor a menor: rojo, azul, verde y negro.

```

1
Neu CbbG (1) -----MQTYTPYSEAMVFSMLEHAH-AAHLAWRQVPLHERTALLLKLADVLREN
Cre A8IYT1 (1) -----MSAQEFYAPILASTGVYKFYIDGQWKE SVSGKSVAI SNPSTRQTAYQVQACTQDEVNKMFESAK-VAQKAWARTPLYKRAEVLHKVASLMRQY
Tae Q8LK61 (1) -----MAGTGVFADVLDG-EVYKYADGEWRASASGKTVAIVNPTTRQTQYRVOACTQEEVNKVMDAK-VAQKSWARTPLWKRAELHKAAILKEH
Spy A0A127X6K0 (1) -----MAKQYKNLVNGEWKLSN--EITIIYAPATGEBELGSPAMTQAEVDAVYASAK-KALSDWRALSYVERAAYLHKAADLIVRD
Sto Q96XP0 (1) MVTLKELTGFKDIYTIIDSDGIPVFKTYLVGEGVGSKE--IENIKSPIDLTVYARVPKLNLYEMVDNTLSILYSKGRWAIRDLPGEKRLKIYHTLADLIEKY
101 200
Neu CbbG (49) SESYARLMTETGKTIRAAARAEIEKCAWACEIYADKAAAWLAEEETAAADGIKHR-----VVIEPLGVILAVMPWNFPFQVMRFLIPALLAGNALL
Cre A8IYT1 (93) AQPIADCLVKVEAKPKSDSLTEVVRSADLIDYTAEEGVRYLGEGQLNSDSFPGNARNKCLVSKVPLGVVLAIPPFNYPVNLAVSKLAPALMAGNAVRG
Tae Q8LK61 (92) KTFIAESLVKEIAKPAKDAVSEVVRSGLDVSYTAEEGVRYLGEGQLNSDSFPGNERNKYCLSKVPLGVVLAIPPFNYPVNLAVSKLAPALMAGNVLV
Spy A0A127X6K0 (79) AEKIGAILSKVEAKGHKAAVSEVIRTAEIINYAAEEGLRMGE--EVLEGGSFEEASKKIAIVRREPVGLVLAISPFFNYPVNLAVSKLAPALMAGNVVAL
Sto Q96XP0 (99) REDFVEVLMIGNGK-TKSAAQGEVNAIERLIRADLDVRRKLYGEYVPGDWSSES--LEAEAIIRREPLGVVLAITPFNYPLFDIVNKLIVYSTVAGNAFML
201 300
Neu CbbG (141) KHATNVTGSALKIQE-AVNEAGFPKGLFVTLVLS-HTVVEQVIAHPLCQGVSLTGSAEAGRAVASVAGRHLKVVLELGGSDPFIVLGDADI PAAAKAAV
Cre A8IYT1 (193) SARVSAAVCPVLVLLSSCFHAAGLPAGLLSVATGRGAEIGDFLTTHPDVNCISFTGG-DTGISIAKKAG--MVPQMELGGKDVCIVCEDDLDLAAKHII
Tae Q8LK61 (192) KPPTQGVAAALHMVH-CFHLAGFPKGLISCVTGGKGEIGDFLTTHPGVNCISFTGG-DTGIAISKKAG--MVPQMELGGKDVCIVCEDDLDLVAAANIV
Spy A0A127X6K0 (177) KPPTQGSISGLLAE-AFAEAGIPAGVFNITGRGSVIGDYIVEHEAVNFNFTGSTPIEGEGIKLAG--MRPIMLELGGKDSAIVLEDADLVLAANKIV
Sto Q96XP0 (196) KPASSTPLPAIMLAK-LLELAGFPKEALAI IAVP-GSEMDKIVADKRISVLSL TGSSETGEHVMMKVAG--LKQYVMELEGGDPAIVLDDSDPKTTAQKIV
301 400
Neu CbbG (239) IGRFQNNQSCIAAKRLIVLKEIEEVFTSTLLAEVEKLVVGDPLDEATDIGPLVSEQAATMEQFVLDAVAKGAMVRT-GGTRKGAYFTPTVLTGVHS--
Cre A8IYT1 (290) KGGFSYSGQRCTAVKVLVLAAPVADRLVAAVAAGVAKLVGRP-EDDCDITPVVSESSANFIEGLMDAKAKGATFVTGEWREGNLIWVLLDHVTA--
Tae Q8LK61 (288) KGGFSYSGQRCTAVKVVIMEAVADTVVEKVNAKLAKLVGPP-EDDSITPVVTESSANFIEGLVMDAKEKGFATFCQ-EYRREGNLIWVLLDHVTP--
Spy A0A127X6K0 (274) AGAFYSGQRCTAVKRVLMKVDQQLAAEIKTLVEKLVSGMP-EDDADITPLIDTSAADFVEGLIKDATDKGATALT-AFNREGNLIWVLPDHTVTT--
Sto Q96XP0 (292) TGITSYSGQRCDISKFIFAEPKVEELKNIYVEELKVKVGDPRDEADTVMGPIIDTRTVEFEYAVKDAVEKGNILYGGKRLGPTYIEPTLIEIDKEKI
401 500
Neu CbbG (336) -AMEVMTQEVFGPVLPIVITADTVEEAITLANATRFGLGASVWSRDLKGEQVARQLAAGATFVNSITKSDP-RMPFGGIRESGLGRSLYSGVWREFANIK
Cre A8IYT1 (387) -DMRLAWEPPFGPVLPMRVSSVEAAVEHCNKSRYGLQGCVFTRDINAAIRISDAMEGTGTQVNSAPARGPDHFPFQGFDRSSGIGSQGIRNSLMMIKTK
Tae Q8LK61 (384) -DMRLAWEPPFGPVLPIRIRVTVVEEAIKISNESEYGLQASIFTTNFPKAFGIAEQLEVGTVHLNKTQRTDNFPFLGAKKSGAGVGVKYSIEAMTTVK
Spy A0A127X6K0 (370) -DMRLAWEPPFGPVLPIIRVTVVEEAIKISNESEYGLQASIFTTNFPKAFGIAEQLEVGTVHLNKTQRTDNFPFLGAKKSGAGVGVKYSIEAMTTVK
Sto Q96XP0 (392) KDLVLYKKEVFLSIAVITKVNNDIEAIELSNRRYGLDAAIFGNDITKIRKLRMLVEGVAVVYNEYPKHGIGYFPFGRKDSGIGREGIGYTIENVTAIK
501 515
Neu CbbG (434) TVNVYGGEEV-----
Cre A8IYT1 (486) STVINLDKESYTLG-
Tae Q8LK61 (483) STVINLSPSYTMG-
Spy A0A127X6K0 (469) SVVFDIQ-----
Sto Q96XP0 (492) TIVYNYRGKGVWEYL

```

Figura 44. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de CbbG con diferentes np-Ga3PDHasas (EC 1.2.1.9). *Nitrosomonas europaea* (*Neu*), *Chlamydomonas reinhardtii* (*Cre*), *Triticum aestivum* (*Tae*), *Streptococcus pyogenes* (*Spy*) y *Sulfolobus tokodaii* (*Sto*). Los aminoácidos fueron coloreados de acuerdo al nivel de conservación entre los residuos. De mayor a menor: rojo, azul, verde y negro.

En función de este análisis y de la identidad putativa propuesta para el gen, decidimos medir la actividad de CbbG adaptando metodologías ya descritas para las Ga3PDHasas, evaluando ambos sentidos de la reacción enzimática tal como se describe en Materiales y Métodos.

GabD

La secuencia de aminoácidos de GabD se comparó con las secuencias de las np-Ga3PDHasas y SSADHasas de otros organismos. Esta elección se basó en observaciones previas que han demostrado que otras proteínas encontradas (e identificadas) en base a su similitud con las np-Ga3PDHasas, al ser caracterizadas enzimáticamente exhibieron mayor capacidad para catalizar la oxidación de otros aldehídos [41] [191]. En la Figura 45 y 46, se muestran los alineamientos de

secuencias a partir de los cuales se pudo determinar que GabD comparte una identidad del 27-30% con las np-Ga3PDHasas de otros organismos y una identidad de 30-48% con las SSADHasas.

		1	-----MQTYTPYSEAMVFSMLEHAH-AAHLAWRQVPLHERTALLLKLADVLR	100
Neu GabD	(1)		-----MSAQEFYAPILASTGVYKFYIDGQWKESVSGKSVAINSPSTRQTAYQVQACTQDEVNKMFE	
Cre A8IYT1	(1)		-----MAGTGVFADVLDG-EVYKYYADGEWRASASGKTVAIVNPTTROTQYRVOACTQEEV	
Tae Q8LK61	(1)		-----MAKQYKNLVNGEWKLSSEN--EIT IYAPATGEELGSVPAMTQAEVDAVYASAK-KALS	
Spy A0A127X6K0	(1)		MVTCLKELTGFKDIYITDSGDI PVFKTYLVGEVWGSKE--IENIKSPIDLTVYARVPKLNYEM	
Sto Q96XP0	(1)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	200
Neu GabD	(49)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Cre A8IYT1	(93)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Tae Q8LK61	(92)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Spy A0A127X6K0	(79)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Sto Q96XP0	(99)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	300
Neu GabD	(141)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Cre A8IYT1	(193)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Tae Q8LK61	(192)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Spy A0A127X6K0	(177)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Sto Q96XP0	(196)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	400
Neu GabD	(239)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Cre A8IYT1	(290)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Tae Q8LK61	(288)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Spy A0A127X6K0	(274)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Sto Q96XP0	(292)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	500
Neu GabD	(337)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Cre A8IYT1	(387)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Tae Q8LK61	(384)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Spy A0A127X6K0	(370)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Sto Q96XP0	(392)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	515
Neu GabD	(434)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Cre A8IYT1	(486)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Tae Q8LK61	(483)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Spy A0A127X6K0	(469)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	
Sto Q96XP0	(492)		-----VVI-EPLGVIILAVMPWNFPFFQVMRFLIPALLAGNGALL	

Figura 45. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de GabD con diferentes np-Ga3PDHasas (EC 1.2.1.9). *Nitrosomonas europaea* (Neu), *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre), *Triticum aestivum* (Tae), *Streptococcus pyogenes* (Spy) y *Sulfolobus tokodaii* (Sto). Los aminoácidos fueron coloreados de acuerdo al nivel de conservación entre los residuos. De mayor a menor: rojo, azul, verde y negro.

