

**Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Universidad de Córdoba**



**Caracterización y regulación fisiológica de
enzimas implicadas en la asimilación de
nitrógeno orgánico en *Prochlorococcus***

ORIOAL ALBERTO RANGEL ZÚÑIGA

Tesis Doctoral

Julio 2008

TITULO: *CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE ENZIMAS
IMPLICADAS EN LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO ORGÁNICO EN
PROCHLOROCOCCUS*

AUTOR: *ORIO ALBERTO RANGEL ZUÑIGA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2008
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-7801-916-8
D.L.: CO-1103-2008



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

D. JESÚS DIEZ DAPENA, Dr. en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, y D. JOSÉ MANUEL GARCÍA FERNÁNDEZ, Dr. en Ciencias Biológicas y Profesor contratado doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba.

INFORMAN:

Que el trabajo "CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO ORGÁNICO EN *Prochlorococcus*" realizado bajo nuestra dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Julio de 2007

Fdo.: Jesús Diez Dapena

Fdo.: José Manuel García Fernández



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

D. JOSÉ ANTONIO BÁRCENA RUÍZ, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba,

INFORMA:

Que el trabajo "CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO ORGÁNICO EN *Prochlorococcus*" realizado por D. Oriol Alberto Rangel Zúñiga bajo la dirección del Prof. Jesús Diez Dapena y el Dr. José Manuel García Fernández, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Julio de 2007

Fdo.: José Antonio Bárcena Ruíz

**CARACTERIZACIÓN Y REGULACIÓN FISIOLÓGICA DE ENZIMAS
IMPLICADAS EN LA ASIMILACIÓN DE NITRÓGENO EN
*Prochlorococcus***

Trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, para optar al grado de Doctor en Microbiología por el licenciado

Oriol Alberto Rangel Zúñiga

Córdoba, Julio de 2008

DIRECTORES

JESÚS DIEZ DAPENA

Dr. en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

JOSÉ MANUEL GARCÍA FERNÁNDEZ

Dr. en Ciencias Biológicas y Profesor contratado doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba

TABLA DE CONTENIDO

| | <i>Pág</i> |
|--|------------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. EL OCÉANO | 3 |
| 1.1 Generalidades | 3 |
| 1.2 El agua de mar | 3 |
| 1.2.1 Salinidad del agua de mar | 4 |
| 1.3 Estructura geofísica del océano | 5 |
| 1.4 Estructura térmica del océano | 6 |
| 1.5 La luz en el océano | 8 |
| 1.6 Distribución oceánica de los nutrientes | 9 |
| 1.6.1 El carbono | 10 |
| 1.6.2 El nitrógeno | 10 |
| 1.6.3 Fósforo | 13 |
| 1.6.4 Hierro | 13 |
| 2. EL PLANCTON | 14 |
| 3. LAS CIANOBACTERIAS MARINAS | 16 |
| 4. EL GÉNERO <i>Prochlorococcus</i> | 17 |
| 4.1 Tamaño y estructura | 18 |
| 4.2 Aparato fotosintético | 19 |
| 4.3 Distribución oceánica | 21 |
| 4.4. Características génicas | 24 |
| 5. METABOLISMO DEL NITRÓGENO | 25 |
| 5.1 Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias | 26 |
| 5.2 Metabolismo del nitrógeno en <i>Prochlorococcus</i> | 30 |
| 6. EL CIANATO COMO FUENTE DE NITRÓGENO Y LA CIANASA | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 7. LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA | 37 |
| 7.1 Características generales de la glutamato deshidrogenasa | 37 |
| 7.2 Distribución de la glutamato deshidrogenasa | 40 |
| 7.3 Función de la glutamato deshidrogenasa | 40 |
| 7.4 Glutamato deshidrogenasa en cianobacterias | 43 |
| OBJETIVOS | 46 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 50 |
| 1. MATERIAL BIOLÓGICO | 52 |
| 2. CONDICIONES DE CULTIVO | 52 |
| 2.1 Medio de cultivo | 52 |
| 2.1.1 PCR-S11 | 52 |
| 2.2 Métodos Standard de cultivo y mantenimiento de estirpes | 53 |
| 2.3 Medios y condiciones especiales de cultivo | 55 |
| 2.3.1 Crecimiento en cianato como fuente de nitrógeno | 55 |
| 2.3.2 Efecto de inhibidores | 56 |
| 2.3.3 Efecto de la ausencia de nutrientes | 56 |
| 2.3.4 Utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno | 57 |
| 2.4 Crioconservación de estirpes de <i>Prochlorococcus</i> | 57 |
| 3. MÉTODOS DE RECOGIDA DE CÉLULAS | 58 |
| 4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS | 58 |
| 4.1 Rotura celular en prensa de French | 58 |
| 4.2 Rotura celular con perlas de vidrio | 59 |
| 5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS | 60 |
| 5.1 Medida del crecimiento en <i>Prochlorococcus</i> | 60 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 Medida del espectro de fluorescencia de cultivos de <i>Prochlorococcus</i> | 60 |
| 5.3 Cuantificación de proteína | 61 |
| 5.4 Cuantificación de amonio en cultivos y agua de mar | 61 |
| 5.5. Determinación de la concentración de cianato en cultivos | 62 |
| 5.6 Determinaciones enzimáticas | 63 |
| 5.6.1 Determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa aminante | 63 |
| 5.6.2 Determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa desaminante | 64 |
| 5.6.3 Determinación de actividad cianasa | 64 |
| 5.6.4 Análisis de cultivos de <i>Prochlorococcus</i> mediante citometría de flujo | 65 |
| 6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS | 66 |
| 6.1 Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes | 66 |
| 6.2 Tinción de proteínas en geles de acrilamida | 68 |
| 6.3 Análisis de proteínas mediante <i>Western blotting</i> | 69 |
| 6.3.1 Electrotransferencia de proteínas | 69 |
| 6.3.1.1 Electrotransferencia húmeda | 69 |
| 6.3.1.2 Transferencia semiseca | 69 |
| 6.3.2 Sistema de revelado | 70 |
| 6.3.2.1 Revelado mediante fosfatasa alcalina | 70 |
| 6.3.2.2 Revelado con peroxidasa | 71 |
| 6.4 Cuantificación de la intensidad de banda | 72 |

7. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ACIDOS

| | |
|---|-----------|
| NUCLÉICOS | 72 |
| 7.1 Aislamiento de ADN genómico de <i>Prochlorococcus</i> | 72 |
| 7.1.1 Volúmenes pequeños de cultivo | 72 |
| 7.1.2 Grandes volúmenes de cultivo | 74 |
| 7.2 Aislamiento de ARN total de <i>Prochlorococcus</i> | 75 |
| 7.3 Cebadores | 75 |
| 7.3.1 Diseño de cebadores | 75 |
| 7.3.2 Cebadores para la amplificación del gen <i>cynS</i> de <i>Prochlorococcus</i> PCC 9511 | 76 |
| 7.3.3 Cebadores para la amplificación del gen <i>gdhA</i> de <i>Prochlorococcus</i> MIT9313 | 76 |
| 7.3.4 Cebadores para los estudios de expresión del gen <i>cynS</i> de la estirpe PCC 9511 | 77 |
| 7.3.5 Cebadores para los estudios de expresión en <i>Prochlorococcus</i> MIT9313 | 77 |
| 7.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 78 |
| 7.5 RT-PCR semicuantitativa en tiempo real | 79 |
| 7.5.1 Transcripción inversa | 79 |
| 7.5.2 PCR en tiempo real | 79 |
| 7.5.3 Análisis de resultados | 81 |
| 7.5.4 Determinación de la eficiencia de los cebadores | 81 |
| 7.6 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa | 82 |
| 7.7 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa y productos de PCR | 83 |

| | |
|--|-----------|
| 7.8 Secuenciación de ADN | 83 |
| 7.9 Análisis informático de secuencias | 84 |
| 8. CLONACIÓN Y SOBREEXPRESIÓN EN SISTEMAS HETERÓLGOS | 84 |
| 8.1 Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas | 84 |
| 8.2 Condiciones y medio de cultivo | 86 |
| 8.2.1 Luria Bertani (LB) | 86 |
| 8.2.2 Medio de expresión 2XYTA | 86 |
| 8.2.3 Condiciones de cultivo y conservación de estirpes de <i>E. coli</i> | 87 |
| 8.3 Vectores de clonación | 87 |
| 8.3.1 pGEM-T easy vector | 87 |
| 8.3.2 Vector pGEX-4T-1 | 88 |
| 8.4 Aislamiento y manipulación de ADN | 89 |
| 8.4.1 Aislamiento de purificación de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> | 89 |
| 8.4.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción | 89 |
| 8.4.3 Fosforilación de insertos | 90 |
| 8.4.4 Desfosforilación de extremos plasmídicos | 90 |
| 8.4.5 Ligaciones | 90 |
| 8.4.5.1 Vector pGEM-T easy | 90 |
| 8.4.5.2 Vector pGEX-4T-1 | 91 |
| 8.5 Métodos de transferencia de ADN | 92 |
| 8.5.1 Preparación de células competentes | 92 |
| 8.5.2 Transformación de células competentes | 93 |
| 8.5.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> HB101 utilizando el vector pGEM-T easy | 93 |

| | |
|--|------------|
| 8.5.2.2 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 utilizando el vector pGEX-4T-1 | 94 |
| 8.6 Análisis de colonias transformantes | 94 |
| 8.7 Condiciones de expresión en cultivos | 95 |
| 9. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN | 96 |
| 9.1 Purificación en columna de glutatión agarosa | 96 |
| 9.2 Proteolisis de la GDH+GST utilizando trombina | 97 |
| 9.3 Purificación de glutamato deshidrogenasa a partir de geles de acrilamida | 97 |
| 10. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE ANTICUERPOS | 97 |
| 10.1 Homogenización del antígeno con adyuvante de Freund | 97 |
| 10.2 Protocolo de inmunización | 98 |
| 10.3 Extracción de sangre | 99 |
| 10.4 Purificación parcial de anticuerpos | 99 |
| 10.5 Optimización del <i>Western blotting</i> para la detección de la glutamato deshidrogenasa | 100 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 102 |
| 1. LA CIANASA DE <i>Prochlorococcus</i> PCC 9511 | 104 |
| 1.1 Detección de actividad cianasa | 104 |
| 1.2 Cultivo de <i>Prochlorococcus</i> PCC 9511 en presencia de cianato | 106 |
| 1.3 Actividad cianasa en cultivos de PCC 9511 crecidos en presencia de cianato | 109 |
| 1.4 Amplificación del gen <i>cynS</i> | 110 |

| | |
|---|------------|
| 2. GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE <i>Prochlorococcus</i> MIT9313 | 111 |
| 2.1 Rotura celular para la obtención de extractos crudos | 111 |
| 2.1.1 Rotura celular mediante congelación y descongelación | 111 |
| 2.1.2 Rotura celular mediante prensa de French | 112 |
| 2.1.3 Rotura celular mediante perlas de vidrio | 112 |
| 2.2 Detección y caracterización de la actividad NADP-GDH de <i>Prochlorococcus</i> | 113 |
| 2.2.1 Detección de la actividad NADPH-GDH | 113 |
| 2.2.2 Optimización del ensayo enzimático | 115 |
| 2.2.2.1 Actividad GDH en el sentido aminante | 115 |
| 2.2.2.2 Actividad GDH en el sentido desaminante | 118 |
| 2.3 Caracterización de la actividad NADP(H)-GDH | 120 |
| 2.3.1 Caracterización del ensayo enzimático | 120 |
| 2.3.2 Actividad aminante vs desaminante | 121 |
| 2.3.3 Determinación de la temperatura óptima para la actividad GDH | 122 |
| 2.3.4 Determinación de pH óptimo | 123 |
| 2.3.5 Determinación de las constante de Michaelis-Menten (K_m) para los sustratos de la actividad glutamato deshidrogenasa | 125 |
| 2.4 Optimización de la determinación de la expresión génica por qRT-PCR en tiempo real | 130 |
| 2.4.1 Cálculo de la eficiencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen <i>gdhA</i> de <i>Prochlorococcus</i> MIT9313 | 130 |
| 2.4.2 Cálculo de la eficiencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen <i>mpB</i> de <i>Prochlorococcus</i> MIT9313 | 131 |