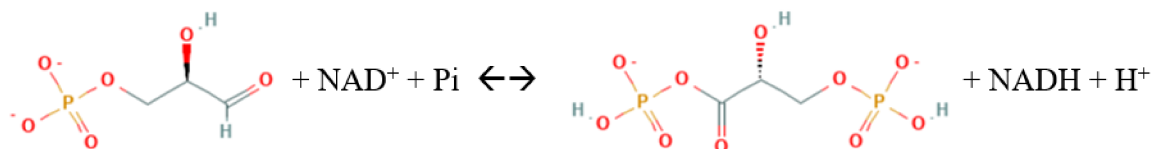
		1	-----MQTYTPYSEAMVFSMLEHAAHHLAWRQVP-LHERTALLLKLADVLRENSSEYARLMTTEETG	100
Neu GabD	(1)			
Cne Q0K2K1	(1)		MELQHTALLRSHCLIDGEWTGAQSGAELAVCNPATGERIGSVPLAGAAEAEQAVRAAERALPAWRAQT-GKARAAVLRWADLMLAHQEDLARLMTAEQ	
Sso Q97XS9	(1)		-----MMSQEVIEVRSPSNLNVIPTVKRMHKDEVRGEEAYKGFEEISKMP-LYKRTAILRKVSEILEREQERLAKLLAMEAG	
Spy A0A127X769	(1)		-----MAYQTIYPTNEVLHTFDNMTDQDLADVLERAHLLYKWKREDHLEERKAQLHQVANILRRDRDKYAEIMTKDMG	
		101		200
Neu GabD	(62)		KTIRAARAEIEKCAWACEIYADKAAAWLAEEIEAADG-IK-----HRVVIIEPLGVILAVMPWNFPFQVVMRFLIPALLAGNALLKHATNVTGSAIK	
Cne Q0K2K1	(100)		KPLPEARAGEVAYAAASFLEWFGEEAKRVGDELASPRSSQK-----MLVLRPEVGVCAAITPWNFPAAAMITRKVGPALAGCTIIVKPAEQTLTALA	
Sso Q97XS9	(79)		KPIRDSRVVLRASRLFRHAAEEVGMVLEGGNYRVDAEYPPGNENRIVVSTREPIGVVTAIILPWFNFINSFAHKVAPALAVGNVSVVVKPSINTPLAAIE	
Spy A0A127X769	(76)		KLFTEAQGEVLDLCADIADYYADKADFEFLMSMPLETDS-GQ-----AAYLKQSTGVILAEIPWNFPYQIMRVFAPNFIVGNPMVLKHASICPRSAQS	
		201		300
Neu GabD	(153)		IQEAVNEAGFPKGLFVTLVSHTVVE-QVIAHPLCQGVSLTGSAAEAGRAVASVAGRHLKVVLELGGSDPFIIVLGDADIPAAAKAAVIGRFQNGQSCIA	
Cne Q0K2K1	(192)		LAVLGEQAGVPRGVLQVVTGDAVQIGGVLCSFVVRKLSFTGSTAIGKLLMAQCAGTVKLSLELGGNAPLIIFDDADLDRAVEGILASKFRNSGQTCVC	
Sso Q97XS9	(179)		MKKILVIEAGLPDSAVRVVTGYSSEIGDEITHTPLVGLITLTGSTQTGLKIASKAVSLGKRIIMELGGSDPIIILEDANIERASSIAVRARFEYAGQNCNA	
Spy A0A127X769	(167)		FEELVLEAGAEAGSITNLFISYDQVS-QVIADKRVVGVCLTGSERGGASIAEEAGKNLKKTTLELGGDDAFIILDDADWDQLEKVLVFSRLYNAGQVCTS	
		301		400
Neu GabD	(252)		AKRLIVLKEIEEVFTSTLLAEVEKLVVGDPLDEATDIGPLVSEQAETMEQFVLDAAVAKGAMVVTG-G--TRKGAYFTPTVLTGVHSAMEVMTQEVFGPV	
Cne Q0K2K1	(292)		ANRIYVHDRVYDEVARRLVSAVEQLRPGHGVDSGVTQGPLIDADAVAKVEAHADALAQGATVLTGGQRHALGFTFFAPTVLANATASMRVAREETFGPL	
Sso Q97XS9	(279)		GKRIIVREIYDKFVKAFNDKARALKVGDPLDETVDVGPVINKESVENLNSVLADAKAKGGKVEILNKG-PESGSGFPLTMVTNPSLDMLVLKSEVFGPI	
Spy A0A127X769	(266)		SKRFIVLDKDYDRFKELLTKVFKTAKWGDPMDETTTLALSSDQAKEDVLAQIKLALDNGAELVYGGAEIDHPGHFVMPITIIAGLTKDNPIYYQEIFGPI	
		401		496
Neu GabD	(349)		LPVITADTVEEAITLANATRFGLGASVWSRDLEKGEQVARQLAAGATFVNSITKS-DPRMPFGGIRESSGLGRELSYWGVRFEFANIKTVNVYGGEEV	
Cne Q0K2K1	(392)		APLFRFTSEAEVVMANDTESGLAAYFFSRDMAKIWRVAQGLEYGVMVINTGLIS-NEVAPFGGVKQSGLREGSRHGIDYELETKYLMEVE---	
Sso Q97XS9	(378)		VPIVSVKSDEEAIIRIANSTEYGLQSAIFPTNDVNRALKLSRELKFGAVIINDSTRLRWDSLAFGGFKKSSIGREGVRETMLEMTENKLIATLL---	
Spy A0A127X769	(366)		GEIYKVSSEEAIEVANDSNYGLGGTIFSSNQEHAKAVAKIETGMSFINSGWTS-LPELPPGGIKHSGYGRELSLGFVFNHLLIYSE----	

Figura 46. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de GabD con diferentes SSADHasas (EC 1.2.1.16). *Nitrosomonas europaea* (Neu), *Cupriavidus necator* (Cne), *Sulfolobus solfataricus* (Sso) y *Streptococcus pyogenes* (Spy). Los aminoácidos fueron coloreados de acuerdo al nivel de conservación entre los residuos. De mayor a menor: rojo, azul, verde y negro.

En función de este análisis y resultando que la identidad de la proteína que queremos caracterizar es similar a las dos enzimas evaluadas, decidimos analizar la actividad de GabD adaptando las metodologías descritas para otras np-Ga3PDHasas y SSDHasas, según se describe en Materiales y Métodos, respectivamente.

Caracterización de la actividad y la estructura cuaternaria de las dos aldehído-deshidrogenasas de *N. europea* obtenidas en forma recombinante

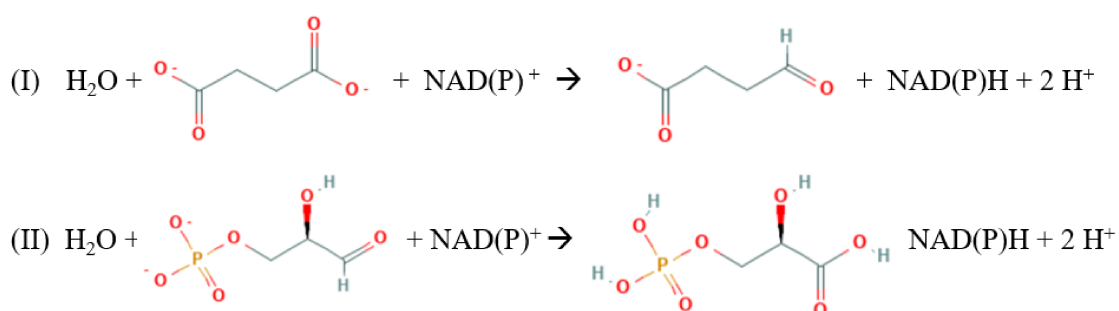
Para la proteína CbbG se determinó su capacidad de catalizar la reacción de oxidación del Ga3P a 1,3bis-PGA empleando NAD⁺ como cofactor (y viceversa) tal como se describe:



Así, pudimos determinar que la proteína CbbG recombinante purificada tiene actividades específicas de 7,5 U/mg en sentido de la oxidación del Ga3P y de 1,4 U/mg para la reducción del 1,3bis-PGA. Estos resultados confirman que la proteína es una Ga3PDHasa (EC 1.2.1.12) activa

que puede catalizar la reacción en ambos sentidos, coincidiendo con lo predicho en la base de datos que identificaba putativamente a CbbG como la única Ga3PDHasa de *N. europea* y que podría participar tanto en la vía glucolítica (oxidación del Ga3P), como de la neoglucogénesis y el ciclo BBC (reducción del 1,3bisPGA).

Para la proteína GabD se determinó su capacidad de catalizar la reacción de oxidación del Ga3P a 3-PGA empleando NAD⁺ y NADP⁺ como cofactor (reacción II), así también como su capacidad de catalizar la oxidación de otros aldehídos como el SSA (reacción I):



Según la metodología empleada, se pudo determinar que la proteína GabD recombinante purificada tiene una actividad específica de oxidación del Ga3P de 0,02 o 0,01 U/mg de proteína cuando se utiliza NAD⁺ o NADP⁺ como cofactor, respectivamente. En forma relevante, la capacidad de GabD para oxidar el SSA fue mayor en más de un orden de magnitud respecto al Ga3P, con valores de actividad específica de 0.6 y 0.7 U/mg de proteína cuando se utiliza NAD⁺ o NADP⁺ como cofactor. Así, los resultados muestran que GabD es más activa como SSADHasa (EC 1.2.1.16) que como np-Ga3PDHasa (EC 1.2.1.9). De acuerdo a lo determinado, el gen *gabD* de *N. europaea* codificaría para una SSADHasa que muestra también una capacidad de np-Ga3PDHasa marcadamente inferior.

Las proteínas recombinantes activas, obtenidas con una pureza > 90% (según lo que puede establecerse a partir de la electroforesis en el SDS-PAGE, Figura 47 A), se analizaron por cromatografía de filtración por gel en una columna con Superdex G200 previamente calibrada con marcadores de masa molecular (Figura 47 B). Los volúmenes de elusión se determinaron por medida de la actividad enzimática correspondiente. Los valores obtenidos para cada proteína en estudio, se interpolaron en la curva de patrones de masa molecular con los que se calibró la columna, obteniéndose como resultados valores de masa molecular de ~104 kDa y ~75 kDa para la estructura cuaternaria de GabD y CbbG, respectivamente. Considerando que las masas moleculares teóricas de CbbG y GabD recombinantes es de 36,2 kDa y 47,6 kDa, respectivamente; el análisis sugiere que ambas proteínas tendrían una estructura cuaternaria del tipo homodimérica.

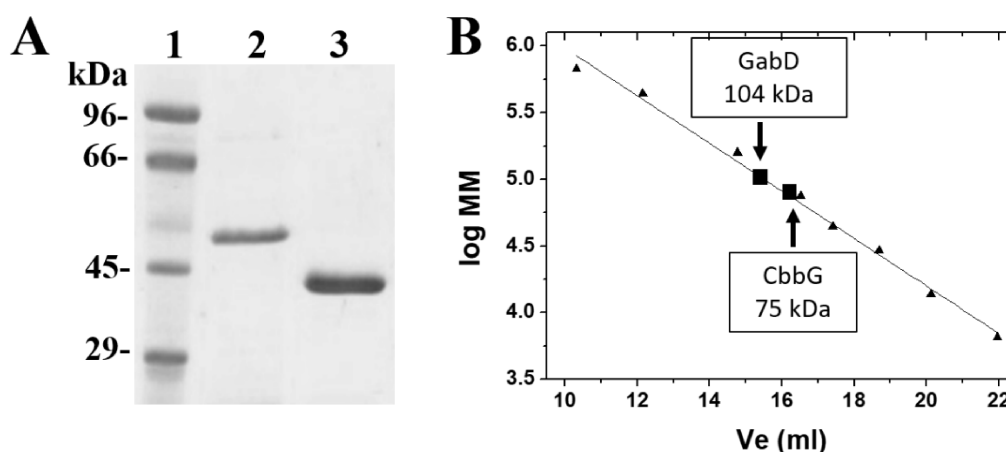


Figura 47. Purificación y determinación de la masa molecular nativa de las DHasas. (A) Perfil electroforético (SDS-PAGE 12 %) de las proteínas recombinantes purificadas mediante IMAC y teñido con Coomassie Brilliant Blue. Los números indican (1) marcador de masa molecular, (2) proteína GabD y (3) proteína CbbG. (B) Determinación de la masa molecular de las proteínas purificadas GabD y CbbG (cuadrados) empleando filtración por gel, Superdex G200. Gráfico del logaritmo de la masa molecular vs el volumen de elución obtenido al realizar el calibrado de la columna utilizando marcadores de masa molecular conocida (triángulos).

Caracterización cinética de CbbG, la Ga3PDHasa de N. europaea

Para determinar los parámetros cinéticos de la proteína CbbG de *N. europaea*, se realizaron medidas de su actividad empleando diferentes concentraciones de cada uno de los sustratos en ambos sentidos de la reacción. Los datos obtenidos, expresados en U/mg, se graficaron en función de la concentración de sustrato empleada y se ajustaron las curvas a un modelo matemático que nos permitió determinar los valores de los parámetros cinéticos que caracterizan a la enzima. Las curvas de saturación para la actividad de CbbG con diferentes sustratos se ajustaron a la ecuación de Hill, modelo a partir del cual se determinaron los parámetros cinéticos detallados en la Tabla 9.

En sentido de oxidación del Ga3P, se evaluó como sustratos tanto el D-Ga3P como su esteroisómero L-Ga3P. Las curvas de saturación para cada sustrato se muestran en la Figura 48 donde se observa que la enzima puede usar ambos enantiómeros como sustrato, pero con diferentes parámetros cinéticos. El valor de K_m es 11 veces menor para el D-Ga3P, resultando en un orden mayor de la eficiencia catalítica para el D- respecto al L-Ga3P.