| | |
|---|------------|
| 2.5 Amplificación y clonación del gen <i>gdhA</i> de <i>Prochlorococcus</i> | |
| MIT9313 | 133 |
| 2.5.1 Amplificación del gen <i>gdhA</i> de <i>Prochlorococcus</i> MIT9313 | 133 |
| 2.5.2 Clonación del gen <i>gdhA</i> | 135 |
| 2.5.2.1 Clonación en el vector pGEM-T | 135 |
| 2.5.2.2 Clonación en el vector de expresión pGEX-4T-1 | 136 |
| 2.6 Sobreexpresión y purificación de la GDH de <i>Prochlorococcus</i> | |
| MIT9313 | 139 |
| 2.7 Obtención de anticuepos anti-GDH de <i>Prochlorococcus</i> | 142 |
| 2.8 Regulación fisiológica de la GDH de <i>Prochlorococcus</i> MIT9313 | 143 |
| 2.8.1 Efecto de la adición de inhibidores específicos | 144 |
| 2.8.1.1 Efecto del MSX | 144 |
| 2.8.1.2 Efecto de la azaserina sobre la GDH | 147 |
| 2.8.1.3 Efecto del estado energético de los cultivos | 150 |
| 2.8.2 Efecto de la ausencia de nutrientes | 153 |
| 2.8.3 Efecto de la edad del cultivo | 157 |
| 2.8.4 Utilización de glutamato como fuente de nitrógeno | 160 |
| 3. VISION GLOBAL | 162 |
| CONCLUSIONES | 168 |
| BIBLIOGRAFÍA | 172 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| ° | Grado terrestre de longitud o latitud |
| °C | Grado centígrado |
| 2-OG | 2-oxoglutarato |
| AA | Aminoácidos |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNasa | Desoxirribonucleasa |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico copia (retrotranscrito) |
| AMP | Adenosina 5'-monofosfato |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNasa | Ribonucleasa |
| ATP | Adenosina 5'-trifosfato |
| BCIP | 5-bromo 4-cloro 3'indolfosfato sal de toluidina |
| C/N | Relación carbono y nitrógeno |
| Chla ₂ | Clorofila a ₂ |
| Chlb ₂ | Clorofila b ₂ |
| CIAP | Fosfatasa alcalina de intestino de ternera |
| CNO ⁻ | Cianato |
| Ct | Ciclo umbral |
| Da | Daltons |
| DCAA | Aminoácidos en disolución de forma combinada |
| DCMU | 3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimeltiurea |
| DBMIB | 2,5 – Dibromo-3-metil-6-isopropil-p-benzoquinona |
| DFAA | Aminoácidos en disolución de forma libre |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| dNTP | Desoxinucleósido-5'-trifosfato |
| DON | Nitrógeno orgánico disuelto |
| DTT | Ditiotreitol (treo-1,4-dimercapto-2,3-ditiol) |
| E | Eficiencia de amplificación |
| EDTA | Ácido etilén-diamino-tetracético |
| <i>g</i> | Aceleración de la gravedad terrestre |
| GDH | Glutamato deshidrogenasa |
| GOGAT | Glutamato sintasa |
| GS | Glutamina sintetasa |

| | |
|-------------------|--|
| GST | Glutación transferasa |
| HEPES | Ácido 2-[4-(hidroxietil)-1-piperacínil]-etanosulfónico |
| HNCO | Isocianato |
| IDH | Isocitrato deshidrogenasa |
| IPTG | Isopropil- β -D-tiogalactósido |
| Kb | Kilo bases |
| Kpb | Kilo pares de bases |
| K _m | Constante de Michaelis y Menten |
| KDa | Kilodaltons |
| LB | Medio de cultivo Luria Bertani |
| LBA | Placas de agar Luria Bertani |
| LBG | Medio de cultivo Luria Bertani con glucosa |
| LBGA | Placas de agar Luria Bertani con glucosa |
| mA | Miliamperio |
| mU | Mili unidad de actividad enzimática |
| Mb | Mega bases |
| MIT | Instituto Tecnológico de Massachussets |
| MOPS | Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico |
| MSX | L-metionina- D,L-sulfoximina |
| N | Normal |
| NAD ⁺ | Nicotín adenín difosfato oxidado |
| NADP ⁺ | Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado |
| NADH | Nicotín adenín dinucleótido reducido |
| NADPH | Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido |
| Nar | Nitrato reductasa |
| NBT | Nitroazul de tetrazolio |
| Nir | Nitrito reductasa |
| PI | Fotosistema I |
| PII | Fotosistema II |
| PCC | Colección de cultivos del Instituto Pasteur |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetano sulfanico |
| psi | Libra por pulgada al cuadrado (1 atm=14,6956 psi) |
| p/v | Relación peso a volumen |

| | |
|--------------|--|
| RT-PCR | Transcripción inversa seguida de PCR |
| SDS | dodecil sulfato sódico |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS |
| SNI | Suero no inmune |
| TBE | Tampón Tris/Borato/EDTA |
| TE | Tampón Tris/EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina |
| Tris base | tris-(hidroximetil)-amino metano |
| Tritón X-100 | octil fenol etoxilato |
| TSS | Tampón para la resuspensión de células competentes |
| Tween 20 | Polioxietilén sorbitan monolaurato |
| U.V. | Ultravioleta |
| V | Voltios |
| V_{MAX} | Velocidad máxima de la reacción |
| v/v | Relación volumen a volumen |

BASES NITROGENADAS

| | |
|---|----------|
| A | Adenina |
| C | Citosina |
| G | Guanina |
| T | Timina |

INTRODUCCIÓN

1. EL OCÉANO

1.1 Generalidades

Se denomina océano a la parte de la superficie de la Tierra ocupada por el agua marina. En esta gran inmensidad de agua habitan una cantidad considerable de especies y ocurren fenómenos que regulan el clima de la tierra. En nuestro planeta los océanos con profundidades de más de 200 m abarcan 332 millones de Km² y las aguas continentales con profundidades menores de 200 m ocupan otros 28 millones de Km² de la superficie terrestre. Comparado con el área ocupada por los continentes, islas e islotes supone el 70 % del área total de la tierra. Las aguas oceánicas alcanzan una profundidad media de 4 Km que pueden llegar hasta los 11 Km como por ejemplo en la fosa de las Marianas.

1.2 El agua de mar

El agua de mar es el constituyente principal de los océanos, contiene diversidad de elementos en disolución dentro de los cuales los más abundantes son el sodio y el cloro que se combinan para formar el cloruro sódico. También se puede encontrar magnesio, calcio y potasio, juntos constituyen aproximadamente el 90% de los elementos presentes en el agua marina. Además se pueden encontrar en menor concentración otros elementos que se describen en la tabla 1.

Aunque la composición del agua de mar es siempre la misma, la concentración de cada uno de sus componentes es variable en función de la zona o el área que ocupa dicha agua. La concentración total de estos componentes confiere al agua marina la salinidad.

Tabla 1. Elementos presentes en el agua de mar (adaptado de Odum, 1985)

| Elemento | g/Kg de agua |
|-----------------|---------------------|
| Cloro | 19,3 |
| Sodio | 10,7 |
| Sulfato | 2,7 |
| Magnesio | 1,3 |
| Bicarbonato | 0,1 |
| Calcio | 0,4 |
| Potasio | 0,4 |
| Bromuro | 0,07 |

1.2.1 Salinidad del agua de mar

La salinidad media del agua de mar es de 35 gramos por kilogramo de agua. Está determinada por las diferentes latitudes terrestres y distintas profundidades marinas. Así por ejemplo, existirá una salinidad más elevada en zonas donde la evaporación de agua es mayor como en las latitudes tropicales y en aguas superficiales.

A su vez, la salinidad influye en la densidad del agua marina, el aumento de la salinidad provoca un incremento en la densidad del agua. Así, cuanto más densa sea el agua más tendencia tendrá a precipitarse al fondo marino y cuanto menos densa subirá a la superficie, de esta forma se crea un ciclo de intercambio de agua en el océano.

También existe una relación entre la salinidad y la profundidad, la cual puede representarse en tres capas: capa *homohalina* donde la salinidad se encuentra entre 36 y 37 g/Kg de agua, la siguiente capa es la *haloclina* en la cual existe una disminución rápida de la salinidad hasta una media de 34 g/kg de agua, y finalmente

bajo esta capa intermedia se encuentran concentraciones poco variables de entre 34,5 y 35 g/Kg de agua (King, 1967).

1.3 Estructura geofísica del océano

En el océano se pueden distinguir dos grandes zonas: el **dominio bentónico** (figura 1) lo constituyen las costas y fondos marinos, se puede dividir en: ❶ *plataforma continental*, es la más próxima a los continentes y donde se desarrolla gran cantidad de especies marinas. Puede llegar hasta los 200 m de profundidad donde ocurre un cambio brusco de la pendiente para formar el *talud continental* ❷, que se extiende hasta los 3.000 m bajo el nivel del mar. Por debajo del talud continental se encuentra la *zona abisal o llanura abisal* ❸ que se caracteriza por una pendiente muy suave, constituye cerca del 40 % del fondo marino y su profundidad oscila entre los 2.200 y los 6.000 m. A continuación, se encuentran las *fosas hadales u oceánicas* ❹, las cuales son zonas deprimidas y alargadas del fondo marino donde la profundidad aumenta llegando hasta los 11 Km bajo el nivel del mar.

El **dominio pelágico** (figura 2) lo constituye la masa acuosa o columna de agua y puede dividirse en, *zona epipelágica* ubicada desde la costa hasta los 200 m de profundidad, *zona mesopelágica* ubicada desde los 200 m hasta los 1.000 m, *zona batipelágica* la cual abarca desde los 1.000 m hasta los 3.000 m. La siguiente zona es la llamada *abisopelágica o abisal* que comprende desde los 3.000 metros hasta los 6.000 metros. Finalmente las grandes fosas oceánicas, con profundidades desde los 6.000 metros hasta los 11.000 metros, conocida también como *zona hadalopelágica o hadal*.

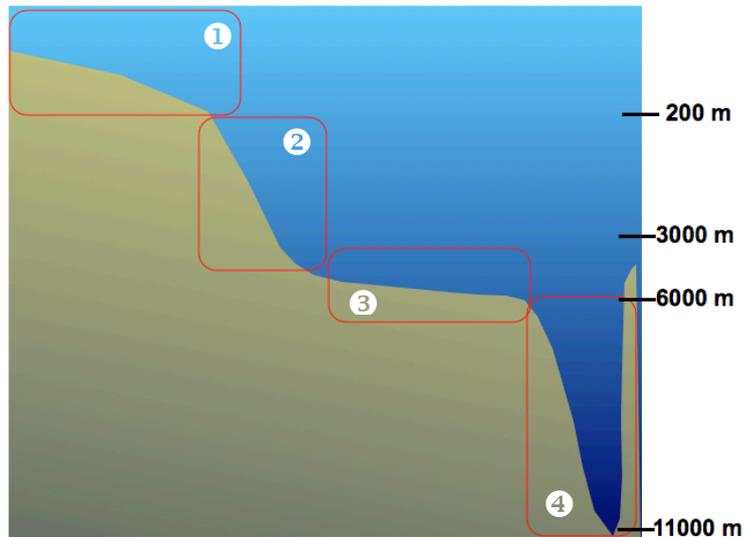


Figura 1. Dominio bentónico del océano

1.4 Estructura térmica del océano

La temperatura influye en el ecosistema marino dado que es determinante para el desarrollo de las distintas especies marinas, y para que se lleven a cabo procesos como las corrientes marinas que distribuirán a lo largo de la columna de agua dichas especies.

La estructura térmica del océano (figura 3) se describe por un sistema de 3 capas, la primera capa es denominada *superficial*, ubicada desde la superficie hasta los 500 metros de profundidad, se encuentra expuesta a la radiación solar durante todo el año en latitudes bajas y medias, y la temperatura oscila entre los 20 y los 25°C con variaciones mínimas.

A la siguiente capa se le conoce como *termoclina*, en esta zona la temperatura experimenta un descenso brusco en función de la profundidad, desde los 500 metros a los 1.000 metros. La temperatura al final de la *termoclina* es aproximadamente 5°C. La última zona es conocida como *capa inferior*, en la cual la temperatura disminuye desde los 5°C hasta 1°C a 4.000 metros de profundidad.

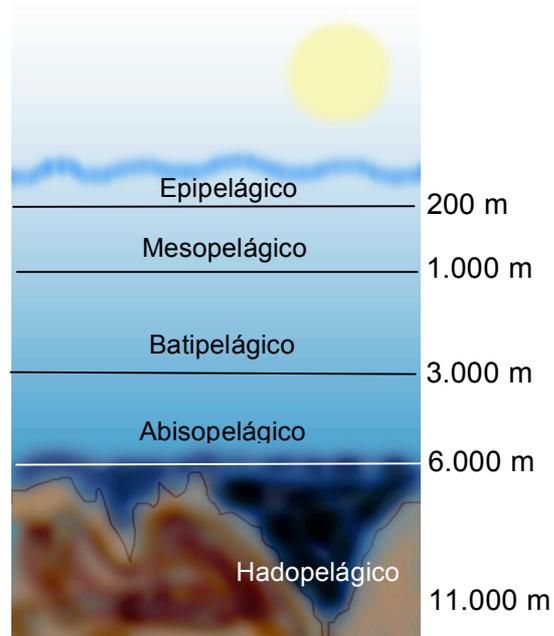


Figura 2. Dominio pelágico del océano

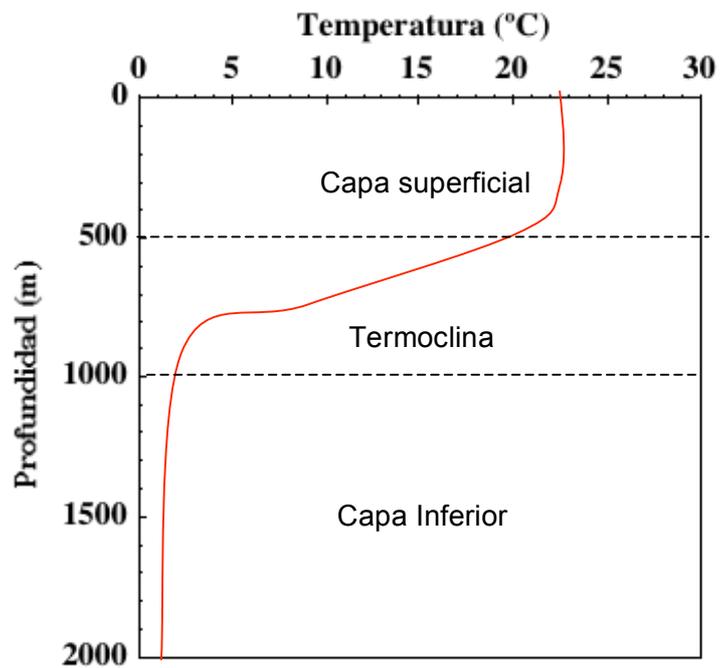


Figura 3. Estructura térmica del océano

1.5 La luz en el océano

La luz es un elemento fundamental para el desarrollo del ecosistema marino por que proporciona energía a los organismos fotosintéticos los cuales son la base en la cadena trófica. El factor condicionante más importante para el desarrollo de la vida marina es la penetración de la luz (García-Pichel, 1998). La propagación de la luz en el océano depende de las propiedades fisicoquímicas del agua y de las características físicas de la luz. Dentro de los factores fisicoquímicos del agua encontramos *la turbidez*, determinada por la presencia de materia en suspensión, *la transparencia*, que se refiere a la cantidad de luz que se transmite en el agua y *la absorción*, es decir la cantidad de luz retenida en la misma. La luz tras incidir en la superficie marina y penetrar en el océano, exhibe un patrón de absorción (figura 4) en el que se puede observar como las longitudes de onda situadas en la zona de los naranjas y rojos se absorben hasta una profundidad entre los 5 y 10 m. A continuación los U.V. y los verdes se absorben hasta los 60 o 100 m, y finalmente la zona azul del espectro incide hasta aproximadamente los 200 m. En función de la incidencia de la luz en el agua marina se pueden distinguir dos zonas: la zona eufótica que se extiende desde la superficie hasta una profundidad de 200 metros en aguas cristalinas de los océanos intertropicales en donde se pierde el 99% de la energía de la luz incidente.

La siguiente zona es la afótica, que abarca desde los 200 metros hasta los fondos marinos donde la cantidad de luz que penetra es insignificante.

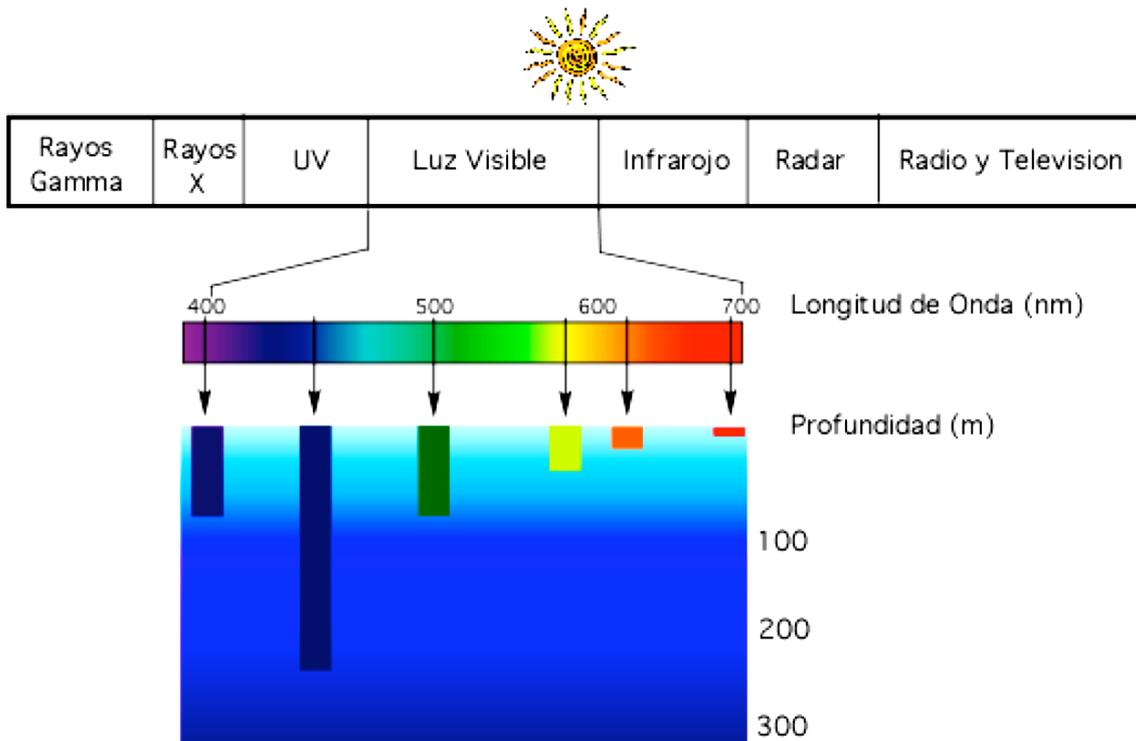


Figura 4. Penetración de la luz en el océano. (Adaptado de imagen obtenida en <http://daac.gsfc.nasa.gov/oceancolor/scifocus/oceanColor/oceanblue.shtml>)

1.6 Distribución oceánica de los nutrientes

En los océanos de nuestro planeta se requieren nutrientes básicos para el completo desarrollo de la vida marina. Dichos nutrientes, también llamados macronutrientes, se encuentran distribuidos en la columna de agua a concentraciones que varían en función del espacio, el tiempo y efectos físicos como las corrientes marinas. Los nutrientes son más abundantes en zonas costeras dada la cercanía a la desembocadura de los ríos y centros urbanos. En aguas más profundas la concentración de nutrientes disminuye hasta niveles donde la disponibilidad es mínima. Los nutrientes necesarios para el desarrollo del *plancton* marino son el carbono, el nitrógeno, el fósforo y el hierro, no obstante la concentración de cada uno de ellos es diferente. En 1934 Alfred C. Redfield, oceanógrafo americano, publicó la relación normal entre el carbono, el nitrógeno y el fósforo en el fitoplancton (Redfield, 1934). La relación de *Redfield* propone una afinidad entre la

química del agua de mar y la química de los organismos que la habitan. También que el *plancton* marino posee una composición elemental fija, donde por cada 106 átomos de carbono, presentes en un organismo planctónico, existen 16 de nitrógeno y 1 de fósforo (Arrigo, 2005). Sin embargo en recientes investigaciones se ha demostrado que dicha relación no es una condición bioquímica universal (Klausmeier *et al.*, 2004), dado que varía en función de diferentes aspectos como la profundidad, las corrientes marinas, el clima, la densidad del agua, la solubilidad, y las diversas especies que habitan en el océano.

1.6.1 El carbono

El carbono es un elemento fundamental para la síntesis de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las formas principales de carbono en el mar son el anhídrido carbónico, los carbonatos y los bicarbonatos. La importancia de estos compuestos es muy amplia para el desarrollo de la vida marina, debido a que el CO₂ es fundamental en el proceso de fotosíntesis y los carbonatos y bicarbonatos son esenciales para la formación de los esqueletos de los animales en el mar.

1.6.2 El nitrógeno

El nitrógeno junto con el fósforo y el hierro, son determinantes para la producción primaria, ya que se han considerado como los elementos limitantes de la misma en los océanos del mundo (Howarth, 1988; Capone, D.G., 2000; Arrigo, 2005). El nitrógeno es un elemento clave en la vida de la Tierra y se encuentra en diferentes formas y estados en la biosfera. En la tabla 2 se muestran las diferentes fuentes de nitrógeno en el mar. El mayor reservorio de nitrógeno en el océano es el nitrógeno disuelto (N₂), y las principales formas de nitrógeno inorgánico combinado no

gaseoso son el nitrato, el nitrito y el amonio. El nitrato llega al océano por deposición atmosférica, descarga de aguas subterráneas o por arrastre desde las riveras y cauces de los ríos. La concentración de nitrato en aguas cercanas a la *termoclina* se encuentra entre los 20 y 40 μM , manteniéndose constante a partir de los 600 m de profundidad (Bruland, 1980).

Tabla 2. Principales fuentes de nitrógeno en el océano

(Tomado de Capone, et al. 2000)

| FORMULA | FORMA | CONCENTRACIÓN (μM) | |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| | | Oceánica | Costera |
| <i>Gases</i> | | | |
| N_2 | Nitrógeno molecular | 900 - 1100 | 900 - 1100 |
| N_2O | Óxido nitroso | 0.006 - 0.007 | 0 - 0,25 |
| NO | Óxido nítrico | ? | ? |
| <i>Inorgánico</i> | | | |
| NO_3 | Nitrato | <0,03 - >40 | < 0,1 – 200 |
| NO_2 | Nitrito | <0,03 – 0,1 | <0,03 – 10 |
| NH_4 | Amonio | <0,03 – 1 | <0,03 - >100 |
| $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ | Urea | <0,1 – 0,5 | 0 - >2 |
| <i>Orgánico</i> | | | |
| DON | | | |
| (Nitrógeno orgánico disuelto) | Nitrógeno orgánico disuelto | 3 – 7 | 3 – 20 |
| | Aminoácidos disueltos o combinados | 0,15 – 1,5 | 0,12 – 6,6 |

El nitrito generalmente se encuentra en concentraciones mucho mas bajas, la cantidad máxima de nitrito en el océano abierto se encuentra cerca de la base de la zona eufótica y es generalmente asociada con la reducción asimilatoria de nitrato (Capone, D.G., 2000).

El amonio también varía ampliamente en cuanto a concentración y distribución. En zonas oligotróficas las concentraciones de amonio son normalmente bajas, están cerca del límite de detección por métodos colorimétricos convencionales ($< 0,03 \mu\text{M}$). En muchos ambientes oceánicos abiertos no existe una relación entre la concentración de amonio y la profundidad, es decir la distribución de amonio no presenta cambios significativos a lo largo de la columna de agua (Capone, D.G., 2000). Sin embargo, en áreas donde la cantidad de oxígeno es mínima o nula los niveles de amonio aumentan. La concentración de amonio en la zona litoral puede aumentar o disminuir dependiendo de los vertidos de aguas residuales de núcleos urbanos e industrias.

En cuanto a las formas de nitrógeno orgánico en disolución (DON) podemos encontrar aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas y oligopéptidos. El nitrógeno orgánico en disolución puede ser una fuente fundamental de nitrógeno en las zonas costeras donde la concentración puede alcanzar entre 3 y 20 μM , y en el océano abierto de 3 a 7 μM (Sharp, 1983; McCarthy *et al.*, 1997). Los aminoácidos son un importante constituyente del DON en ambientes marinos, y una fuente principal de nitrógeno para el fitoplancton que habita en la zona fótica. Los aminoácidos se pueden encontrar de forma libre (DFAA), a concentraciones de 0,04 a 1,06 μM (Chapman *et al.*, 1988), o de forma combinada (DCAA) junto a pequeñas proteínas y péptidos, azúcares, y absorbidos en ácidos húmico y fúlvico (Lytle & Perdue, 1981). Experimentos realizados mediante espectrometría de masas indican la presencia en agua de mar de alanina (49,40 nM), y Leucina (22,21 nM), entre otros (Sommerville & Preston, 2001). Existen otras fuentes menos comunes de nitrógeno como la urea y otras que pueden ser dañinas para el hombre como el cianato, una de las formas tóxicas de cianuro. El cianato puede formarse por descomposición no

enzimática de la urea y foto-oxidación del cianuro (Hagel *et al.*, 1971). Hasta el momento no se ha descrito la distribución y concentración de cianato en el mar, sin embargo se han realizado experimentos en los que la cianobacteria *Synechococcus*, puede utilizar dicho elemento como fuente de nitrógeno (Miller & Espie, 1994).

1.6.3 Fósforo

El fósforo es un elemento primordial para la vida, teniendo en cuenta que es fundamental para la formación de moléculas como el ADN y ARN. También se hace presente en el metabolismo ya que forma parte del ATP, molécula proveedora de energía. Este importante bioelemento llega a los océanos principalmente desde los ríos por deposición de fósforo atmosférico que es soluble en agua. En los océanos del mundo la media en el contenido de fósforo es de 70 a 72 µg/L (Baturin, 2003) y se encuentra en forma de fosfatos que pueden ser de sodio o de magnesio. La concentración de fosfato a largo de la columna de agua es directamente proporcional a la profundidad hasta unos 1.000 m, a partir de los cuales se mantiene constante en torno a 244 µg/L (Bruland, 1980).