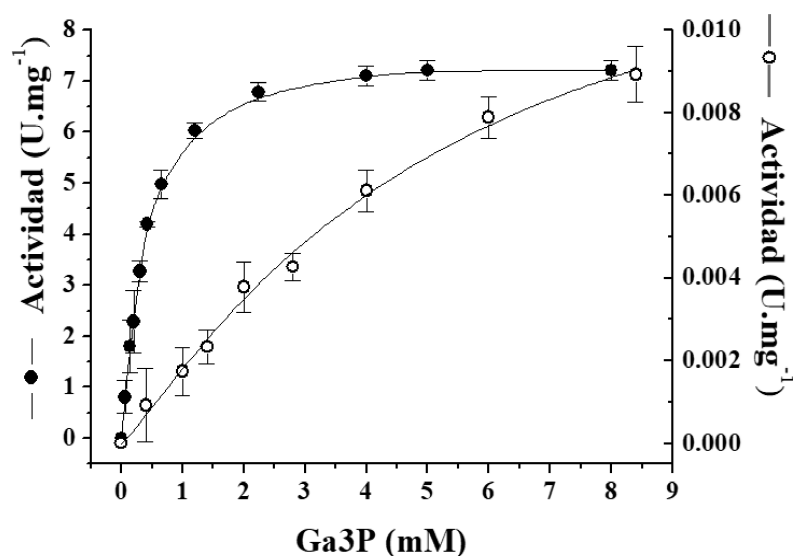


Figura 48. Curva de saturación de D-Ga3P y L-Ga3P para CbbG. Actividad de CbbG con diferentes concentraciones de D-Ga3P (círculo negro) o L-Ga3P (círculo blanco) determinadas a concentraciones saturantes y fijas de NAD⁺. Las curvas se ajustaron a la ecuación de Hill detallada en Materiales y Métodos.

En la Tabla 9, se muestran los valores de los parámetros cinéticos determinados para CbbG en ambos sentidos de reacción. Cabe señalar que en el sentido de oxidación de la triosa-P se muestran los valores determinados para el D-Ga3P. Cuando se comparan los valores obtenidos entre sí, se puede determinar que la enzima recombinante tiene una mayor afinidad por sus sustratos en el sentido de reducción del 1,3bis-PGA, siendo la afinidad relativa por el 1,3-bisPGA ~6 veces mayor a la determinada para el D-Ga3P y la afinidad por el NADH ~3 veces menor que la determinada para el NAD⁺. Sin embargo, dado que la k_{cat} para la oxidación del D-Ga3P es ~5 veces más alta que la obtenida en el sentido inverso de reacción, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) para la enzima resulta similar en ambos sentidos de la reacción.

Tabla 9. Parámetros cinéticos para CbbG. Se determinaron los parámetros cinéticos de CbbG variando la concentración de uno de los sustratos mientras se mantenía fija, y a concentraciones saturantes, las concentraciones de los co-sustratos. Los valores expresados resultan del promedio de al menos cuatro medidas independientes. Los valores de k_{cat} fueron calculados considerando 37,5 kDa como la masa molecular del monómero. *na*: no actividad.

Sustratos	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	n
NAD ⁺	288 ± 18	0,15 ± 0,03	3,2 x 10 ⁴	0,8 ± 0,1
D-Ga3P	266 ± 3	0,37 ± 0,01	1,2 x 10 ⁴	1,2 ± 0,1
NADP ⁺	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>
NADH	54 ± 2	0,45 ± 0,02	2,0 x 10 ³	1,1 ± 0,1
1,3 bisPGA	58 ± 1	0,07 ± 0,05	1,5 x 10 ⁴	1,2 ± 0,1
NADPH	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>

Debido a que la enzima podría participar tanto en la vía glucolítica (oxidación del Ga3P), como en la de gluconeogénesis y el ciclo BBC (reducción del 1,3bisPGA), se evaluó su actividad con los cofactores NADP⁺ o NADPH en reemplazo del NAD⁺ y NADH. Sin embargo, luego de analizar un amplio rango de concentraciones de cada uno de ellos (1-40 mM), estos sustratos no pudieron ser utilizados por la enzima, indicando que la misma es específica por NAD⁺ y NADH. Las propiedades y los valores de los parámetros cinéticos determinados a partir de la caracterización cinética de CbbG, fueron similares a lo ya descrito para la Ga3PDHasa del tipo EC 1.2.1.12 (NAD-dependiente) de otros organismos [125] [136] [137].

Caracterización cinética de la SSADHasa de N. europaea; GabD

Para determinar los parámetros cinéticos de la proteína GabD de *N. europaea*, se realizaron medidas de su actividad empleando diferentes concentraciones de D-Ga3P, L-Ga3P, SSA, NAD y NADP. Los datos obtenidos, expresados en U/mg, se graficaron en función de la concentración de sustrato empleada y se ajustaron las curvas a un modelo matemático que nos permitió determinar los valores de los parámetros cinéticos que caracterizan a la enzima.

En la Figura 49, se muestran las curvas de saturación para GabD con el sustrato SSA, empleando alternativamente NAD^+ o NADP^+ como cofactor.

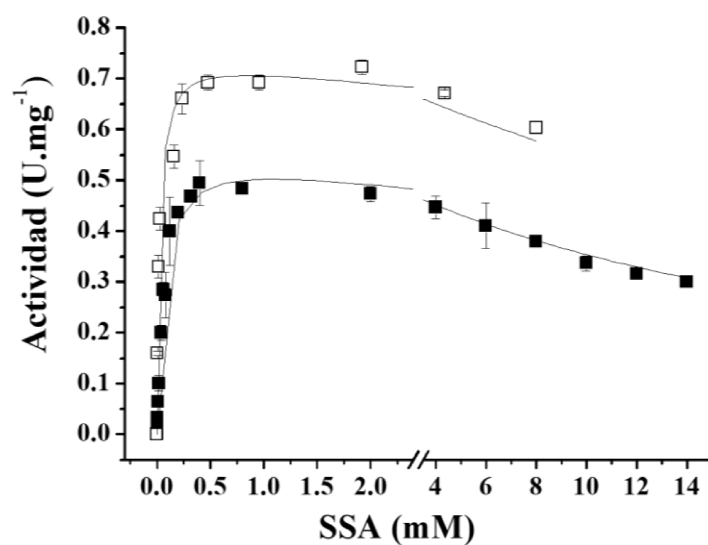


Figura 49. Curva de saturación de SSA para GabD. Curva de actividad de GabD con diferentes concentraciones de SSA y concentraciones saturantes y fijas de NAD^+ (cuadrados negros) o NADP^+ (cuadrados blancos). Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación desarrollada por Esser y col. [41] para cinéticas que muestran inhibición por exceso de sustrato.

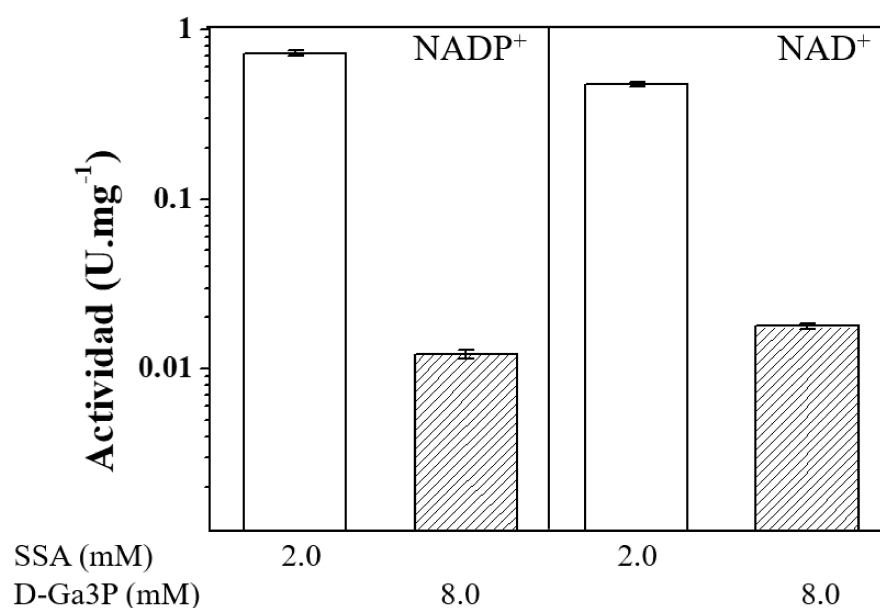


Figura 50. Actividad de GabD a concentraciones saturantes de SSA, D-Ga3P y NAD/NADP⁺. Actividad de GabD a concentración saturante de SSA (barras blancas) o de D-Ga3P (barras rayadas) fue determinada a una concentración saturante de NAD⁺ o NADP⁺.

A partir de las curvas de saturación para los diferentes sustratos de GabD (mostradas, para SSA, en la Figura 49), se determinaron los parámetros cinéticos para la enzima en presencia de NADP⁺ o NAD⁺ como cofactor tanto para SSA como D-Ga3P. Las curvas de saturación se ajustaron a la ecuación de Hill, modelo a partir del cual se determinaron los valores de los parámetros cinéticos detallados en la Tabla 10. Con los valores obtenidos, se calculó la eficiencia catalítica de la enzima para las diferentes combinaciones de sustrato. Así, pudimos determinar que la eficiencia catalítica de GabD es ~3500 mayor para el par SSA/NADP⁺ en comparación con el Ga3P/NADP⁺, y ~87 veces más alta cuando se comparan los pares SSA/NAD⁺ y Ga3P/NAD⁺. Estos resultados muestran una preferencia de GabD por el sustrato SSA en lugar de D-Ga3P, independientemente del cofactor que utilice para catalizar la reacción. Además, a partir de los datos de la Tabla 10 se puede señalar que la enzima tiene preferencia por el cofactor NADP⁺ cuando el SSA es el sustrato, ya que el valor de K_m para NADP⁺ es ~26 veces mayor que el obtenido para el NAD⁺. Esto además, impacta en el valor de K_m para el SSA que en presencia de NADP⁺ es ~3 veces menor en comparación del obtenido con NAD⁺. En cambio, cuando la enzima cataliza la oxidación del D-Ga3P, no se observaron diferencias significativas en cuanto a su preferencia por el NADP⁺ o NAD⁺. Cabe mencionar, además, que la GabD recombinante fue capaz de oxidar los isómeros D/L-Ga3P tanto con NADP⁺ o NAD⁺ como cofactores. Los valores de K_m obtenidos para los isómeros son similares

(D-Ga3P, $K_m \sim 2$ mM; L-Ga3P, $K_m \sim 3$ mM), mientras que la k_{cat} fue dos veces mayor con el isómero D-Ga3P con ambos cofactores ($\sim 0.4 \text{ min}^{-1}$).

Debido a que la enzima mostró cierta promiscuidad por el uso de sustratos, también evaluamos como alternativa de los mismos: formaldehído, glutaraldehído, etanol y glicerol. En ningún caso pudo detectarse actividad de la enzima incluso a concentraciones de 20 mM de estos compuestos. Los resultados obtenidos indican que *gabD* codifica para una enzima que principalmente convierte el SSA en succinato transfiriendo los equivalentes de reducción tanto al NADP^+ como al NAD^+ , pero con preferencia por el primero. Sin embargo, resulta importante resaltar que la enzima es promiscua por sus sustratos y que en determinadas condiciones también podría catalizar la oxidación del D/L-Ga3P tanto con NADP^+ o NAD^+ como cofactor, reflejando una actividad secundaria de np-Ga3PDHase.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de GabD para SSA y Ga3P con el uso de NAD^+ o NADP^+ como cofactor. Se determinaron los parámetros cinéticos de CbbG variando la concentración de uno de los sustratos mientras se mantenía fija y a concentraciones saturantes las de los co-sustratos. Los parámetros son el promedio de al menos cuatro medidas independientes. Los valores de k_{cat} fueron calculados considerando la masa molecular del monómero (47,6 kDa). En el caso donde la enzima fue inhibida por exceso de sustrato, el ajuste estadístico fue realizado utilizando la ecuación de Esser y col [41]. ni: no inhibido por sustrato.