1.6.4 Hierro

El hierro es un nutriente clave en todos los organismos porque participa en una amplia variedad de sistemas enzimáticos o como elemento constitutivo de proteínas implicadas en fotosíntesis, respiración y fijación de nitrógeno (Falkowski *et al.*, 1998; Morel & Price, 2004). El hierro es el cuarto elemento más abundante en la tierra, la disponibilidad de éste en el mar limita la producción primaria y está asociada a la asimilación de carbono en muchas áreas de los océanos del mundo. El hierro forma

parte fundamental del ciclo del carbono y los cambios en su concentración tienen un marcado efecto en las concentraciones de CO₂ atmosférico (Blain *et al.*, 2007). En el océano la disponibilidad de hierro es limitada dado que la forma más abundante es el Fe³⁺, muy poco soluble. En respuesta a esto, la biodisponibilidad de hierro es controlada por la presencia de una amplia variedad de complejos orgánicos que facilitan la solubilidad del mismo, permitiendo su utilización por los microorganismos marinos (Karl, 2002).

Este elemento llega al mar por deposición atmosférica, por procesos de erosión o a través de afloramientos subacuáticos fluviales. La concentración de hierro en las aguas superficiales del océano es muy baja situándose alrededor de 0,15 a 0,3 nmol/kg aumentando hasta 0,5 a 2 nmol/kg en las aguas intermedias de las zonas eufótica (Bruland, 1980; Landing & Bruland, 1987).

2. EL PLANCTON

En el océano habitan infinidad de seres vivos, desde organismos microscópicos hasta gigantescas ballenas. Estos organismos se distribuyen a lo largo y ancho del mar en dos ecosistemas que pueden ser bentónico, para aquellos que viven en los fondos del océano, y pelágico para los organismos que habitan las masas de agua. El plancton está compuesto por organismos que viven suspendidos en el agua a merced de las corrientes marinas y que carecen de movilidad propia. Existen diferentes categorías de clasificación del plancton en función de diferentes criterios tales como nutrición, distribución vertical y horizontal en el océano, y tamaño, entre otros. Puede dividirse en *fitoplancton* que son organismos que generan su propia

energía mediante la fotosíntesis, y *zooplancton*, aquellos organismos que obtienen su energía a través de la ingestión de materia orgánica viva o muerta.

Otro de los criterios de clasificación del plancton es el *tamaño*, en la siguiente tabla podemos observar los diferentes niveles conocidos.

Tabla 3. Clasificación del plancton según su tamaño

| Nombre | Tamaño |
|----------------|------------------------|
| Megaloplancton | > 500 mm |
| Macroplancton | 5 – 500 mm |
| Mesoplancton | 0,5 – 5 mm |
| Microplancton | 50 – 500 μm |
| Nanoplancton | 5 -50 μm |
| Ultraplancton | 2 – 5 μm |
| Picoplancton | < 2 μm |

El fitoplancton marino había sido considerado por muchos años el dominante del nivel trófico productor, con las diatomeas y los dinoflagelados como grupos más representativos. Sin embargo, el descubrimiento de procariontes fotosintéticos pertenecientes a la división de las cianobacterias ha cambiado nuestra visión sobre los ecosistemas marinos, situando a estas últimas como grupo dominante dentro de dicho fitoplancton (Waterbury, J.B. *et al.*, 1986; Chisholm *et al.*, 1988; Partensky *et al.*, 1999; Scanlan, D.J. & West, 2002; Bertilsson *et al.*, 2003; Coleman & Chisholm, 2007)

3. LAS CIANOBACTERIAS MARINAS

Las cianobacterias son organismos procariotas fotosintéticos que tienen la capacidad de sintetizar pigmentos (clorofila *a*, clorofila *b*, ficocianinas, ficobilinas, etc) para hacer fotosíntesis oxigénica, fijando CO₂ y utilizando agua como donador de electrones (Whitton & Potts, 2000; Flores & Herrero, 2005).

Han tenido una larga evolución desde hace 2,8 a 3,5 Ma (Knoll, 2008), durante este tiempo se han adaptado a los diversos cambios que ha sufrido el planeta sobreviviendo en ambientes que en ocasiones fueron extremos. Colonizan áreas del planeta con límites de pH entre 4,5 y 9. El máximo valor de temperatura descrito al cual una cianobacteria ha sobrevivido se encuentra alrededor de los 73°C (Castenholz, 1978). En cuanto a la disponibilidad de luz son capaces de hacer fotosíntesis donde la cantidad de luz es muy baja. Colonizan amplias áreas del planeta en donde las concentraciones de nutrientes son mínimas. En el océano las cianobacterias se pueden encontrar habitando desde el ambiente bentónico, en la plataforma continental, hasta la zona pelágica en mar abierto, donde son miembros fundamentales del plancton (Hoffman, 1999). Las cianobacterias representan un papel decisivo en la regeneración oceánica de nutrientes como fijadoras de nitrógeno y carbono. Dichos organismos ha sido reconocidos como importantes fijadores de CO₂ contribuyendo significativamente a la producción primaria global (Goericke & Welschmeyer, 1993) y al ciclo geoquímico del carbono.

Morfológicamente las cianobacterias presentan una gran diversidad, pueden ser unicelulares o filamentosas, algunas de las cuales pueden formar heterocistos. Estos son células especializadas en la fijación biológica de nitrógeno, de pared gruesa y pobremente pigmentada, que son capaces de reducir al máximo su

contenido intracelular de O₂, protegiendo la nitrogenasa de la inhibición por este elemento (Paerl, 2000). También es de general aceptación que las cianobacterias jugaron un importante papel en el origen de los cloroplastos a consecuencia de una endosimbiosis entre una célula eucariótica y un antecesor de las cianobacterias (Bhattacharya & Medlin, 1998; Turmel *et al.*, 1999).

Dentro del *phylum* cyanobacteria se encuentran los géneros marinos *Trichodesmium* (Capone, D. G. *et al.*, 1997), *Richelia* (Montoya *et al.*, 2004), *Synechococcus* (Waterbury, J. B. *et al.*, 1979), y más recientemente *Prochlorococcus* (Chisholm *et al.*, 1988) los cuales han destacado en los últimos años debido a su importancia ecológica en los océanos del mundo.

Trichodesmium es una cianobacteria filamentosa que no forma heterocistos pero que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Es muy abundante en aguas superficiales tropicales y subtropicales.

Los géneros *Synechococcus* (Waterbury, J. B. *et al.*, 1979) y *Prochlorococcus* (Chisholm *et al.*, 1988) son responsables de entre el 30 y más del 50% de la masa fitoplanctónica en el mar desde la plataforma continental hasta aguas muy profundas (Itturiaga & Mitchell, 1986; Booth, 1988; Chisholm *et al.*, 1988; Goericke & Welschmeyer, 1993; Whitman *et al.*, 1998).

4. EL GÉNERO *Prochlorococcus*

La cianobacteria marina *Prochlorococcus* se descubrió en 1988, y se describió como el organismo fotosintético más pequeño conocido (Chisholm *et al.*, 1988). Es responsable de aproximadamente un tercio de la producción primaria de los océanos (Goericke & Welschmeyer, 1993). Se encuentra ubicado en aguas

intertropicales de los océanos del mundo entre los 40°N y los 40°S. En la columna de agua coloniza desde la superficie hasta los 200 metros de profundidad (Partensky *et al.*, 1996). El género *Prochlorococcus* se ha considerado como el organismo fotosintético más abundante del océano y posiblemente de la tierra (Partensky *et al.*, 1999). Estas características, entre otras, han hecho de *Prochlorococcus* un organismo de gran importancia ecológica, lo que ha generado diversos estudios encaminados a su conocimiento.

4.1 Tamaño y estructura

Se han utilizado diferentes métodos para obtener el tamaño de las células de *Prochlorococcus* como medida electrónica *Coulter*, microscopía electrónica, microscopía óptica y tomografía crioeléctrica. Datos recientes obtenidos utilizando esta última técnica muestran las diferencias de tamaño y forma entre la estirpe de superficie MED4 y la estirpe de profundidad MIT9313. La estructura tridimensional de las células de MED4 mostró que tienen una forma esférica con un diámetro de 0,7 μm aproximadamente. Según esto el volumen de dichas células se encuentra en torno a 0,2 μm^3 . Por su parte, las células de MIT9313 son más alargadas y ovaladas con un tamaño aproximado de 0,8 por 1,2 μm . Esto supone que el volumen de éstas células es 0,44 μm^3 aproximadamente (Ting *et al.*, 2007). Sin embargo, el tamaño puede variar en función de las condiciones ambientales (Partensky *et al.*, 1999).

Este pequeño tamaño le confiere diferentes ventajas tales como: (i) una alta relación superficie/volumen haciendo más eficiente el proceso de asimilación de nutrientes, (ii) en zonas de alta densidad celular aumenta la capacidad de aprovechamiento de

la luz, y (iii) ha permitido reducir el tamaño del genoma y compactarlo (Strehl *et al.*, 1999) con objeto de mantener únicamente genes imprescindibles.

La estructura interna de *Prochlorococcus* (figura 5) es típica de cianobacterias, mediante tomografía crioeléctrica las imágenes 3D revelan la presencia de carboxisomas, y dos a cuatro tilacoides que se encuentran paralelos a la membrana celular. Al microscopio electrónico de transmisión pueden observar gránulos de glucógeno situados junto o entre los tilacoides. Los ficobilisomas no son visibles pero se ha encontrado ficoeritrina en estirpes como la SS120 (Hess *et al.*, 1996).

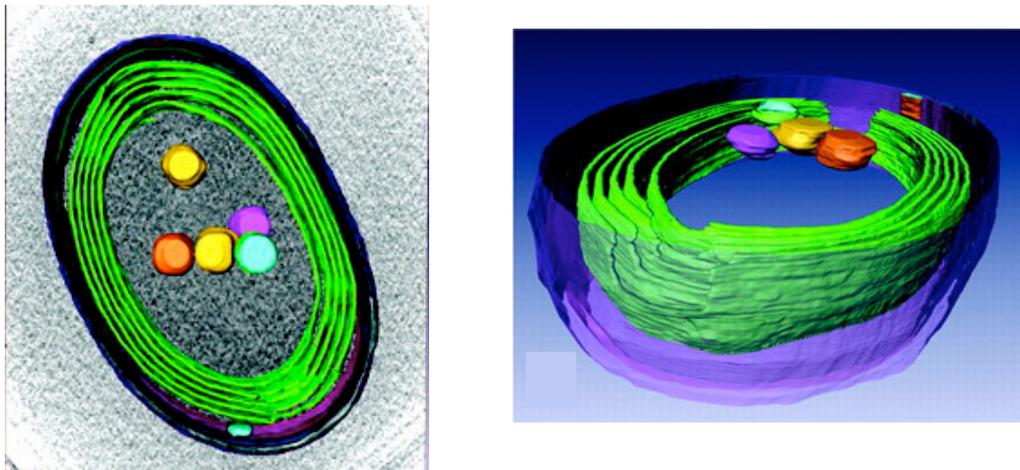


Figura 5. Modelos celulares de la estirpe MIT9313 obtenidos mediante tomografía crioeléctrica. Las estructuras representadas incluyen la pared celular (violeta, rosa y azul), sistema de membrana intracitoplasmático (verde), y carboxisomas (naranja, amarillo, rosa y celeste). Imágenes obtenidas por Claire S. Ting y publicadas en (Ting *et al.*, 2007).

4.2 Aparato fotosintético

Prochlorococcus posee una característica especial en su aparato fotosintético y es la presencia de clorofila a_2 (*Chl a₂*) y clorofila b_2 (*Chl b₂*) exclusivas de este género (Goericke & Repeta, 1992; Partensky *et al.*, 1993; Moore *et al.*, 1995; Urbach & Chisholm, 1998). Estos pigmentos son derivados divinilo de la clorofila *a* y *b* y

tienen su máxima absorción y excitación en la zona azul del espectro visible. Otros de los pigmentos encontrados incluyen pequeñas cantidades de un pigmento conocido como Mg,3-8 divinil faeoporfirina a_5 , zeaxantina, y α -carotenos. La relación entre Chl a_2 y Chl b_2 ha permitido dividir las distintas estirpes de *Prochlorococcus* en estirpes de superficie, las cuales poseen una relación Chl a_2 /Chl b_2 menor que 1, y estirpes de profundidad que poseen una relación Chl a_2 /Chl b_2 igual o mayor que 1. Las estirpes de superficie tienen la capacidad de colonizar zonas poco profundas y bien iluminadas en la columna de agua, mientras que las estirpes de profundidad se distribuyen en la parte más profunda de la zona eufótica, áreas donde la disponibilidad de luz es muy baja. En la tabla 4 se relacionan las estirpes de *Prochlorococcus* con referencia al grupo al que pertenecen según la relación entre las dos clorofilas.

Al menos tres estirpes de profundidad (SS120, MIT9302 y MIT9313) tienen la capacidad de sintetizar clorofila b monovinilo (Chl b_1) cuando se desarrollan bajo condiciones de alta irradiancia. Esto sugiere que dicha condición activa la expresión de enzimas que pueden transformar Chl b_2 en Chl b_1 (Bazzaz *et al.*, 1982; Partensky *et al.*, 1993).