Sustratos	k_{cat} (min^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	n	k_i (mM)
SSA	35 ± 1	$0,03 \pm 0,05$	$2,5 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,1$	27 ± 3
NADP^+	37 ± 1	$0,04 \pm 0,01$	$1,5 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,1$	21 ± 2
SSA	29 ± 1	$0,07 \pm 0,01$	$7,0 \times 10^3$	$1,0 \pm 0,1$	17 ± 2
NAD^+	27 ± 1	$1,12 \pm 0,06$	$4,0 \times 10^2$	$0,8 \pm 0,1$	ni
D-Ga3P	$0,80 \pm 0,04$	$1,90 \pm 0,20$	7	$1,2 \pm 0,1$	ni
NADP^+	$0,80 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	56	$0,9 \pm 0,1$	ni
D-Ga3P	$1,0 \pm 0,2$	$2,20 \pm 0,10$	8	$1,3 \pm 0,1$	ni
NAD^+	$1,0 \pm 0,2$	$0,40 \pm 0,03$	50	$1,0 \pm 0,1$	ni

Discusión

N. europaea es una β -proteobacteria quimiolitotrófica que (junto con otros microorganismos) participa en la conversión y la circulación de material inorgánico en la Tierra [21]. La bacteria fija el CO₂ mediante un ciclo de BBC similar al que se encuentra en las plantas, pero utiliza la energía obtenida a través de la oxidación del nitrógeno inorgánico en lugar de la luz solar para el proceso biosintético [175].

En algas verdes y plantas superiores, donde el ciclo BBC ha sido ampliamente estudiado, la fijación de CO₂ catalizada por la Rubisco genera 3PGA que luego es convertido en Ga3P dentro del cloroplasto. Esta última conversión implica dos pasos: una molécula de 3PGA es fosforilada por una PGKasa (EC2.7.2.3) para generar 1,3bisPGA, el que luego se reduce en una segunda reacción catalizada por la Ga3PDHaseA/B (EC 1.2.1.13)] para así producir el Ga3P. Esta triosa-P se divide luego entre varias rutas metabólicas que tienen lugar en diferentes compartimentos celulares [192] [48]. Una vez transportado al citoplasma por un transportador específico, el Ga3P puede ser oxidado nuevamente por la Ga3PDHase dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.12) o la np-Ga3PDHase (EC 1.2.1.9) dependiente de NADP⁺, generando ATP y NADH o NADPH, respectivamente. En plantas, estas enzimas están reguladas por mecanismos postraduccionales que permiten modificar el flujo metabólico a fin de obtener fuente de energía o poder reductor según las necesidades celulares [193] [194] [195] [125] [98] [54] [196].

El análisis del genoma de *N. europaea*, que fue secuenciado en 2003, ha permitido predecir *in silico* el escenario de sus vías metabólicas [25]. Respecto al ciclo de BBC, se pudieron identificar genes que codificarían para casi todas las enzimas involucradas en el ciclo, excepto la sedoheptulosa-1,7bis-fosfatasa (EC 3.1.3.37) y la Ga3PDHaseA/B dependiente de NADP⁺. En función del análisis realizado sobre la información genómica de *N. europaea*, se propuso que la enzima Ga3PDHase dependiente de NAD⁺ (codificada por el gen *cbbG*) podría sustituir hipotéticamente a la Ga3PDHaseA/B en el ciclo del BBC. Cabe señalar que la Ga3PDHase dependiente de NAD⁺ (EC 1.2.1.12) en otros organismos participa de otras vías metabólicas, siendo su función clave para la glucólisis y la gluconeogénesis [25]. Asimismo, es importante recordar que otros organismos capaces de fijar CO₂ mediante el ciclo de BBC tienen tres tipos distintos de Ga3PDHases, tal como fue descrito. De esta forma, considerando que en *N. europaea* habría un único gen que codifica para alguna de las distintas versiones de la Ga3PDHase, la enzima codificada por el gen *cbbG* debería funcionar en las diferentes vías metabólicas: fijación del carbono mediante el ciclo de BBC, la glucólisis y/o la gluconeogénesis. Dados los antecedentes, decidimos estudiar la enzima codificada por el gen *cbbG* para una mejor comprensión de las propiedades bioquímicas. Con este

objetivo, se clonó el gen a partir del ADN genómico de la bacteria y se expresó de forma heteróloga en *E. coli*, para obtener la proteína CbbG producida de forma recombinante con alto grado de pureza. La enzima, pudo expresarse de forma soluble y activa y con esto pudimos realizar su caracterización cinética.

Los resultados obtenidos en la caracterización bioquímica indicaron que la Ga3PDHase de *N. europaea* cataliza la oxidación reversible del Ga3P a 1,3bisPGA, utilizando específicamente NAD⁺/NADH como cofactor. Los parámetros cinéticos indican que la enzima tiene un valor de K_m menor para el 1,3bisPGA (cuando se compara con el del Ga3P) y alcanza un valor mayor en la constante de especificidad en la oxidación de Ga3P, lo que resulta en una eficiencia catalítica similar para ambas direcciones de la reacción reversible. En función de estos resultados, la Ga3PDHase de *N. europaea* podría estar involucrada en distintas vías metabólicas que precisen convertir el Ga3P en 1,3bisPGA y viceversa; es decir, en la glucólisis o el ciclo de BBC (también llamado ciclo reductivo de las pentosas fosfato), respectivamente. El hecho de que la enzima sea específica para el NAD⁺/NADH, se correlaciona con observaciones previas obtenidas a partir de extractos celulares de *N. europaea* cultivadas con [¹⁴C] CO₂ [175].

En organismos eucariotas que emplean el ciclo de BBC el cofactor clave en la transferencia del poder reductor a las triosas-P es el NADP⁺; sin embargo, en *N. europaea* los resultados indican que la Ga3PDHase es dependiente de NAD⁺. Se ha sugerido que en un organismo quimiolitotrófico procarionta que carece de vías catabólicas (como es el caso de *N. europaea*), se lograría un ahorro significativo de energía al usar NADH en lugar de NADPH (el cual es generado a partir del NADH en una reacción dependiente de energía) para reducir 3-PGA [25]. Al determinar la estructura cuaternaria de la Ga3PDHase de *N. europeae* obtenida en forma recombinante, resultó llamativo que la misma sea activa con una estructura dimérica. Esto es distintivo con respecto a lo determinado para esta enzima en otros organismos donde la gran mayoría ha resultado ser funcional en una estructura del tipo tetrámero [135] [197] [198]. No obstante, esta no sería la única Ga3PDHase activa con esta conformación ya que el modelo tridimensional obtenido *in silico* para la Ga3PDHase dimérica de *Entamoeba histolytica* [199] predice que la enzima es también dimérica. Las dos enzimas mencionadas, comparten entre sí una identidad del 57% (a nivel de aminoácidos).

N. europaea es un organismo preferentemente autotrófico que obtiene energía y poder reductor a partir de la oxidación del amoníaco a nitrito para luego fijar el CO₂ para satisfacer sus demandas de esqueletos de carbono [25]. En este escenario metabólico, esquematizado en la Figura 48, la Ga3PDHase estaría involucrada principalmente en el ciclo de BBC catalizando la reducción del 1,3bisPGA a Ga3P a expensas de NADH. Se ha demostrado en *N. europaea* que la depleción de su

fuelle de energía (amoníaco) y la presencia de carbonato (condiciones que no permiten la fijación de carbono), ocasiona una modificación de la expresión génica global y particularmente la expresión del gen *cbbG* resulta 10 veces menor en células privadas de amoníaco en comparación con células que crecen en condiciones similares a su entorno natural [181]. Además, la glucosa no es una fuente de carbono para *N. europaea* y las enzimas relacionadas con su metabolismo no se detectaron bioquímicamente ni se identificaron en el genoma de la bacteria [175]. Los datos genómicos muestran sólo unos pocos genes que codifican transportadores de sustratos orgánicos en *N. europaea* [26], aunque el perfil del genoma reveló la presencia de vías completas para la oxidación de algunos compuestos orgánicos simples. De hecho, la fructosa y el piruvato podrían servir como la única fuente de carbono para el crecimiento de *N. europaea*, pero todavía se necesita amoníaco como fuente de energía [180]. Incluso cuando el modo de crecimiento quimiolitoheterotrófico sea inusual para esta bacteria en su entorno natural [180] [200]; este organismo tiene la capacidad bioquímica de realizar la glucólisis comenzando desde la fructosa y emdiante una vía que involucra a la Ga3PDHasa (caracterizada en este trabajo) para la oxidación de Ga3P. La existencia de un único gen que codifica para alguna Ga3PDHasa capaz de catalizar reacciones en vías metabólicas opuestas, no sería una problema para *N. europaea*. Durante su crecimiento quimiolitautotrófico predominaría el sentido de reducción del 1,3bisPGA para ser convertido en Ga3P pudiendo estos metabolitos repartirse en otras vías metabólicas asociadas.

En este trabajo, también estudiamos la proteína GabD. A partir de la búsqueda realizada *in silico* en la base de datos del genoma de *N. europaea*, se pudo identificar que el gen *gabD* tenía a nivel de proteína una similitud con las SSADHasas de organismos como *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus tokadaii* y con las np-Ga3PDHasas de organismos como *Sulfolobus tokadaii* y *Triticum aestivum*. Estas dos enzimas están muy relacionadas en su secuencia y pertenecen a la superfamilia de las aldehído DHasas [41] [191]. En *N. europaea* no se ha caracterizado ninguna de las dos enzimas y existiendo sólo un gen codificante para este tipo de DHasas, resultó de relevancia desentrañar que actividad enzimática tendría la proteína GabD. Con este objetivo, se clonó el gen a partir del ADN genómico de la bacteria y se expresó de forma heteróloga en *E. coli*, para obtener la proteína GabD en forma recombinante. La enzima, pudo expresarse de forma soluble y activa y con esto pudimos realizar su caracterización cinética.

De los estudios cinéticos realizados, determinamos que GabD puede catalizar la oxidación irreversible del Ga3P a 3PGA utilizando tanto NAD⁺ como NADP⁺ como cofactor, asemejándose así a la función que cumplen las np-Ga3PDHasas. Sin embargo, la actividad de la enzima para convertir el Ga3P fue minoritaria en comparación a la actividad de la misma cuando reemplazamos

el sustrato Ga3P por SSA. La eficacia catalítica de GabD fue tres y cuatro órdenes de magnitud mayor cuando oxida la SSA en presencia de NAD^+ o NADP^+ , respectivamente. Además, el valor de K_m para SSA fue al menos 60 más bajo que el obtenido para el Ga3P. Todos estos resultados sugieren que GabD codifica para una SSADHase (EC 1.2.1.16) que preferiblemente usa NADP^+ como cofactor pero que es promiscua por el NAD^+ .

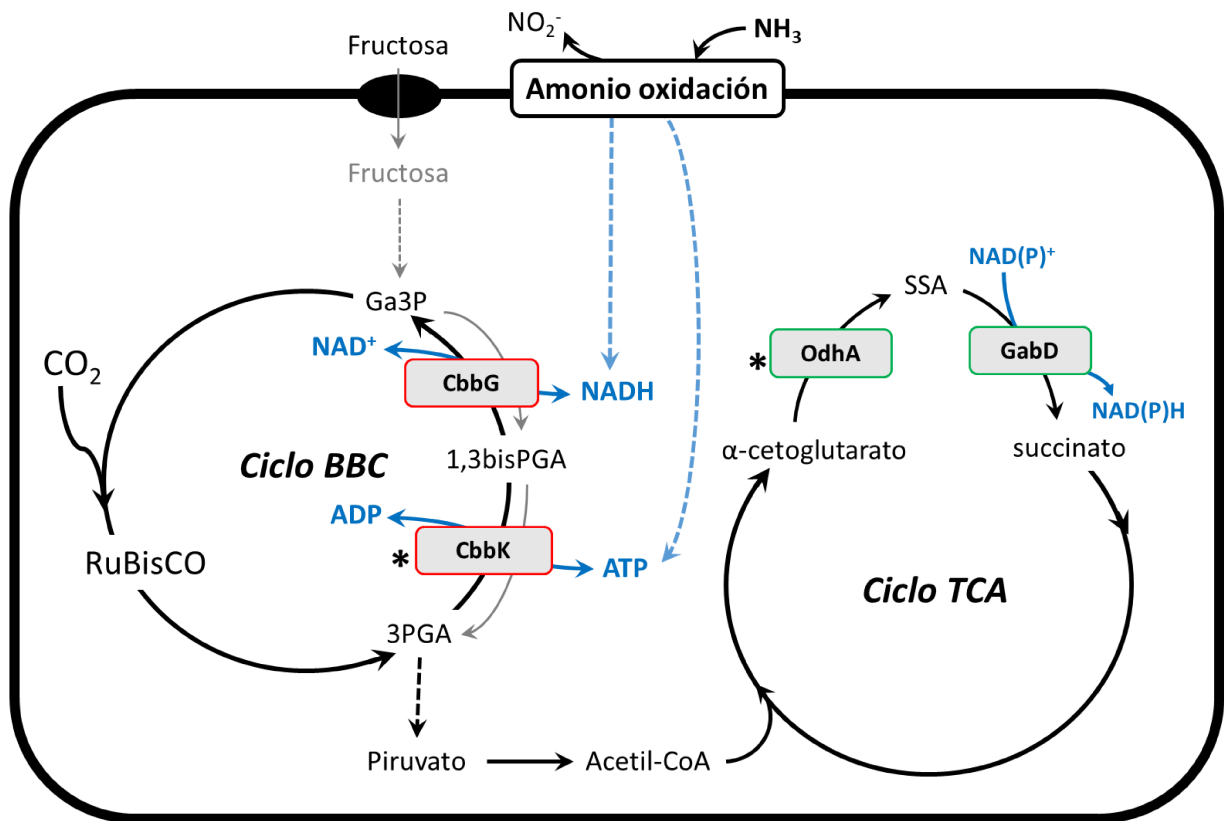


Figura 51. Esquema representativo del metabolismo del carbono en *N. europaea*, con énfasis en las vías metabólicas que involucran a CbbG y GabD. La Ga3PDHase dependiente de NAD^+/NADH está involucrada en el metabolismo de las triosa-P tanto en el ciclo de BBC como en la glucólisis. La proteína GabD funciona preferentemente como una SSADHase involucrada en el ciclo del TCA permitiendo así que este se comporte como un ciclo cerrado. *Las enzimas codificadas por estos genes fueron identificadas por homología de secuencias pero aún no fueron caracterizadas bioquímicamente.