Por otra parte *Prochlorococcus* no posee ficobilisomas, es decir no produce ficobiliproteínas. No obstante, algunas estirpes tienen la capacidad de sintetizar un tipo de ficoeritrina llamada PE III (Hess *et al.*, 1996; Hess & Partensky, 1999). También pueden sintetizar un grupo de proteínas codificadas por los genes *pcb* que se unen a las clorofilas a_2 y b_2 sirviendo de proteínas antena o captadoras de luz (Garczarek, L. *et al.*, 2001). Las estirpes de *Prochlorococcus* también se diferencian en el número de copias del gen *pcb*, por ejemplo MED4 y MIT9312 tienen una sola, SS120 presenta ocho, y MIT9313 posee dos (Garczarek, L. *et al.*, 2000).

Tabla 4. Estirpes de *Prochlorococcus* y grupo al que pertenecen según la relación $Chl\ a_2/Chl\ b_2$. (Adaptado de Tabla 1 en Partensky et al., 1999).

| Estirpe | Profundidad (m) | Grupo |
|-----------------|------------------------|--------------|
| MED4 o PCC 9511 | 5 | Superficie |
| NATL1 | 30 | Superficie |
| NATL2 | 30 | Superficie |
| TATL1 | 20 | Superficie |
| TATL2 | 30 | Superficie |
| MIT9107 | 25 | Superficie |
| SB | 40 | Superficie |
| MIT9201 | 0 | Superficie |
| MIT9215 | 0 | Superficie |
| MIT9202 | 79 | Superficie |
| MIT9211 | 83 | Superficie |
| SS120 | 120 | Profundidad |
| GP2 | 150 | Profundidad |
| PAC 1 | 100 | Profundidad |
| MIT9302 | 100 | Profundidad |
| MIT9303 | 100 | Profundidad |
| MIT9312 | 135 | Profundidad |
| MIT9313 | 135 | Profundidad |

4.3 Distribución oceánica

Prochlorococcus tiene una amplia distribución por todos los océanos del mundo, es virtualmente ubicuo en las bandas latitudinales desde los 40°N hasta los 40°S (Partensky et al., 1999). En las zonas con aguas frías las poblaciones de este organismo descienden rápidamente, lo que sugiere que las bajas temperaturas son un factor de inhibición para su crecimiento. Sin embargo, las concentraciones máximas de población en *Prochlorococcus* se encuentran en aguas donde la

temperatura alcance los 25°C (Moore *et al.*, 1995) y los 29°C (Blanchot & Rodier, 1996).

En cuanto a la distribución vertical, estudios realizados mediante citometría de flujo de poblaciones de *Prochlorococcus* y *Synechococcus* mostraron que en promedio, las concentraciones de *Synechococcus* están aproximadamente un orden de magnitud por debajo de las concentraciones de *Prochlorococcus*, sin embargo su abundancia máxima es muy similar. La máxima concentración de *Prochlorococcus* se encuentra alrededor de las 700.000 células mL⁻¹ descrita en el mar de Arabia (Campbell *et al.*, 1998). *Prochlorococcus* tiene la capacidad de extenderse en profundidades por debajo de los 100 metros, mientras que *Synechococcus* a partir de este punto prácticamente desaparece. Se han observado 3 tipos diferentes de distribución vertical en *Prochlorococcus*.

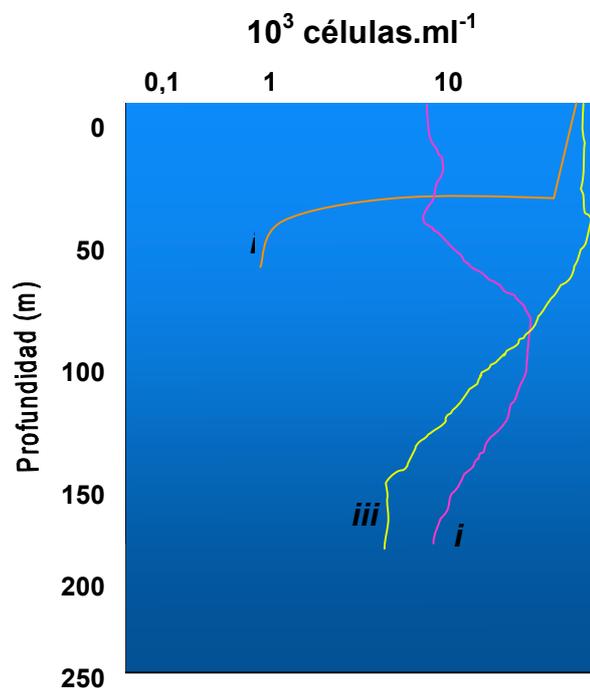


Figura 6. Distribución de *Prochlorococcus* en la columna de agua
(Adaptado de Partensky *et al.*, 1999b)

El primer tipo (i) se refiere a poblaciones que se encuentran principalmente en aguas cercanas a la costa, aguas superficiales y mezcladas hasta la termoclina, en donde descienden bruscamente. El segundo tipo (ii) se refiere a poblaciones que alcanzan un máximo de 10^5 células mL^{-1} próximas al fondo de la zona eufótica, las cuales descienden en un orden de magnitud en la superficie. En el tercer tipo (iii), *Prochlorococcus* se distribuye desde la superficie hasta el final de la zona eufótica con concentraciones casi constantes desde 1×10^5 hasta 3×10^5 células mL^{-1} (Partensky *et al.*, 1999). En áreas del océano en las cuales el agua nunca se mezcla por debajo de los 100 a 150 metros de profundidad (entre los 30°S y los 30°N), *Prochlorococcus* presenta un perfil de distribución que varía levemente en el transcurso del año y corresponde con el tercer tipo (Campbell *et al.*, 1997)

En contraste, cuando la columna de agua se mezcla estacionariamente hasta profundidades cercanas a la zona eufótica, como ocurre en la mayoría de las aguas templadas en invierno, *Prochlorococcus* desaparece completamente durante este período del año (Lindell & Post, 1995). En primavera, cuando la columna de agua vuelve a estratificarse y abundan los nutrientes en la superficie, *Synechococcus* inicia un crecimiento explosivo en la capa mezclada seguido de un crecimiento de *Prochlorococcus* del primer tipo. Cuando los nutrientes comienzan a disminuir la población de *Prochlorococcus* profundiza en la columna de agua mostrando un perfil de distribución del segundo tipo (Olson *et al.*, 1990).

Estudios genéticos y fisiológicos realizados en cultivos de *Prochlorococcus*, así como el hecho de que las distintas estirpes que se encuentran a diferentes profundidades tengan diversas características, sugieren que la distribución de este organismo a lo largo de la columna de agua viene determinada en gran medida por la alta variabilidad genética entre estirpes, permitiéndole colonizar una mayor

variedad de nichos a lo largo de la zona eufótica (Scanlan, D. J. *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1998; Scanlan, D.J. & West, 2002; Dufresne *et al.*, 2003).

4.4 Características genéticas

Uno de los aspectos más importantes en la biología de *Prochlorococcus* es la especial atención que ha recibido la puesta en marcha de los proyectos de secuenciación de genomas. Este interés surge a consecuencia de características como su ubiquidad, abundancia y por el reconocimiento de dicho género como responsable de una parte importante de la producción primaria de los océanos del mundo. La secuenciación de los genomas de *Prochlorococcus* podría proporcionar información para comprender la razón del éxito de este género en los diversos ambientes marinos.

Se han iniciado proyectos de secuenciación del genoma de 13 estirpes de *Prochlorococcus* de las cuales 12 ya han finalizado y se encuentran actualmente disponibles en <https://research.venterinstitute.org/moore/> y <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>. Los datos obtenidos indican que el tamaño del genoma de *Prochlorococcus* se encuentra entre 1,6 en la estirpe MED4, y 2,5 Mb en MIT9313. Esto quiere decir que posee el genoma más pequeño descrito hasta la fecha para un organismo fotosintético. Diez de las doce estirpes secuenciadas se caracterizan por contener en su genoma una proporción de G+C que oscila entre el 30,79% al 39,68%, en las dos estirpes restantes este valor oscila entre el 50,01 al 51% (MIT9303 y MIT9313). Teniendo en cuenta el reducido tamaño del genoma y las diferencias genéticas que existen entre las estirpes, se ha sugerido que la amplia variabilidad genética está estrechamente relacionada con la adaptación a los diversos ambientes en los que se desarrolla cada una de ellas. Por ejemplo, de los

1.716 genes que posee el genoma de MED4, estirpe habitante de superficie, existen 362 (21%) que no se encuentran en el genoma de la estirpe MIT9313. Por otra parte, de los 2.275 genes del genoma de MIT9313, estirpe habitante de profundidad, 923 genes (40%) no se encuentran presentes en MED4.

Teniendo en cuenta que según el árbol filogenético basado en la secuencia 16S rRNA (Rocap *et al.*, 2001), la estirpe MIT9313 esta cercana a la base de la familia de *Prochlorococcus* y MED4 parece ser la estirpe más recientemente desarrollada, en la línea evolutiva este organismo ha eliminado zonas no codificantes así como algunos genes prescindibles para la supervivencia (Dufresne *et al.*, 2003; Rocap *et al.*, 2003; Dufresne *et al.*, 2005). Sin embargo, también ha introducido genes por transferencia lateral que son específicos para determinadas estirpes y que responden a adaptaciones al hábitat en el que se localizan las mismas, sugiriendo que la transferencia de genes en islas genómicas son un importante mecanismo de especialización y adaptación a los diversos habitats marinos (Coleman *et al.*, 2006).

5. METABOLISMO DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es uno de los bioelementos más importantes para la vida del planeta, se encuentra en una gran diversidad de compuestos y estados en la biosfera. También forma parte de las moléculas más importantes para los organismos vivos, los aminoácidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, así como de otras biomoléculas y metabolitos intermediarios.

Se encuentra principalmente en forma de nitrógeno gaseoso o N_2 el cual para ser utilizado por animales, plantas y bacterias debe ser reducido a amonio. El amonio es la única forma nitrogenada que puede incorporarse a las moléculas orgánicas,

por ello los diferentes compuestos de nitrógeno que vayan a fijarse a la materia biológica deben sufrir en primer lugar su reducción o conversión a amonio (Mifflin & Lea, 1976).

5.1 Metabolismo de nitrógeno en cianobacterias

Para las cianobacterias el nitrógeno representa el 11% de su peso seco (Wolk, 1973). Las principales formas inorgánicas de nitrógeno que son utilizadas por estos organismos son el nitrógeno molecular (N_2), el nitrato, el nitrito y el amonio. También pueden utilizar formas orgánicas como la urea, el cianato y los aminoácidos.

Las diferentes fuentes de nitrógeno entran a través de la doble membrana de las cianobacterias mediante las porinas, las cuales son proteínas que permiten el acceso de moléculas pequeñas como los aminoácidos e iones inorgánicos (Benz & Böhme, 1985). Además de las porinas las cianobacterias poseen genes que codifican para transportadores especializados en la entrada de nitrato, nitrito, urea y cianato. El transporte de amonio también se lleva a cabo por un sistema de transporte mediante permeasas de la familia Amt, que introducen las moléculas en la célula en función del potencial de membrana (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002).

Los estados de oxidación de las formas de nitrógeno que se encuentran en el medio ambiente, tienen consecuencias directas sobre la cantidad de energía necesaria para su asimilación. Es así como las formas más oxidadas (nitrógeno molecular o nitrato) requieren un gasto energético mucho mayor para su asimilación que las formas más reducidas como el amonio (García-Fernández *et al.*, 2004). Debido a esto, el amonio es la forma de nitrógeno preferida por muchas cianobacterias

convirtiendo dicha molécula en señal de regulación para los mecanismos de asimilación de nitrógeno.

El primer paso en la asimilación de nitrógeno es la conversión de las diversas fuentes disponibles en el medio a amonio. Aunque algunas cianobacterias fijan N_2 , la ruta principal de asimilación de amonio está compuesta por la nitrato reductasa, nitrito reductasa, y el ciclo de la glutamina sintetasa y glutamato sintasa (GS/GOGAT). En la siguiente figura se muestran las diversas formas que pueden ser utilizadas por las cianobacterias como fuente de nitrógeno y las rutas encargadas de la asimilación de dichas fuentes.