Para comprender el rol de la SSADHase en el metabolismo de *N. europaea*, revisamos los antecedentes bibliográficos relacionados con las características de las vías metabólicas en las que se encuentra involucrada la enzima, tanto en bacterias heterotróficas como en cianobacterias. En todos los casos analizados, las SSADHas participan de vías alternativas del ciclo TCA [41] [180] [200]

[186] [56]. El ciclo del TCA es una ruta metabólica central en la mayoría de las bacterias, arqueas y eucariotas, siendo responsable de la oxidación completa de los compuestos derivados del metabolismo de los carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos que son catabolizados hasta la liberación de CO₂ conservando los electrones mediante la reducción de NAD⁺ y FAD⁺ [56]. Los cofactores reducidos luego donan electrones a una cadena de transporte asociada a la membrana que permite la síntesis de ATP, mientras que los metabolitos producidos en el ciclo de TCA suministran esqueletos carbonados para la biosíntesis de una variedad de compuestos [201].

En bacterias, se ha demostrado que existen variantes en las reacciones que completan el ciclo del TCA, con varias alternativas descritas. En *N. europaea* se había propuesto que el ciclo del TCA sería incompleto y que funcionaría en forma de herradura debido a que no se ha podido detectar la actividad de todas las enzimas que regularmente forman parte del ciclo en otros organismos [179]. Sin embargo, en otros organismos como *S. solfataricus* [41] y *Synechococcus* sp. PCC 7002 [188] se ha demostrado que la SSADHasa participa en el metabolismo del ácido γ -aminobutírico (GABA) como una reacción asociada al ciclo TCA. Otra función determinada para la SSADHasa en bacterias y cianobacterias asociada al TCA es el metabolismo del 2-oxoglutarato a succinato resultante de la acción consecutiva de la 2-oxoglutarato descarboxilasa (OgdA) y la SSADHasa [188] [189].

Teniendo en cuenta los antecedentes y para intentar comprender el rol de la la SSADHasa en el metabolismo de *N. europaea*, realizamos búsquedas *in silico* de genes que puedan codificar enzimas asociadas al metabolismo del GABA y el 2-oxoglutarato. Sin embargo, no pudimos identificar genes que codifiquen proteínas con similitud de secuencia mayor al 10% a la glutamato deshidrogenasa (GdhA), glutamato descarboxilasa (GadA) y GABA aminotransferasa. Incluso cuando la búsqueda se realizó empleando como molde para el BLAST secuencias de las proteínas de diferentes organismos. Cuando realizamos la búsqueda en el genoma de *N. europaea* utilizando la secuencia de la 2-oxoglutarato descarboxilasa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (codificada por el gen *Rv1248c*), encontramos la proteína NE2374 con una similitud de secuencia del 43% y una identidad del 32%. Esta proteína se identificó putativamente en el genoma de *N. europaea* como el componente E1 de la α -cetoglutarato deshidrogenasa (KDHasa); sin embargo, la actividad de la KDHasa no pudo detectarse en los extractos de *N. europaea* en más de un estudio [178] [202]. Debido a que la actividad de la KDHasa estaba ausente y no se identificaron vías alternativas en su reemplazo, se había sugerido que en *N. europaea* el ciclo de TCA opera en un modo ramificado o de herradura: una parte oxidativa (de piruvato a 2-oxoglutarato) y otra reductora (que conduce a la formación de succinil-CoA) [178]. Aunque se detectó la transcripción del gen que putativamente

codifica a la 2-oxoglutarato deshidrogenasa en *N. europaea* cuando esta crece sin CO₂ o anaeróbicamente pero complementada con fuentes de energía y carbono [26] [176], no se obtuvieron evidencias bioquímicas para la ocurrencia de este paso metabólico [176]. Además, y a diferencia de algunos organismos con ciclos de TCA ramificados o incompletos, *N. europaea* no contiene genes que codifiquen enzimas capaces de participar en el metabolismo del glioxilato, que también ha demostrado ser una alternativa del ciclo TCA en otros organismos [201].

En función de los resultados y el análisis realizado en este trabajo, es razonable sugerir un nuevo escenario metabólico para el ciclo de TCA en *N. europaea*. En este escenario (Figura 51) el α -cetoglutarato sería descarboxilado a SSA por la descarboxilasa específica (enzima anotada como NE2374 en la base de datos NCBI) y el SSA sería oxidado a succinato por la SSADHasa (proteína GabD codificada por *gabD*). Así, estas dos enzimas serían capaces de cerrar el ciclo del TCA en *N. europaea* planteando una vía alternativa que también se ha descrito en diferentes especies de micobacterias [203], de *Rhodococcus* [186] y de cianobacterias [204].

Los resultados obtenidos contribuyen a la comprensión de los roles metabólicos desempeñados por la Ga3PDHasa y la SSADHasa en organismos quimiolitautotróficos críticos en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Específicamente se proporciona nueva información con respecto a las vías claves como la fijación de CO₂, la glucólisis y el ciclo de TCA, vías que impulsan el desarrollo del microorganismo y le permiten cumplir su papel en la naturaleza. Las nuevas piezas agregadas al rompecabezas del metabolismo del carbono de *N. europaea* aportan al conocimiento sobre la bioquímica de este organismo y destacan nuevos actores para futuras investigaciones. Cabe señalar que estudios complementarios relacionados con la expresión génica *in vivo*, son claves para complementar la comprensión del metabolismo del carbono y la energía en *N. europaea* y organismos relacionados.

Conclusiones

1- Obtuvimos por homología de secuencias los genes *cbgG* y *gabD*, que codifican para las enzimas Ga3PDHasa y SSADHasa, respectivamente de *N. europaea*. Los clonamos y expresamos recombinantemente transformando células de *E. coli*.

2- Purificamos a homogeneidad electroforética y con altos rendimientos las proteínas CbbG y GabD, empleando una cromatografía de afinidad a metal inmovilizado.

- 3- Determinamos actividad enzimática y caracterizamos cinéticamente la CbbG. La misma demostró ser específica para los sustratos D-Ga3P y NAD⁺ siendo de esta manera, la única enzima encargada de la oxidación del Ga3P en *N. europaea* tanto en la vía de glucólisis/gluconeogénesis como en el ciclo de BBC.
- 4- Pudimos determinar actividad enzimática de GabD empleando como sustrato diferentes aldehídos (SSA y ambos isómeros D- y L-Ga3P) y cofactores (NAD⁺ o NADP⁺).
- 5- Caracterizamos cinéticamente GabD. La misma mostró ser 3500 veces más eficiente catalíticamente cuando emplea los pares SSA/NADP⁺ o SSA/NAD⁺, es decir, cuando utiliza el aldehído SSA, demostramos de esta manera que GabD se comporta como una SSADHasa.
- 6- Demostramos que GabD es la única SSADHasa que presenta *N. europaea*. La misma esta involucrada en cerrar el ciclo de TCA de una manera no tradicional, convirtiendo el SSA proveniente de la reacción catalizada por una α -cetoglutarato descarboxilasa (NE2374) en succinato.

CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo de tesis, se puede enunciar las siguientes conclusiones generales:

- a- Los cambios en las condiciones de crecimiento de algas verdes unicelulares junto con la determinación de sus compuestos de reserva son una herramienta muy útil para detectar cambios en el metabolismo del carbono. Cuando a los mismos se le suma medidas de actividad de enzimas claves del metabolismo del carbono, podemos determinar con mayor especificidad los puntos del metabolismo donde ocurren aquellas modificaciones. Esto no es solo un aporte al conocimiento para poder puntualizar un estudio sino también un aporte de información útil para realizar mejoramientos de la especie con algún fin comercial.
- b- La metodología del ADN recombinante fue una técnica sumamente útil para producir: ambas isoformas de la enzima Ga3PDHase de *Chlorella* sp. y las enzimas Ga3PDHase y SSADHase de *N. europaea*. Los sistemas de expresión logrados nos permitieron obtener enzimas fusionadas a una etiqueta de histidinas que permitió purificarlas en un único paso, con altos rendimientos y grado de pureza, superando así lo complicado que resulta la purificación a homogeneidad en cantidades relativamente elevadas de enzimas a partir de extractos de algas verdes unicelulares.
- c- El estudio bioquímico y estructural de las enzimas nos permitió incrementar el conocimiento sobre las propiedades funcionales de las Ga3PDHase y la SSADHase de *N. europaea*. De esta manera, la identidad asignada mediante análisis genómicos queda corroborada y además, se les asigna otras posibles funciones dentro del microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. H Curtis, NS Barnes, A Schnek y G Flores (2004) *Biología*, Sexta ed., Editorial Médica Panamericana.
2. GM Cooper, RE Hausman y N Wright (2009) *La célula*, Editorial Marbán.
3. N Roca Soto (1998) *La célula: el origen de la vida*, Editorial Parramón.
4. JdD Vial Correa (1999) *Historia de la célula*, Vol. 1, Primera ed., Editorial Universitaria S.A.
5. D Voet y JG Voet (2006) *Bioquímica*, Tercera ed., Editorial Médica Panamericana.
6. H Lodish, A Berk, P Matsudaira, M Krieger, MP Scott, SL Zipursky y J Darnell (2005) *Biología Celular y Molecular*, Quinta ed., Editorial Médica Panamericana.
7. E Feduchi Canosa, I Blasco Castiñeyra, CS Romero y E Yáñez Conde (2010) *Bioquímica: Conceptos esenciales*, Primera ed., Editorial Médica Panamericana.
8. A Garrido Pertierra y JM Teijón Rivera (2006) *Fundamentos de Bioquímica Metabólica*, Segunda ed., Editorial Tébar
9. RE Lee (2008) *Phycology*, Cuarta ed., Editorial Cambridge University Press.
10. R Amos (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Primera ed., Editorial Blackwell Science.
11. J Wehr, R Sheath y P Kocielek (2015) *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*, Segunda ed., Editorial Academic Press.
12. SD Dyall, MT Brown y PJ Johnson. (2007) Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles, *Science* 304, 253.
13. A Iglesias y F Podestá. (2005) Photosynthate Formation and Partitioning in Crop Plants, In *Handbook of Photosynthesis* Tercera ed., Editorial CRC Press.
14. CV Piattoni, CM Figueroa, VE Perotti, FE Podestá y AA Iglesias. (2014) Cellular and Molecular Aspect of Plant/Crop Physiology, In *Handbook of Plant and Crop Physiology* Tercera ed., Editorial CRC Press.
15. CJ Smith. (1999) Carbohydrate biochemistry, In *Plant biochemistry and molecular biology* Segunda ed., Editorial Wiley.
16. T Yamanaka. (2008) General Considerations, In *Chemolithoautotrophic Bacteria. Biochemistry and Environmental Biology*, Springer, Japan.
17. A Teske, E Alm, JM Regan, S Toze, BE Rittmann y DA Stahl. (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria, *Journal of bacteriology* 176, 6623-6630.
18. T Vannelli, M Logan, DM Arciero y AB Hooper. (1990) Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia- oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*, *Applied and environmental microbiology* 56, 1169-1171.
19. ME Rasche, MR Hyman y DJ Arp. (1991) Factors Limiting Aliphatic Chlorocarbon Degradation by *Nitrosomonas europaea*: Cometabolic Inactivation of Ammonia Monooxygenase and Substrate Specificity, *Applied and environmental microbiology* 57, 2986-2994.
20. WK Keener y DJ Arp. (1994) Transformations of Aromatic Compounds by *Nitrosomonas europaea*, *Applied and environmental microbiology* 60, 1914-1920.
21. T Yamanaka. (2008) Nitrogen Circulation on Earth and Bacteria, In *Chemolithoautotrophic Bacteria. Biochemistry and Environmental Biology*, Springer.
22. H-P Koops y A Pommerening-Röser. (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species, *FEMS Microbiology Ecology* 37, 1-9.
23. P Abbott (2006) *Bacteria In Control Of Life, Death, & Evolution?*, AuthorHouse.
24. P Singleton (2004) *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*, Wiley.
25. P Chain, J Lamerdin, F Larimer, W Regala, V Lao, M Land, L Hauser, A Hooper, M Klotz, J Norton, L Sayavedra-Soto, D Arciero, N Hommes, M Whittaker y D Arp. (2003)

- Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*, *Journal of bacteriology* 185, 2759-2773.
26. NG Hommes, LA Sayavedra-Soto y DJ Arp. (2003) Chemolithoorganotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* on fructose, *Journal of bacteriology* 185, 6809-6814.
 27. C Yang, Q Hua y K Shimizu. (2000) Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions, *Biochemical Engineering Journal* 6, 87-102.
 28. JF Kasting y JL Siefert. (2002) Life and the Evolution of Earth's Atmosphere, *Science* 296, 1066-1068.
 29. J Xiong y CE Bauer. (2002) Complex evolution of photosynthesis, *Annual Review of Plant Biology* 53, 503-521.
 30. JM Olson y RE Blankenship. (2005) Thinking about the evolution of photosynthesis, In *Discoveries in Photosynthesis* (Govindjee, JT Beatty, H Gest y JF Allen, Eds.), Springer Netherlands, Dordrecht.
 31. CV Piattoni. (2010) Metabolismo del carbono y del poder reductor en células autótrofas y heterótrofas, In *Laboratorio de Enzimología Molecular*, Universidad Nacional del Litoral.
 32. JH Bryce y SA Hill. (1993) Energy Production in Plant Cells, In *Plant Biochemistry and Molecular Biology* Segunda ed., Editorial Chichester, John Wiley.
 33. L Taiz, E Zeiger, IM Moller y A Murphy (2015) *Plant Physiology and Development*, Sexta ed., Editorial Sinauer Associates.
 34. TD Brock (1978) *Biología de los microorganismos*, Segunda ed., Editorial Ediciones Omega.
 35. J Stein, S Craig Gary, R Hessler, S Ohta, R Vetter, J Childress y H Felbeck. (1988) Chemoautotrophic Symbiosis in a Hydrothermal Vent Gastropod, *The Biological Bulletin* 174, 373-378.
 36. T Iizumi, M Mizumoto y K Nakamura. (1998) A Bioluminescence Assay Using *Nitrosomonas europaea* for Rapid and Sensitive Detection of Nitrification Inhibitors, *Applied and environmental microbiology* 64, 3656-3662.
 37. B Yang, J Liu, X Ma, B Guo, B Liu, T Wu, Y Jiang y F Chen. (2017) Genetic engineering of the Calvin cycle toward enhanced photosynthetic CO₂ fixation in microalgae, *Biotechnol Biofuels* 10, 229-229.
 38. TB Schreier y JM Hibberd. (2019) Variations in the Calvin-Benson cycle: selection pressures and optimization?, *J Exp Bot* 70, 1697-1701.
 39. R Lannes, K Olsson-Francis, P Lopez y E Bapteste. (2019) Carbon Fixation by Marine Ultrasmall Prokaryotes, *Genome Biol Evol* 11, 1166-1177.
 40. J Bassham y BOB Buchanan. (1982) Carbon Dioxide Fixation Pathways in Plants and Bacteria.
 41. D Esser, T Kouril, F Talfournier, J Polkowska, T Schrader, C Brasen y B Siebers. (2013) Unraveling the function of paralogs of the aldehyde dehydrogenase super family from *Sulfolobus solfataricus*, *Extremophiles : life under extreme conditions* 17, 205-216.
 42. AA Benson, JA Bassham, M Calvin, TC Goodale, VA Haas y W Stepka. (1950) The Path of Carbon in Photosynthesis. V. Paper Chromatography and Radioautography of the Products, *J Am Chem Soc* 72, 1710-1718.
 43. AA Iglesias, FE Podestá y CS Andreo. (1997) Structural and regulatory properties of enzymes involved in C₃, C₄ and CAM pathways for photosynthetic carbon assimilation, In *Handbook of photosynthesis*, Editorial Marcel Dekker.
 44. RJ Ellis. (1979) Most abundant protein in the world, *Trends Biochem Sci* 4, 241-244.
 45. WC Plaxton. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47, 185-214.
 46. CV Piattoni, DM Bustos, SA Guerrero y AA Iglesias. (2011) Nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated in wheat endosperm at

- serine-404 by an SNF1-related protein kinase allosterically inhibited by ribose-5-phosphate, *Plant Physiol* 156, 1337-1350.
47. AA Iglesias y FE Podestá. (2008) Carbon metabolism in turfgrasses, In *Handbook of Turfgrasses Management and Physiology*, Editorial AZ: Taylos & Francis Group.
 48. CV Givan. (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress, *Biological Reviews* 74, 277-309.
 49. RJ Muchut, CV Piattoni, E Margarit, KEJ Tripodi, FE Podestá y AA Iglesias. (2019) Heterologous expression and kinetic characterization of the α , β and $\alpha\beta$ blend of the PPI-dependent phosphofructokinase from *Citrus sinensis*, *Plant Science* 280, 348-354.
 50. N Chaffey. (2003) Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular biology of the cell. 4th edn, *Ann Bot* 91, 401-401.
 51. AA Iglesias. (1990) On the metabolism of triose-phosphates in photosynthetic cells. Their involvement on the traffic of ATP and NADPH, *Biochemical Education* 18, 2-5.
 52. DM Bustos, CA Bustamante y AA Iglesias. (2008) Involvement of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to oxidative stress, *Journal of Plant Physiology* 165, 456-461.
 53. GJ Kelly y M Gibbs. (1973) Nonreversible α -Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase of Plant Tissues, *Plant Physiology* 52, 111-118.
 54. DM Bustos y AA Iglesias. (2002) Non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is post-translationally phosphorylated in heterotrophic cells of wheat (*Triticum aestivum*), *FEBS letters* 530, 169-173.
 55. DM Bustos y AA Iglesias. (2003) Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins, *Plant Physiol* 133, 2081-2088.
 56. HA Krebs y WA Johnson. (1937) Acetopyruvic acid ($\alpha\gamma$ -diketovaleric acid) as an intermediate metabolite in animal tissues, *Biochemical Journal* 31, 772-779.
 57. M Olaizola. (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace, *Biomolecular Engineering* 20, 459-466.
 58. I Suther y D Rissik. (2009) The importance of plankton, In *Plankton. A guide to their ecology and monitoring for water quality* (I Suther y D Rissik, Eds.), Csiro Publishing, Collingwood.
 59. R Harun, M Singh, G M Forde y M K danquah. (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 1037-1047.
 60. A Guedes, H Amaro y F Xavier Malcata. (2011) Microalgae As Sources of High Added-Value Compounds-A Brief Review of Recent Work, *Biotechnology progress* 27, 597-613.
 61. AJ Smit. (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review, *Journal of Applied Phycology* 16, 245-262.
 62. P Spolaore, C Joannis-Cassan, E Duran y A Isambert. (2006) Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87-96.
 63. V Sivasubramanian, V V Subramanian y M Muthukumar. (2010) Bioremediation of Chrome-sludge from an Electroplating Industry Using the Microalga *Desmococcus olivaceus* – a Pilot Study, *J. Algal Biomass Utiln* 1, 104-128.
 64. G Dragone, BD Fernandes, AP Abreu, AA Vicente y JA Teixeira. (2011) Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae, *Appl Energy* 88 3331-3335.
 65. B Fernandes, G Dragone, AP Abreu, P Geada, J Teixeira y A Vicente. (2012) Starch determination in *Chlorella vulgaris*—a comparison between acid and enzymatic methods, *Journal of Applied Phycology* 24, 1203-1208.
 66. A Hirano, R Ueda, S Hirayama y Y Ogushi. (1997) Fixation and Efficient Utilization of EnergyCO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation, *Energy* 22, 137-142.

67. B Maršálková, M Širmerová, M Kuřec, T Brányik, I Brányiková, K Melzoch y V Zachleder (2010) *Microalgae Chlorella sp. as an Alternative Source of Fermentable Sugars*, Vol. 21.
68. GO James, CH Hocart, W Hillier, H Chen, F Kordbacheh, GD Price y MA Djordjevic. (2011) Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation, *Bioresource Technology* 102, 3343-3351.
69. M Siaut, S Cuiné, C Cagnon, B Fessler, M Nguyen, P Carrier, A Beyly, F Beisson, C Triantaphylidès, Y Li-Beisson y G Peltier. (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves, *BMC Biotechnology* 11, 1-15.
70. L Rodolfi, G Chini Zittelli, N Bassi, G Padovani, N Biondi, G Bonini y MR Tredici. (2009) Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnology and Bioengineering* 102, 100-112.
71. ZT Wang, N Ullrich, S Joo, S Waffenschmidt y U Goodenough. (2009) Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot Cell* 8, 1856-1868.
72. IA Guschina y JL Harwood. (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, *Progress in Lipid Research* 45, 160-186.
73. J Msanne, D Xu, AR Konda, JA Casas-Mollano, T Awada, EB Cahoon y H Cerutti. (2012) Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa sp. C-169*, *Phytochemistry* 75, 50-59.
74. ER Moellering y C Benning. (2010) RNA Interference Silencing of a Major Lipid Droplet Protein Affects Lipid Droplet Size in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryot Cell* 9, 97-106.
75. Y-H Chen y TH Walker. (2011) Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol, *Biotechnology Letters* 33, 1973-1983.
76. T Heredia-Arroyo, W Wei, R Ruan y B Hu. (2011) Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials, *Biomass Bioenergy* 35, 2245 – 2253.
77. J Lalucat, J Imperial y R Pares. (1984) Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella sp. VJ79*, *Biotechnol Bioeng* 26, 677 – 681.
78. O Perez-Garcia, FME Escalante, LE de-Bashan y Y Bashan. (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, *Water Research* 45, 11-36.
79. X Miao y Q Wu. (2006) Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil, *Bioresource Technology* 97, 841-846.
80. J Xue, T-T Chen, J-W Zheng, S Balamurugan, Y-H Liu, W-D Yang, J-S Liu y H-Y Li. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from the Oleaginous Microalga *Nannochloropsis* Uncovers its Potential Role in Promoting Lipogenesis, *Biotechnology Journal* 0.
81. F Chen. (1996) High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth, *Trends in Biotechnology* 14, 421-426.
82. X-W Zhang, X-M Shi y F Chen. (1999) A kinetic model for lutein production by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic culture, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23, 503-507.
83. F Sun y H Chen. (2008) Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw, *Bioresource technology* 99, 5474-5479.
84. F Sun y H Chen. (2008) Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment, *Bioresource technology* 99, 6156-6161.
85. P C Giordano, A J Beccaria y H Goicoechea. (2011) Significant factors selection in the chemical and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues by a genetic algorithm analysis and comparison with the standard Plackett-Burman methodology, *Bioresource technology* 102, 10602-10610.

86. Y Li, Y-F Chen, P Chen, M Min, W Zhou, B Martinez, J Zhu y R Ruan. (2011) Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production, *Bioresource Technology* 102, 5138-5144.
87. WS Judd, CS Campbell, EA Kellogg, PFS Stevens y MJ Donoghue. (2002) Plant Systematics: A Phylogenetic Approach, In *Systematic Biology*, Sinauer Associates.
88. C Rioboo, J-E O'Connor, R Prado, C Herrero y A Cid. (2009) Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions, *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 94, 229-237.
89. Z Liang, Y Liu, F Ge, Y Xu, N Tao, F Peng y M Wong. (2013) Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*, *Chemosphere* 92, 1383-1389.
90. MC Posewitz. (2017) Algal oil productivity gets a fat bonus, *Nature biotechnology* 35, 636.
91. T Li, M Gargouri, J Feng, J-J Park, D Gao, C Miao, T Dong, DR Gang y S Chen. (2015) Regulation of starch and lipid accumulation in a microalga *Chlorella sorokiniana*, *Bioresource technology* 180, 250-257.
92. A Serrano, MI Mateos y M Losada. (1991) Differential regulation by trophic conditions of phosphorylating and non-phosphorylating NADP+-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in *Chlorella fusca*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 181, 1077-1083.
93. J Liu, J Huang, Z Sun, Y Zhong, Y Jiang y F Chen. (2011) Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production, *Bioresource Technology* 102, 106-110.
94. S Rasoul-Amini, N Montazeri-Najafabady, MA Mobasher, S Hoseini-Alhashemi y Y Ghasemi. (2011) *Chlorella* sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor, *Appl Energy* 88, 3354-3356.
95. J Yang, X Li, H Hu, X Zhang, Y Yu y Y Chen. (2011) Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga, *Chlorella ellipsoidea* YJ1, in domestic secondary effluents, *Appl Energy* 88, 3295 - 3299.
96. H Xu, X Miao y Q Wu. (2006) High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *Journal of Biotechnology* 126, 499-507.
97. C Hilgarth, N Sauer y W Tanner. (1991) Glucose increases the expression of the ATP/ADP translocator and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Chlorella*, *Journal of Biological Chemistry* 266, 24044-24047.
98. CV Piattoni, SA Guerrero y AA Iglesias. (2013) A differential redox regulation of the pathways metabolizing glyceraldehyde-3-phosphate tunes the production of reducing power in the cytosol of plant cells, *Int J Mol Sci* 14, 8073-8092.
99. Y Li, D Han, G Hu, D Dauvillee, M Sommerfeld, S Ball y Q Hu. (2010) *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol, *Metabolic Engineering* 12, 387-391.
100. Y Li, D Han, G Hu, M Sommerfeld y Q Hu. (2010) Inhibition of starch synthesis results in overproduction of lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biotechnology and Bioengineering* 107, 258-268.
101. MM Bradford. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
102. J Vaitukaitis, JB Robbins, E Nieschlag y GT Ross. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 33, 988-991.
103. J Folch, M Lees y GH Sloane Stanley. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *J Biol Chem* 226, 497-509.

104. PH Reibach y CR Benedict. (1982) Biosynthesis of Starch in Proplastids of Germinating *Ricinus communis* Endosperm Tissue, *Plant Physiol* 70, 252-256.
105. S Baud y IA Graham. (2006) A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using in situ histochemistry, *Plant J* 46, 155-169.
106. J Li y J Chory. (1998) Preparation of DNA from *Arabidopsis*, In *Arabidopsis Protocols* (JM Martinez-Zapater y J Salinas, Eds.), Humana Press, Totowa, NJ.
107. ST Cha, W Yee y A Aziz. (2012) Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*", *World J. Microbiol Biotechnol* 28, 1771-1779

108. C Fusari, AM Demonte, CM Figueroa, M Aleanzi y AA Iglesias. (2006) A colorimetric method for the assay of ADP-glucose pyrophosphorylase, *Anal Biochem* 352, 145-147.
109. AV Hill. (1990) The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves, *Proceedings of the Physiological* 40, 4-6.
110. AM Illman, AH Scragg y SW Shales. (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme and Microbial Technology* 27, 631-635.
111. Y Shen, W Yuan, ZJ Pei, Q Wu y E Mao (2009) *Microalgae Mass Production Methods*, Vol. 52.
112. E Sforza, R Cipriani, T Morosinotto, A Bertucco y GM Giacometti. (2012) Excess CO₂ supply inhibits mixotrophic growth of *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*, *Bioresource technology* 104, 523-529.
113. H Tang, M Chen, MED Garcia, N Abunasser, KYS Ng y SO Salley. (2011) Culture of microalgae *Chlorella minutissima* for biodiesel feedstock production, *Biotechnology and Bioengineering* 108, 2280-2287.
114. Y Zhang, H Su, Y Zhong, C Zhang, Z Shen, W Sang, G Yan y X Zhou. (2012) The effect of bacterial contamination on the heterotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from the production of soybean products, *Water Research* 46, 5509-5516.
115. K Mulchandani, JR Kar y RS Singhal. (2015) Extraction of Lipids from *Chlorella saccharophila* Using High-Pressure Homogenization Followed by Three Phase Partitioning, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 176, 1613-1626.
116. M Azma, MS Mohamed, R Mohamad, RA Rahim y AB Ariff. (2011) Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology, *Biochemical Engineering Journal* 53, 187-195.
117. Q Hu, M Sommerfeld, E Jarvis, M Ghirardi, M Posewitz, M Seibert y A Darzins. (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances, *Plant J* 54, 621-639.
118. A Converti, A Casazza, E Ortiz, P Perego y M Del Borghi. (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48, 1146-1151.
119. X Meng, J Yang, X Xu, L Zhang, Q Nie y M Xian. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renewable Energy* 34, 1-5.
120. TM Mata, AA Martins y NS Caetano. (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217-232.
121. S Mandal y N Mallick. (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production, *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 281-291.
122. A Widjaja, C-C Chien y Y-H Ju. (2009) Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 40, 13-20.

123. J Fan, K Ning, X Zeng, Y Luo, D Wang, J Hu, J Li, H Xu, J Huang, M Wan, W Wang, D Zhang, G Shen, C Run, J Liao, L Fang, S Huang, X Jing, X Su, A Wang, L Bai, Z Hu, J Xu y Y Li. (2015) Genomic Foundation of Starch-to-Lipid Switch in Oleaginous *Chlorella* spp, *Plant Physiol* 169, 2444-2461.
124. C Run, L Fang, J Fan, C Fan, Y Luo, Z Hu y Y Li. (2016) Stable nuclear transformation of the industrial alga *Chlorella pyrenoidosa*, *Algal Research* 17, 196-201.
125. CV Piattoni, SP Rius, DF Gomez-Casati, SA Guerrero y AA Iglesias. (2010) Heterologous expression of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*, *Biochimie* 92, 909-913.
126. MA Ballicora, AA Iglesias y J Preiss. (2004) ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis, *Photosynth Res* 79, 1-24.
127. J Petersen, H Brinkmann y R Cerff. (2003) Origin, Evolution, and Metabolic Role of a Novel Glycolytic GAPDH Enzyme Recruited by Land Plant Plastids, *Journal of Molecular Evolution* 57, 16-26.
128. J Eroles, B Gontero y SC Maberly. (2008) Specificity and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a freshwater diatom, *Asterionella formosa* (Bacillariophyceae), *Journal of Phycology* 44, 1455-1464.
129. S Fermani, A Ripamonti, P Sabatino, G Zanotti, S Scagliarini, F Sparla, P Trost y P Pupillo. (2001) Crystal structure of the non-regulatory A4 isoform of spinach chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with NADP11 Edited by R. Huber, *Journal of Molecular Biology* 314, 527-542.
130. J Eroles, M Mekhalfi, M Woudstra y B Gontero. (2011) Molecular Mechanism of NADPH-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Regulation through the C-Terminus of CP12 in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochemistry* 50, 2881-2888.
131. E Graciet, S Lebreton, J-M Camadro y B Gontero. (2003) Characterization of native and recombinant A4 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *European Journal of Biochemistry* 270, 129-136.
132. G Ferri, G Comerio, P Ladarola, MC Zapponi y ML Speranza. (1978) Subunit structure and activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach chloroplasts, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 522, 19-31.
133. AA Iglesias y M Losada. (1988) Purification and Kinetic and Structural Properties of Spinach Leaf NADP-Dependent Nonphosphorylating Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 260, 830-840.
134. II Chernyad'ev y OF Monakhova. (2006) Activity of NADP-dependent glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase in wheat leaves under water stress, *Applied Biochemistry and Microbiology* 42, 312-319.
135. Y-C Tien, P Chuankhayan, Y-C Huang, C-D Chen, J Alikhajeh, S-L Chang y C-J Chen. (2012) Crystal structures of rice (*Oryza sativa*) glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexes with NAD and sulfate suggest involvement of Phe37 in NAD binding for catalysis, *Plant Molecular Biology* 80, 389-403.
136. KH Maurer, F Pfeiffer, H Zehender y D Mecke. (1983) Characterization of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes from the pentalenolactone producer *Streptomyces arenae*, *Journal of bacteriology* 153, 930-936.
137. B Wolfson-Stofko, T Hadi y JS Blanchard. (2013) Kinetic and Mechanistic Characterization of the Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*, *Archives of biochemistry and biophysics* 540, 10.1016/j.abb.2013.1010.1007.
138. BLM Jarvis E. E. (1991) Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of green alga *Chlorella ellipsoidea*, *Curr Genet* 19, 317-321.
139. AHG Göbel E. (1985) Studies of *Chlorella* protoplasts. II. Isolation and fusión of protoplasts from *Chlorella saccharophila* (Krüger) nadson strain 211-1a*, *Plant Science* 39, 213-218.
140. KC Chow y WL Tung. (1999) Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*, *Plant Cell Reports* 18, 778-780.

141. D-H Kim, YT Kim, JJ Cho, J-H Bae, S-B Hur, I Hwang y T-J Choi. (2002) Stable Integration and Functional Expression of Flounder Growth Hormone Gene in Transformed Microalga, *Chlorella ellipsoidea*, *Marine Biotechnology* 4, 63-73.
142. O Kilian, CSE Benemann, KK Niyogi y B Vick. (2011) High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp., *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 21265-21269.
143. RH Wijffels y MJ Barbosa. (2010) An Outlook on Microalgal Biofuels, *Science* 329, 796-799.
144. SA Scott, MP Davey, JS Dennis, I Horst, CJ Howe, DJ Lea-Smith y AG Smith. (2010) Biodiesel from algae: challenges and prospects, *Current Opinion in Biotechnology* 21, 277-286.
145. E Stephens, IL Ross, JH Mussgnug, LD Wagner, MA Borowitzka, C Posten, O Kruse y B Hankamer. (2010) Future prospects of microalgal biofuel production systems, *Trends in Plant Science* 15, 554-564.
146. O Pulz y W Gross. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae, *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 635-648.
147. R Radakovits, RE Jinkerson, A Darzins y MC Posewitz. (2010) Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production, *Eukaryot Cell* 9, 486-501.
148. T Takeshita, K Takeda, S Ota, T Yamazaki y S Kawano. (2015) A Simple Method for Measuring the Starch and Lipid Contents in the Cell of Microalgae, *CYTOLOGIA* 80, 475-481.
149. H Abedini Najafabadi, M Malekzadeh, F Jalilian, M Vossoughi y G Pazuki. (2015) Effect of various carbon sources on biomass and lipid production of *Chlorella vulgaris* during nutrient sufficient and nitrogen starvation conditions, *Bioresource Technology* 180, 311-317.
150. MF Blair, B Kokabian y VG Gude. (2014) Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2, 665-674.
151. M Hultberg, AS Carlsson y S Gustafsson. (2013) Treatment of drainage solution from hydroponic greenhouse production with microalgae, *Bioresource Technology* 136, 401-406.
152. M Hultberg, L-E Olsson, G Birgersson, S Gustafsson y B Sievertsson. (2016) Microalgal growth in municipal wastewater treated in an anaerobic moving bed biofilm reactor, *Bioresource Technology* 207, 19-23.
153. Z Ikarán, S Suárez-Álvarez, I Urreta y S Castañón De La Torre (2015) *The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of Chlorella vulgaris var L3*, Vol. 10.
154. F Chu, J Cheng, X Zhang, Q Ye, S Chen, J Zhou y K Cen. (2019) Transcriptome and key gene expression related to carbon metabolism and fatty acid synthesis of *Chlorella vulgaris* under a nitrogen starvation and phosphorus repletion regime, *Journal of Applied Phycology* 31.
155. S Marchal y G Branlant. (2002) Characterization of the Amino Acids Involved in Substrate Specificity of Nonphosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from *Streptococcus mutans*, *The Journal of biological chemistry* 277, 39235-39242.
156. L Guo, F Ma, F Wei, B Fanella, D Allen y X Wang. (2014) Cytosolic Phosphorylating Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases Affect Arabidopsis Cellular Metabolism and Promote Seed Oil Accumulation, *Plant cell* 26, 3023-3035.
157. SS Merchant, SE Prochnik, O Vallon, EH Harris, SJ Karpowicz, GB Witman, A Terry, A Salamov, LK Fritz-Laylin, L Maréchal-Drouard, WF Marshall, LH Qu, DR Nelson, AA Sanderfoot, MH Spalding, VV Kapitonov, Q Ren, P Ferris, E Lindquist, H Shapiro, SM Lucas, J Grimwood, J Schmutz, P Cardol, H Cerutti, G Chanfreau, CL Chen, V Cognat, MT Croft, R Dent, S Dutcher, E Fernández, H Fukuzawa, D González-Ballester, D González-Halphen, A Hallmann, M Hanikenne, M Hippler, W Inwood, K Jabbari, M Kalanon, R Kuras, PA Lefebvre, SD Lemaire, AV Lobanov, M Lohr, A Manuell, I Meier, L Mets, M Mittag, T Mittelmeier, JV Moroney, J Moseley, C Napoli, AM Nedelcu, K Niyogi, SV Novoselov, IT Paulsen, G Pazour, S Purton, JP Ral, DM Riaño-Pachón, W Riekhof, L