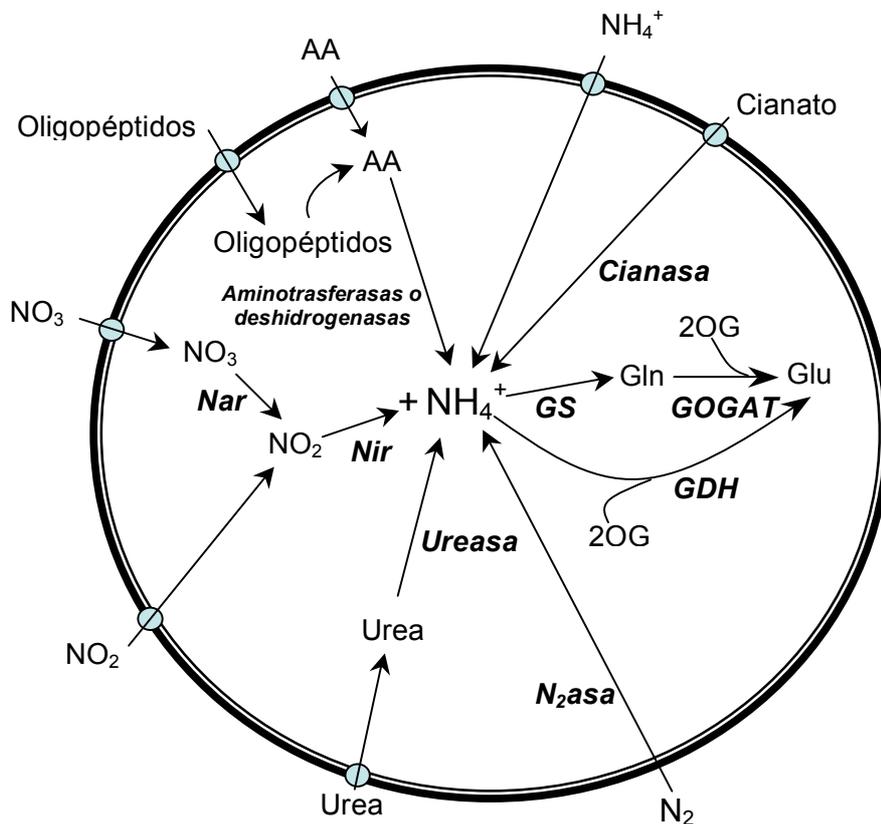


Figura 7. Asimilación de nitrógeno en cianobacterias
(Adaptado de García-Fernández et al., 2004)

El nitrógeno molecular se difunde a través de la membrana celular y se reduce a amonio mediante la enzima nitrogenasa, el nitrato y el nitrito se transportan mediante transportadores específicos para cada uno de ellos y se reducen a amonio mediante la nitrato y nitrito reductasa, respectivamente. La urea es degradada por la ureasa formando dos moléculas de amonio y CO_2 . Los aminoácidos son transportados al interior de la célula por sistemas específicos de transporte, para a continuación formar amonio mediante enzimas como las aminotransferasas, deshidrogenasas y/o enzimas específicas para cada aminoácido. El cianato se transporta mediante transportadores del tipo *ABC* y se descompone mediante la cianasa en CO_2 y amonio (Miller & Espie, 1994); esta enzima será tratada con mas detalle en el apartado 6. Como se observa, la molécula central en el metabolismo del nitrógeno de cianobacterias es el amonio, que es incorporado a glutamato por la glutamina sintetasa (GS) para obtener glutamina en una reacción dependiente de ATP. A continuación la glutamato sintasa (GOGAT) cataliza la transferencia del grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato para obtener dos moléculas de glutamato; en esta reacción participa como donador de electrones el NADH o la ferredoxina reducida (Flores & Herrero, 1994).

Existe una posible vía alternativa por la que se incorpora amonio a los esqueletos carbonados y es mediante la glutamato deshidrogenasa (GDH) de la cual se tratarán diversos aspectos en el apartado 7. La glutamina y el glutamato obtenidos son primordiales para la síntesis de compuestos nitrogenados y para el mantenimiento del balance C/N a nivel intracelular.

La regulación del metabolismo del nitrógeno es bien conocida en cianobacterias y consiste en la represión de vías de asimilación de algunas fuentes de nitrógeno, cuando existen en el medio otras formas nitrogenadas más fácilmente asimilables

(Herrero *et al.*, 2001). En cianobacterias está mediada por un factor de transcripción llamado NtcA, el cual pertenece a la familia CAP (proteínas receptoras de AMP cíclico o genes activadores del catabolismo). En ausencia de amonio la proteína NtcA, codificada por el gen *ntcA*, actúa como activador de la transcripción de un grupo de promotores involucrados en la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno. Se ha propuesto que NtcA realiza su actividad reguladora como homodímero, uniéndose al ADN por un motivo hélice-giro-hélice presente en su extremo carboxilo terminal (Vega-Palas *et al.*, 1992; Luque *et al.*, 1994). Sin embargo, esta proteína también puede ser activada cuando la relación carbono/nitrógeno (C/N) en la célula es alta (Luque *et al.*, 2004) ocasionada por un déficit en la concentración de amonio.

En este sentido, otro de los elementos importantes en el control del nitrógeno es P_{II}, una proteína que actúa como señal de la transducción, la cual coordina el metabolismo del nitrógeno y el del carbono en la célula. La proteína P_{II} se fosforila cuando la célula experimenta un aumento en la relación carbono/nitrógeno (C/N) y presenta sitios de unión a ATP y 2-oxoglutarato, lo que sugiere que podría actuar como sensor de la concentración de 2-oxoglutarato intracelular (Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1995; Forchhammer & Tandeau de Marsac, 1995; Forchhammer, 2004).

Es decir, en presencia de amonio el gen *ntcA* se reprime e inhibe la asimilación de formas alternativas de nitrógeno. Por otra parte la proteína P_{II} se encuentra defosforilada por que existe un equilibrio entre el carbono y el nitrógeno. En ausencia del mismo la relación C/N se incrementa, P_{II} se encuentra ligada a 2-oxoglutarato y se fosforila. NtcA se activa y se une a los promotores de los genes

implicados en la síntesis de enzimas para así asimilar otras formas alternativas de nitrógeno y equilibrar dicha relación (Palinska, K. A. *et al.*, 2002).

Aunque el gen *glnB*, el cual codifica para la P_{II}, está regulado positivamente por NtcA (García-Domínguez & Florencio, 1997; Lee *et al.*, 1999), y NtcA necesita de la presencia de P_{II} para activar los genes necesarios para la asimilación de nitrógeno bajo condiciones restrictivas del mismo (Aldehni *et al.*, 2003; Paz-Yepes *et al.*, 2003), en la actualidad no se conoce la base molecular de la interacción entre ambos elementos.

Recientemente se ha estudiado un factor denominado PipX el cual parece conectar la regulación de los factores NtcA y P_{II}. La proteína PipX (Proteína X de interacción con P_{II}), tiene la capacidad de formar complejos con las proteínas NtcA y P_{II}, y ejercer un efecto de regulación positiva del gen *glnB* dependiente de la concentración de 2-oxoglutarato (Espinosa *et al.*, 2006; Espinosa *et al.*, 2007). Cuando los niveles de éste último son bajos, PipX se une a P_{II}, mientras que cuando dichos niveles se incrementan, se favorece la unión de PipX y NtcA. Esta proteína es necesaria para la regulación de los promotores dependientes de NtcA, aunque no es esencial para que se active su transcripción. PipX no parece influir en la actividad de P_{II}, por lo que probablemente la función del complejo PipX-P_{II} sea modular la interacción de PipX con NtcA (Espinosa *et al.*, 2006).

5.2 Metabolismo del nitrógeno en *Prochlorococcus*

Análisis comparativos de las secuencias genómicas de las estirpes de *Prochlorococcus*, muestran diferencias significativas en cuanto a las vías de asimilación de nitrógeno. Como se indicó en el apartado anterior, las cianobacterias pueden utilizar diferentes formas de nitrógeno, tales como: nitrógeno molecular,

nitrito, amonio, urea, aminoácidos y cianato. Sin embargo, en el género *Prochlorococcus* (figura 8) una de las características más sorprendentes es que ninguna de las estirpes puede utilizar nitrato (López-Lozano *et al.*, 2002), porque carece del gen *narB* el cual codifica para la nitrato reductasa. Esto es importante, dado que el nitrato ha sido considerado la fuente de nitrógeno más abundante en las profundidades de los océanos (Capone, D.G., 2000), zonas con una disponibilidad de luz muy escasa y donde *Prochlorococcus* es muy abundante. Por otra parte, solo las estirpes NATL1A, NATL2A, MIT9303 y MIT9313 poseen el gen *nirA*, responsable de la síntesis de nitrito reductasa necesaria para la asimilación de nitrito.

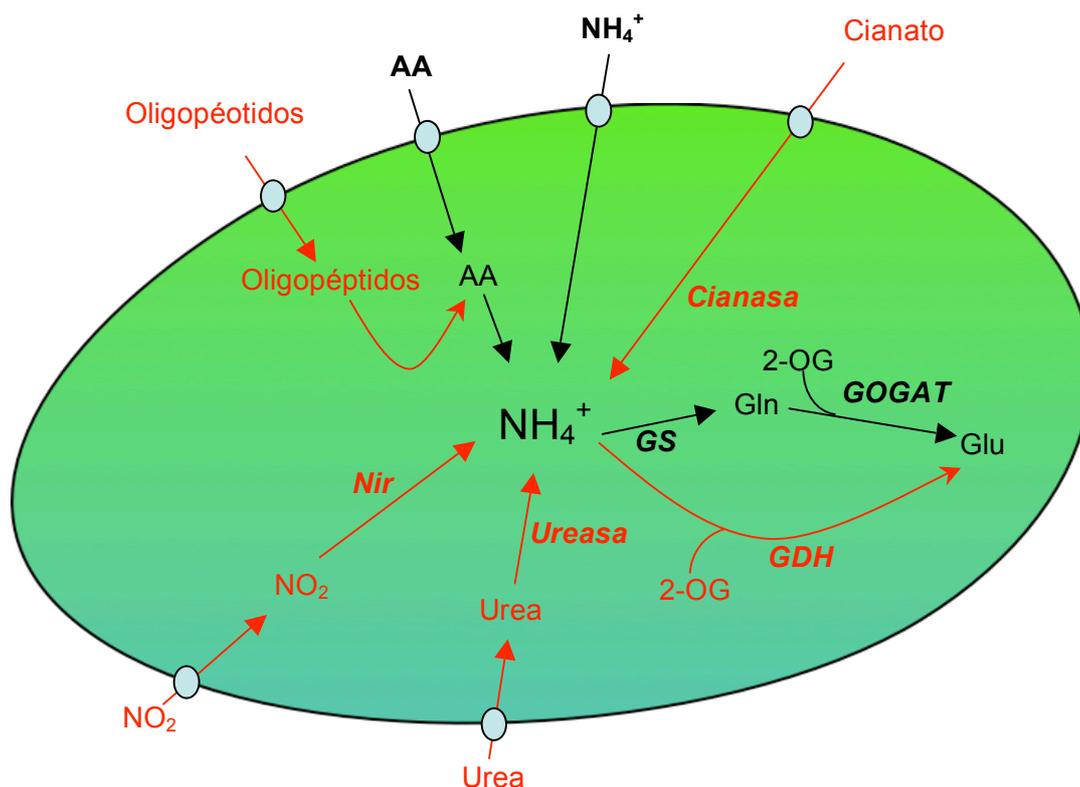


Figura 8. Rutas de asimilación de nitrógeno en *Prochlorococcus*. En negro, fuentes de nitrógeno y vías de asimilación que comparten todas las estirpes. En rojo vías que pueden ser utilizadas dependiendo de la estirpe.

Ninguna estirpe de *Prochlorococcus* posee el gen *nif* el cual codifica para la enzima nitrogenasa, lo que sugiere que dicho género no puede utilizar N₂ (Dufresne *et al.* , 2003; Rocap *et al.* , 2003). La estirpe MED4 posee los genes necesarios para el transporte y asimilación de cianato. En cuanto a la utilización de aminoácidos, en los genomas de todas las estirpes de *Prochlorococcus* se pueden encontrar las diferentes secuencias de genes implicados en el transporte de estas moléculas. Trabajos recientes han demostrado la capacidad de este género de asimilar aminoácidos como fuente de nitrógeno (Zubkov *et al.*, 1998; Zubkov *et al.*, 2003; Zubkov & Tarran, 2005). Algunas de las estirpes pueden utilizar urea (Palinska, K.A. *et al.*, 2000) lo que sugiere la importancia de ésta en ecosistemas marinos en los cuales es el compuesto mayoritario entre las formas nitrogenadas de origen orgánico. Finalmente, todas las estirpes poseen los genes implicados en el transporte y la asimilación de amonio, *amt1* (transportador de amonio), *glnA* (GS) y *glnF* (GOGAT). Cabe resaltar que el gen *amt1* tiene expresión constitutiva tanto en presencia como en ausencia de amonio (Lindell *et al.*, 2002).

La ruta central de asimilación de amonio en *Prochlorococcus* esta compuesta por la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa. La GS cataliza la síntesis de glutamina, en una reacción dependiente de ATP. La GOGAT cataliza la reacción entre la glutamina y el 2-oxoglutarato para formar glutamato (El Alaoui *et al.*, 2003; Gomez-Baena *et al.*, 2006).

El metabolismo del nitrógeno en *Prochlorococcus* no muestra el comportamiento típico de todas las cianobacterias en cuanto a su regulación por NtcA y P_{II}. Se ha descrito que en la estirpe PCC 9511 los genes *ntcA* y *glnB* se encuentran conservados en su genoma, sin embargo no siguen un patrón de regulación normal. La secuencia del gen *glnB* es muy similar a la encontrada en otras cianobacterias,

no obstante la proteína P_{II} aparentemente no se fosforila a causa del incremento en la concentración de 2-oxoglutarato, ni por la ausencia de amonio (Palinska, K. A. *et al.* , 2002). Además el gen *pphA* responsable de la síntesis de la proteína que desfosforila la P_{II}, se encuentra ausente en el genoma de MED4 (Palinska, K. A. *et al.* , 2002; Rocap *et al.* , 2003). Por otra parte, en varios promotores de los genes implicados en la asimilación de fuentes de nitrógeno, se han encontrado sitios de unión a NtcA, lo que sugiere que estos genes están controlados por dicho factor de transcripción. Sin embargo, el gen *amt1* que codifica para el transportador de amonio, no parece responder a este control, dado que éste tiene expresión constitutiva tanto en ausencia como en presencia de amonio, al contrario de lo que sucede en otras cianobacterias (Lindell *et al.* , 2002).

6. EL CIANATO COMO FUENTE DE NITRÓGENO Y LA CIANASA

El cianato es uno de los productos de la oxidación del cianuro, se encuentra de forma natural como el resultado de la descomposición no enzimática del carbamil fosfato. Para muchos organismos vivos el cianato es un agente altamente tóxico a pesar de ello puede participar de forma activa en el metabolismo del nitrógeno de algunas bacterias y cianobacterias. En el ambiente, el cianato se origina por la fotooxidación del cianuro o por la degradación de urea (Hagel *et al.* , 1971). La forma tóxica del cianato es el isocianato (HNCO) el cual tiene la capacidad de reaccionar con los grupo tiol y amino de la proteínas. Estas reacciones de carbamilación ocasionan alteraciones a nivel funcional y estructural en dichas proteínas (Kraus & Kraus, 1998). Sin embargo, aunque ha sido poco estudiado, el cianato puede ser

utilizado como fuente de nitrógeno por algunos organismos que tienen la capacidad de sintetizar la enzima cianasa.

Esta enzima cataliza la reacción entre cianato y bicarbonato para formar amonio y CO₂ (figura 11). En realidad el producto final de la reacción es el carbamato el cual se descompone espontáneamente en amonio y dióxido de carbono. El amonio es incorporado posteriormente a los esqueletos carbonados para formar aminoácidos.



Figura 9. Reacción catalizada por la cianasa

También conocida como cianato liasa, porque cataliza la ruptura del enlace C=N del cianato, la cianasa (EC 4.2.1.104) es una enzima que se ha estudiado ampliamente en *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium thiocyanatum* sp nov., *Flavobacterium* sp, en cianobacterias *Synechocystis* sp PCC603 y *Synechococcus* sp PCC7942 y en algunas plantas (Guilloto.M & Hargreav.Ab, 1972; Anderson, 1980; Kunz & Nagappan, 1989; Suzuki *et al.*, 1996; Harano *et al.*, 1997; Wood *et al.*, 1998; Luque-Almagro *et al.*, 2003)

En *E. coli* los valores de K_m , para el cianato en presencia de 3 mM de bicarbonato, es de 0,6 mM. La concentración de bicarbonato para alcanzar la mitad de la velocidad máxima en presencia de cianato 2 mM, fue de 0,1 mM. En cuanto al pH el valor óptimo de actividad varia entre 7 y 7,4, y la temperatura óptima es de 37°C (Anderson, 1980).

En cuanto al mecanismo de reacción de la cianasa, el bicarbonato y el cianato participan como sustratos de la reacción (figura 12). Por cada mol de bicarbonato que se consume en dicha reacción, se obtiene una cantidad de amonio igual a la del

bicarbonato inicialmente presente. La reacción termina cuando la concentración de bicarbonato es menor que la de cianato (Johnson & Anderson, 1987). Por otra parte el agua no participa como sustrato dado que bajo condiciones normales de reacción no necesita agua, indicando que la clasificación como liasa es la más apropiada. Además el intermediario en la reacción es un dianión que se forma transitoriamente dentro de un sitio activo de la enzima liberando CO₂ y carbamato, el cual se descarboxila no enzimáticamente formando amonio (Johnson & Anderson, 1987).

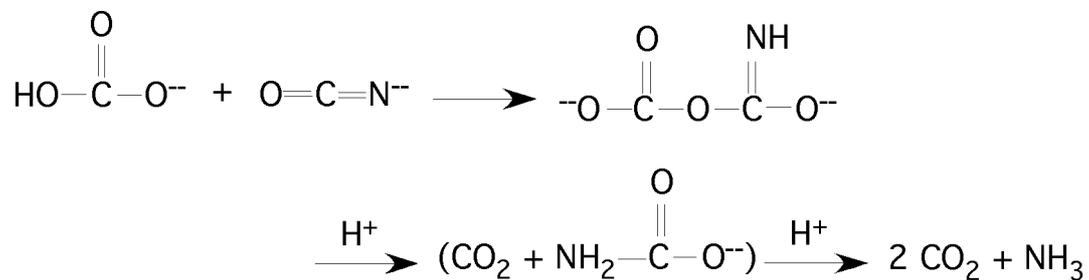


Figura 10. Mecanismo de reacción de la cianasa

Estudios preliminares mediante cristalografía han revelado que la cianasa es un homodecamero con una simetría 5/2 (Otwinowski *et al.*, 1991). El monómero de la cianasa consta de dos dominios el dominio N-terminal y el dominio C-terminal. Estos monómeros se entrecruzan para formar un dímero. La cianasa es un decámero constituida por 5 dímeros los cuales constituyen el complejo final (Walsh *et al.*, 2000). El peso molecular del homodecámero se encuentra entre los 130.000 a 150.000 Da, cada subunidad (dímero) tiene un peso molecular aproximado de 15.000 Da (Anderson & Little, 1986; Otwinowski *et al.*, 1991).

La cianasa es inducible, es decir el gen *cynS*, que codifica para la enzima se expresa en presencia de cianato extracelular. Dicho gen ha sido clonado y

secuenciado en diferentes organismos, en los que se ha observado que forma parte del operon *cyn*, dentro del cual se agrupan los demás genes implicados en el transporte de cianato y asimilación de cianato.

En *E. coli* y *Pseudomona aeruginosa* el operon *cyn* contiene los genes *cynS* y *cynT* (Sung & Fuchs, 1988); este último codifica para una anhidrasa carbónica encargada de mantener los niveles necesarios de bicarbonato para la degradación de cianato (Guilloton *et al.*, 1993). En *E.coli* además de estos dos, se encuentra también un gen para una proteína altamente hidrofóbica de la familia MFS (*Major Facilitators Superfamily*) encargada de transportar cianato y que actúan por un mecanismo dependiente de la existencia de un potencial de membrana.

En cianobacterias el operon *cyn* es diferente del de los organismos mencionados anteriormente; en *Synechococcus* sp PCC7942 el gen *cynS* se encuentra acompañado por los genes *cynB* y *cynD*, los cuales codifican para un componente integral de membrana y para la subunidad de unión a ATP de un transportador tipo ABC (Harano *et al.* , 1997).

En *Prochlorococcus* el gen *cynS* se encuentra en los genomas de las estirpes de superficie: MED4 (PCC 9511), NATL1 y NATL2, no obstante únicamente la estirpe MED4 posee los genes que codifican para el transportador tipo ABC implicado en el sistema de transporte de cianato. En *Prochlorococcus* no existen datos sobre la regulación de esta enzima, ni sobre la capacidad del mismo de utilizar cianato como fuente de nitrógeno.

Aunque el cianato esté considerado para muchos organismos como un agente tóxico, es posible que para *Prochlorococcus* PCC9511 signifique una fuente alternativa de nitrógeno tal y como sucede en otros organismos mencionados anteriormente. Por ello es importante conocer el papel fisiológico de la cianasa en

Prochlorococcus en especial el efecto de la presencia de cianato en cultivos, lo que llevaría a determinar si la enzima es o no inducible. Esta información permitiría analizar las causas que llevaron a *Prochlorococcus* PCC 9511 a conservar o incorporar el gen *cynS* además de los genes implicados en el transporte de cianato.

7. LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA

Además de la vía GS/GOGAT existe una posible vía alternativa de asimilación de amonio mediante la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH).

7.1 Características generales de la glutamato deshidrogenasa

La glutamato deshidrogenasa es una enzima que cataliza la reacción entre el 2-oxoglutarato y el amonio para formar glutamato utilizando como cofactores piridín nucleótidos. La reacción con función anabólica o aminación reductiva, es la ruta de asimilación de amonio, y con función catabólica o desaminación oxidativa, es la vía para la degradación de glutamato (figura 9).

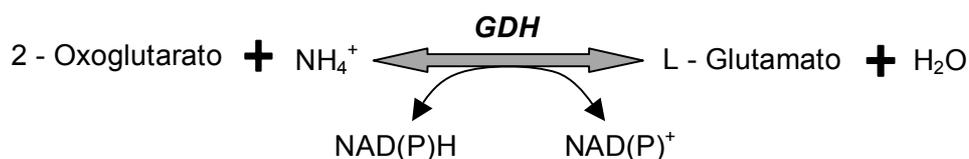


Figura 11. Reacción catalizada por la GDH

Como se puede observar, la GDH puede tener especificidad por el NADH, NADPH o ambos. Al parecer la GDH-NADP podría tener un papel en la asimilación de amonio, especialmente en hongos y levaduras como también en algunos

procariotas (Smith *et al.*, 1975; Stewart *et al.*, 1980) mientras que para la GDH-NAD se ha propuesto un papel catabólico en eucariotas.

La GDH posee pH óptimos diferentes para la aminación, entre 7,5 y 8,5, y para la desaminación entre 8,5 y 9,5.

Los valores de K_m para el glutamato y el amonio son diversos según el género, e indican la orientación de la reacción y con ello la función de la enzima en el organismo. Si la K_m es baja para el amonio y alta para el glutamato, es posible que la enzima cumpla una función anabólica, y en el caso contrario, la dirección de la reacción podría ser con función catabólica (Stewart *et al.*, 1980).

En cuanto al tamaño y la conformación estructural existen diferencias entre los valores de peso molecular descritos los cuales varían entre 280 y 350 KDa. La GDH puede ser hexamérica o tetramérica, y subunidades iguales de 50 KDa cada subunidad, aproximadamente.

Diversas investigaciones han sugerido al α -iminoglutarato como intermediario en el mecanismo de reacción (figura 12).

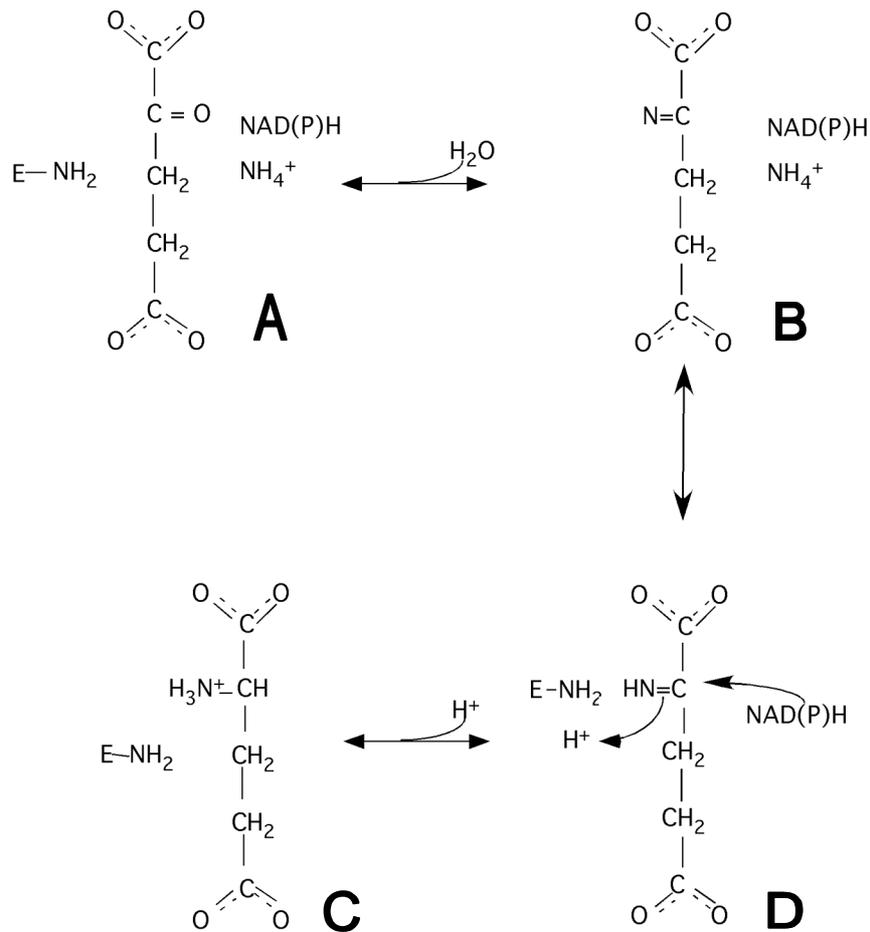


Figura 12. Mecanismo de reacción de la GDH (E).
(Adaptado de Smith, et al., 1975)

Un grupo ε-amino no cargado de la lisina-126 reacciona con 2-oxoglutarato (A), el cual forma covalentemente una base de Schiff (B), que sufre una reacción de adición-eliminación con el amonio para generar el α-iminoglutarato (C). Finalmente éste último es reducido por el piridín nucleótido para formar glutamato (D) (Srinivasan *et al.*, 1988). Por otra parte, la GDH puede requerir la presencia de un catión divalente como el Ca²⁺, que puede ser sustituido por Mg²⁺ ó Zn²⁺, los cuales actúan como activadores o estimuladores de la actividad y en muchos casos pueden no ser necesarios según el organismo.