- Rymarquis, M Schroda, D Stern, J Umen, R Willows, N Wilson, SL Zimmer, J Allmer, J Balk, K Bisova, CJ Chen, M Elias, K Gendler, C Hauser, MR Lamb, H Ledford, JC Long, J Minagawa, MD Page, J Pan, W Pootakham, S Roje, A Rose, E Stahlberg, AM Terauchi, P Yang, S Ball, C Bowler, CL Dieckmann, VN Gladyshev, P Green, R Jorgensen, S Mayfield, B Mueller-Roeber, S Rajamani, RT Sayre, P Brokstein, I Dubchak, D Goodstein, L Hornick, YW Huang, J Jhaveri, Y Luo, D Martínez, WC Ngau, B Otilar, A Poliakov, A Porter, L Szajkowski, G Werner, K Zhou, IV Grigoriev, DS Rokhsar y AR Grossman. (2007) The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions, *Science (New York, N.Y.)* 318, 245-250.
158. S Holtgreffe, J Gohlke, J Starmann, S Druce, S Klocke, B Altmann, J Wojtera, C Lindermayr y R Scheibe. (2008) Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications, *Physiologia Plantarum* 133, 211-228.
159. Z Mirko, F Simona, C Matteo, O Roberto, I Luisa, S Francesca, F Giuseppe, B Andrea y T Paolo. (2016) Tuning Cysteine Reactivity and Sulfenic Acid Stability by Protein Microenvironment in Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases of Arabidopsis thaliana, *Antioxidants & Redox Signaling* 24, 502-517.
160. CV Piattoni, DML Ferrero, I Dellaferrera, A Vegetti y AA Iglesias. (2017) Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated during Seed Development, *Frontiers in plant science* 8, 522.
161. JP Wynn, A Kendrick y C Ratledge. (1997) Sesamol as an inhibitor of growth and lipid metabolism in *Mucor circinelloides* via its action on malic enzyme, *Lipids* 32, 605-610.
162. Hawkins, Richard L. y M Nakamura. (1999) Expression of Human Growth Hormone by the Eukaryotic Alga, *Chlorella*, *Current microbiology* 38, 335-341.
163. K-W Kim, SC Bai, J-W Koo, X Wang y S-K Kim. (2002) Effects of Dietary *Chlorella ellipsoidea* Supplementation on Growth, Blood Characteristics, and Whole-Body Composition in Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*, *Journal of the World Aquaculture Society* 33, 425-431.
164. Ö Tokuşoğlu y MK üUnal. (2003) Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*, *Journal of Food Science* 68, 1144-1148.
165. K Tanaka, F Konishi, K Himeno, K Taniguchi y K Nomoto. (1984) Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, *Cancer Immunology Immunotherapy* 17, 90-94.
166. GZ Justo, MR Silva y MLS Queiroz. (2001) Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 23, 119-132.
167. MT Guarnieri, J Levering, CA Henard, JL Boore, MJ Betenbaugh, K Zengler y EP Knoshaug. (2018) Genome Sequence of the Oleaginous Green Alga, *Chlorella vulgaris* UTEX 395, *Front Bioeng Biotechnol* 6, 37-37.
168. E Bock y M Wagner. (2006) Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source, In *The Prokaryotes: Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry* (M Dworkin, S Falkow, E Rosenberg, K-H Schleifer y E Stackebrandt, Eds.), Springer New York, New York, NY.
169. A Hooper, T Vannelli, D Bergmann y D Arciero. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 59-67.
170. H Daims, S Lücker y M Wagner. (2016) A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria, *Trends in microbiology* 24, 699-712.
171. C Clark y EL Schmidt. (1967) Growth response of *Nitrosomonas europaea* to amino acids, *Journal of bacteriology* 93, 1302-1308.
172. A Krümmel y H Harms. (1982) Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria, *Archives of Microbiology* 133, 50-54.

173. H Martiny y H-P Koops. (1982) Incorporation of organic compounds into cell protein by lithotrophic, ammonia-oxidizing bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek* 48, 327-336.
174. AJ Smith y DS Hoare. (1977) Specialist phototrophs, lithotrophs, and methylophs: a unity among a diversity of procaryotes?, *Bacteriol Rev* 41, 419-448.
175. PS Rao y DJ Nicholas. (1966) Studies on the incorporation of CO₂ by cells and cell-free extracts of *Nitrosomonas europaea*, *Biochimica et biophysica acta* 124, 221-232.
176. I Schmidt. (2009) Chemoorganoheterotrophic growth of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrosomonas eutropha*, *Current microbiology* 59, 130-138.
177. AJ Smith y DS Hoare. (1968) Acetate assimilation by *Nitrobacter agilis* in relation to its "obligate autotrophy", *Journal of bacteriology* 95, 844-855.
178. AB Hooper, J Hansen y R Bell. (1967) Characterization of glutamate dehydrogenase from the ammonia-oxidizing chemoautotroph *Nitrosomonas europaea*, *The Journal of biological chemistry* 242, 288-296.
179. AP Wood, JP Aurikko y DP Kelly. (2004) A challenge for 21st century molecular biology and biochemistry: what are the causes of obligate autotrophy and methanotrophy?, *FEMS Microbiol Rev* 28, 335-352.
180. DJ Arp, PSG Chain y MG Klotz. (2007) The Impact of Genome Analyses on Our Understanding of Ammonia-Oxidizing Bacteria, *Annual review of microbiology* 61, 503-528.
181. X Wei, T Yan, NG Hommes, X Liu, L Wu, C McAlvin, MG Klotz, LA Sayavedra-Soto, J Zhou y DJ Arp. (2006) Transcript profiles of *Nitrosomonas europaea* during growth and upon deprivation of ammonia and carbonate, *FEMS Microbiology Letters* 257, 76-83.
182. Y-H Cho, S-D Yoo y J Sheen. (2006) Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling, *Cell* 127, 579-589.
183. B O Gvakharia, E Permina, M Gelfand, P J Bottomley, L A Sayavedra-Soto y D Arp. (2007) Global Transcriptional Response of *Nitrosomonas europaea* to Chloroform and Chloromethane, *Applied and environmental microbiology* 73, 3440-3445.
184. S Park y R Ely (2009) *Whole-genome transcriptional and physiological responses of Nitrosomonas europaea to cyanide*, Vol. 102.
185. TS Radniecki, CA Gilroy y L Semprini. (2011) Linking NE1545 gene expression with cell volume changes in *Nitrosomonas europaea* cells exposed to aromatic hydrocarbons, *Chemosphere* 82, 514-520.
186. T Yano, N Yoshida, F Yu, M Wakamatsu y H Takagi. (2015) The glyoxylate shunt is essential for CO₂-requiring oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4, *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 5627-5637.
187. S Shigeoka y Y Nakano. (1991) Characterization and molecular properties of 2-oxoglutarate decarboxylase from *Euglena gracilis*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288, 22-28.
188. S Zhang, X Qian, S Chang, GC Dismukes y DA Bryant. (2016) Natural and Synthetic Variants of the Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria: Introduction of the GABA Shunt into *Synechococcus* sp. PCC 7002, *Frontiers in Microbiology* 7, 1972.
189. J Tian, R Bryk, M Itoh, M Suematsu y C Nathan. (2005) Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of α -ketoglutarate decarboxylase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10670-10675.
190. L Sweetlove, K F.M. Beard, A Nunes-Nesi, A R Fernie y R Ratcliffe. (2010) Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle, *Trends in plant science* 15, 462-470.
191. F Ito, H Chishiki, S Fushinobu y T Wakagi. (2013) Archaeal Aldehyde Dehydrogenase ST0064 from *Sulfolobus tokodaii*, a Paralog of Non-Phosphorylating Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, Is a Succinate Semialdehyde Dehydrogenase, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77, 1344-1348.
192. WC Plaxton. (1996) The Organization and Regulation of Plant Glycolysis, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47, 185-214.

193. AA Iglesias, LR Vicario, DF Gómez-Casati, JI Sesma, ME Gómez-Casati, DM Bustos y FE Podestá. (2002) On the interaction of substrate analogues with non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from celery leaves, *Plant Science* 162, 689-696.
194. A Aroca, M Schneider, R Scheibe, C Gotor y LC Romero. (2017) Hydrogen Sulfide Regulates the Cytosolic/Nuclear Partitioning of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by Enhancing its Nuclear Localization, *Plant and Cell Physiology* 58, 983-992.
195. CV Piattoni, DML Ferrero, I Dellaferrera, A Vegetti y AÁ Iglesias. (2017) Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated during Seed Development, *Front Plant Sci* 8, 522-522.
196. DM Bustos y AA Iglesias. (2003) Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins, *Plant Physiol* 133, 2081-2088.
197. S Mukherjee, D Dutta, B Saha y AK Das. (2010) Crystal Structure of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase 1 from Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus MRSA252 Provides Novel Insights into Substrate Binding and Catalytic Mechanism, *Journal of Molecular Biology* 401, 949-968.
198. J Querol-García, FJ Fernández, AV Marin, S Gómez, D Fullà, C Melchor-Tafur, V Franco-Hidalgo, S Albertí, J Juanhuix, S Rodríguez de Córdoba, JR Regueiro y MC Vega. (2017) Crystal Structure of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from the Gram-Positive Bacterial Pathogen *A. vaginae*, an Immuno-evasive Factor that Interacts with the Human C5a Anaphylatoxin, *Frontiers in Microbiology* 8, 541.
199. S Kundu y D Roy. (2007) Computational Study of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase of *Entamoeba histolytica*: Implications for Structure-Based Drug Design, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 25, 25-33.
200. JA Kozłowski, KD Kits y LY Stein. (2016) Complete Genome Sequence of *Nitrosomonas ureae* Strain Nm10, an Oligotrophic Group 6a Nitrosomonad, *Genome Announcements* 4, e00094-00016.
201. CE Deutch. (2013) L-Malate dehydrogenase activity in the reductive arm of the incomplete citric acid cycle of *Nitrosomonas europaea*, *Antonie van Leeuwenhoek* 104, 645-655.
202. W Wallace, SE Knowles y DJ Nicholas. (1970) Intermediary metabolism of carbon compounds by nitrifying bacteria, *Archiv für Mikrobiologie* 70, 26-42.
203. T Wagner, M Bellinzoni, A Wehenkel, Helen M O'Hare y Pedro M Alzari. (2011) Functional Plasticity and Allosteric Regulation of α -Ketoglutarate Decarboxylase in Central Mycobacterial Metabolism, *Chemistry & Biology* 18, 1011-1020.
204. G Lei, X Wang, C Lai, Z-M Li, W Zhang, C Xie, F Wang, X Wu y Z Li. (2018) Expression and biochemical characterization of α -ketoglutarate decarboxylase from cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7002, *International journal of biological macromolecules* 114, 188-193.