7.2 Distribución de la glutamato deshidrogenasa

La glutamato deshidrogenasa es una enzima presente en los reinos procariota, arquea y eucariota (Woese *et al.*, 1990). Se puede localizar en mitocondrias, como ocurre en eucariotas inferiores como *Dictyostelium discoideum* (Pamula & Wheldrake, 1991), también puede ser citoplasmática como en hongos (Smith *et al.*, 1975). En algas superiores y plantas puede encontrarse en los cloroplastos y en mitocondrias (Stewart *et al.*, 1980), en cianobacterias se encuentra asociada a la membrana tilacoidal (Sallala & Nimer, 1990), y en animales superiores se encuentra localizada en las mitocondrias (Smith *et al.*, 1975).

7.3 Función de la glutamato deshidrogenasa

La GDH fue considerada una enzima clave en la asimilación de amonio hasta 1974 cuando se demostró que la ruta preferida para dicho fin era la vía GS/GOGAT en plantas (LEA & Mifflin, 1974) y también en ciertas algas (Cullimore & Sims, 1981). Esta conclusión se obtuvo con base en diversas observaciones como: (i) La GS mostró una mayor afinidad por el amonio que la GDH. (ii) Estudios realizados en plantas muestran que el nitrógeno inorgánico es incorporado primero al grupo amida de la glutamina que al glutamato (Yoneyama & Kumazawa, 1974; Skokut *et al.*, 1978; Rhodes *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1995). (iii) El MSX (inhibidor específico de la GS) puede inhibir completamente la asimilación de amonio (Meeks *et al.*, 1977). A partir de esto se han realizado diferentes estudios en diversos organismos, procariotas y eucariotas, para conocer el papel de la GDH en cada uno de ellos. En bacterias, los estudios realizados con enterobacterias en donde predomina la GDH-NADP, han sugerido una función anabólica para la asimilación de amonio y síntesis de glutamato. El amonio es un inductor de la síntesis de NADP-GDH y un represor

de dicha síntesis en organismos del género *Bacillus*. La importancia de GDH en *Escherichia coli* se explica en condiciones de limitación de energía y exceso de amonio y fosfato (Helling, 1994), esto se debe a que la GS/GOGAT requiere ATP para la síntesis de glutamato, mientras que la GDH únicamente requiere piridín nucleótidos lo que le supone un menor gasto energético. La capacidad de utilizar las dos vías simultáneamente puede ocurrir en procariontes bajo condiciones de competencia por los nutrientes frente a células del mismo u otro género (Calhoun *et al.*, 1993). En otras bacterias como *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Hornby & Engel, 1984) y *Clostridium symbiosum* (Baker *et al.*, 1992) su función es preferentemente catabólica.

En hongos y levaduras se puede encontrar GDH con actividad tanto anabólica como catabólica. Estas enzimas utilizan específicamente NADH o NADPH como cofactores. Existen organismos como *Neurospora crassa* (Blumenthal & Smith, 1975) y *Saccharomyces cerevisiae* (DeLuna *et al.*, 2001) que poseen GDH dependientes tanto de NADH como de NADPH. La actividad enzimática se asocia con la utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno, es decir un papel catabólico, mientras que en algunos casos puede servir de vía de asimilación de amonio, es decir cumple un papel anabólico.

En algas como *Bryopsis maxima* la función de la GDH-NADP es anabólica con niveles de actividad 4 veces mayores que la GS en cloroplastos (Inokuchi *et al.*, 1997).

En plantas la GDH puede tener varias isoenzimas en una misma especie. Algunas isoenzimas son inducibles en función de las condiciones nutricionales y ambientales. La GDH de plantas generalmente tiene un peso molecular entre 208.000 y 270.000 Da, y esta compuesta por cuatro a seis subunidades (Hudson &

Daniel, 1993). Se ha propuesto que la NAD-GDH tiene un papel importante en la asimilación de amonio en mitocondrias de semillas de maíz y que puede constituir una fuente adicional de glutamato para mantener la reacción de la GS (Yamaya & Suzuki, 1984). También se ha descrito que la GDH tiene función anabólica bajo condiciones de estrés por altas concentraciones de amonio (Givan, 1979). Por el contrario, experimentos realizados con mutantes de *Arabidopsis* para la isoenzima *GDH1*, revelaron que la enzima podría cumplir una función tanto anabólica como catabólica. En otras especies de plantas, se ha sugerido que la GDH podría tener un papel complementario a la GS para la reasimilación de amonio bajo condiciones de exceso del mismo (Loulakakis *et al.*, 1994). Por otra parte, también puede funcionar en la dirección catabólica para ayudar a mantener la relación carbono/nitrógeno (C/N) y proporcionar carbono al ciclo de los ácidos tricarbónicos bajo condiciones de déficit de carbono (Robinson *et al.*, 1992; Purnell & Botella, 2007).

La GDH mejor caracterizada es la de organismos vertebrados, puede ser dependiente de NAD y NADP y se ha purificado en diversas especies a partir de diferentes tejidos como riñón, corazón, cerebro, mucosa intestinal, etc. Es una enzima de la matriz mitocondrial y realiza una doble función, tanto catabólica como anabólica según las necesidades celulares, al igual que en plantas. Aunque la mayor parte del glutamato es sintetizado vía transaminasas, se ha comprobado que en situaciones de exceso de amonio, la GDH puede funcionar como vía de síntesis de dicho aminoácido (Kanamori & Ross, 1995), o como mecanismo de detoxificación celular. En el sentido catabólico la enzima funciona cuando se requiere 2-oxoglutarato, o cuando por exceso de glutamato es necesario el reciclaje de este aminoácido (Plaitakis *et al.*, 2000).

7.4 Glutamato deshidrogenasa en cianobacterias

Diversas estirpes de cianobacterias han mostrado actividad GDH (Neilson & Doudorof, 1973; Chávez *et al.*, 1999). Se han purificado y caracterizado las NADP-GDH (Florencio *et al.*, 1987) y NAD-GDH (Chávez & Candau, 1991) de *Synechocystis*, obteniendo valores de K_m para el amonio de la GDH-NADP de 1 a 3 mM, sugiriendo que la enzima tiene una función anabólica (Muro-Pastor & Florencio, 2003). Para la NAD-GDH la K_m para el amonio es 3,7 mM y 12 mM para el glutamato. La actividad NADP-GDH se estimula por la presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} . Por otra parte en presencia de distintas fuentes de nitrógeno no presenta ninguna alteración, solo se observa aumento de actividad cuando el cultivo se encuentra en la fase estacionaria de crecimiento. No obstante en experimentos con mutantes de *Synechocystis* para el gen *gdhA* se observó que las células podían desarrollarse en presencia de amonio, lo que sugiere que dicho amonio fue asimilado vía GS/GOGAT y que la carencia de GDH no fue determinante (Chávez *et al.*, 1995).

En *Prochlorococcus* el gen *gdhA* se encuentra en los genomas de las estirpes MIT9303 y MIT9303, representantes del grupo de profundidad, y en las estirpes MIT9215 y MIT9515, representantes del grupo de superficie. Esta característica ha despertado nuestro interés por el estudio de la función de la glutamato deshidrogenasa en *Prochlorococcus*, especialmente porque el gen se ha conservado únicamente en 4 de la 12 estirpes secuenciadas hasta el momento. De otra parte, analizando las secuencias de los genes, observamos que entre las dos estirpes de profundidad existe casi un 100% de homología. Así mismo ocurre con las dos estirpes de superficie, sin embargo comparando entre estirpes de superficie y profundidad, se observa que en MIT9215 y MIT9515 el gen es un 50% más

pequeño que en MIT9303 y MIT9313. Es interesante conocer el papel fisiológico de la enzima con objeto de obtener información que permita explicar la razón por la que *Prochlorococcus* mantiene el gen *gdhA* en dichos genomas, y la relación con las adaptaciones a los diversos ambientes marinos en los que se desarrollan estas estirpes.

OBJETIVOS

1. Clonar y sobreexpresar el gen *cynS* y posterior purificación y caracterización de la cianasa de *Prochlorococcus* PCC 9511 para estudiar la posible utilización de cianato como fuente alternativa de nitrógeno.
2. Clonar y sobreexpresar del gen *gdhA* para caracterizar la enzima pura y su posterior aplicación para la detección de GDH mediante *Western blotting* en extractos de *Prochlorococcus* MIT9313.
3. Caracterizar y estudiar la regulación *in vivo* de la glutamato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* MIT9313 mediante la expresión génica, la actividad enzimática y la detección de proteína.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

En el presente trabajo se utilizaron tres estirpes de la cianobacteria marina *Prochlorococcus*: MIT9313 y SS120, no axénicas y representantes de las estirpes de profundidad obtenidas de la *Roscoff Culture Collection*, y PCC 9511, axénica y representante de las estirpes de superficie obtenida de la *Pasteur Culture Collection* del *Instituto Pasteur de Paris*.

2. CONDICIONES DE CULTIVO

2.1 Medio de cultivo

2.1.1 PCR-S11

Las células de *Prochlorococcus* se mantenían habitualmente en medio líquido PCR-S11 (Rippka *et al.*, 2000). Este medio se preparó utilizando como base agua de mar oligotrófica procedente del mar Mediterráneo y proporcionada por el Instituto Español de Oceanografía, recolectada por la tripulación del barco "Odón de Buen" a varios kilómetros de la costa de Málaga.

El agua se filtró con un porta filtro *Stainless Steel 90 mm Filter Holder* mediante un filtro de membrana MF de 0,22 µm y 90 mm de diámetro, y un prefiltro de fibra de vidrio AP15 de 75 mm de diámetro, todos de *Millipore*.

El agua se bombeó a través de los filtros utilizando una bomba multicanal PD 5001 de *Heidolph*.

Una vez filtrada el agua se esterilizó mediante autoclave a 120°C durante 20 min. Tras la esterilización, cuando el agua alcanzó una temperatura de 20°C se añadieron las soluciones de enriquecimiento indicadas en la tabla 5.

La solución de EDTA-Na₂/FeCl₃ se preparó disolviendo por separado 1,080 g de FeCl₃.6H₂O en 40 mL de HCl 0,1 N y 1,488 gr de EDTA-Na₂ en 40 mL de NaOH 0,1 N, después se mezclaron y se completó el volumen hasta 2 L. La solución de metales traza *Gaffron* se preparó previamente según la tabla 6.

Tabla 5. Concentración de las soluciones de enriquecimiento para el medio PCR-S11

| Soluciones de enriquecimiento | Cantidad a adicionar a 1 litro de agua de mar | Concentración final |
|--|--|----------------------------|
| Tampón Hepes-NaOH 1M pH 7,5 | 1 mL | 1 mM |
| EDTA-Na ₂ /FeCl ₃ 2mM | 1 mL | 2 µM |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ 400 mM | 1 mL | 400 µM |
| Tamón fosfato 50 mM pH 7,5 | 1 mL | 50 µM |
| Metales traza (<i>Gaffron</i>) | 0,1 mL | - |

Todas las soluciones stock se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 min y se conservaron a 4°C. Tras añadir las diferentes soluciones de enriquecimiento al agua de mar estéril, se filtró de nuevo como se describe anteriormente con el equipo de filtración también estéril. El medio PCR-S11 se conservó a temperatura ambiente.

2.2 Métodos standard de cultivo y mantenimiento de estirpes

Las diferentes estirpes utilizadas se cultivaron en frascos *Sarstedt* de poliestireno transparentes para cultivo celular con un volumen de 50 mL en medio PCR-S11 anteriormente descrito. Los cultivos se mantenían bajo iluminación continua de 4 y 40 µE m² s⁻¹, para las estirpes de baja y alta irradiancia respectivamente, obtenida mediante tubos fluorescentes *SYLVANIA® standard F18W/154-T8 Daylight*, cubiertos con papel transparente azul *Moonlight Blu 183 de Lee Filters*. La

temperatura de la cámara de incubación se mantuvo constante a 24°C. Las estirpes cultivadas se refrescaban diluyendo 1/5 con PCR-S11 cuando la absorbancia a 674 nm alcanzó 0,05 unidades, aproximadamente entre 4 y 5 días.

Tabla 6. Composición de la solución de metales traza Gaffron + Se

| Producto | Ref. MERCK | mg/L⁽¹⁾ | Conc. Stock | Conc. final (nM) |
|--|-------------------|---------------------------|--------------------|-------------------------|
| H ₃ BO ₃ | 165 | 168 | 3 mM | 300 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 5963 | 101 | 0,6 mM | 60 |
| Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O | 667 | 1,98 | 6 μM | 0,6 |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O | 1182 | 5,16 | 4,2 μM | 0,42 |
| KBr | 4905 | 7,14 | 60 μM | 6 |
| KI | 5043 | 4,98 | 30 μM | 3 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8883 | 17,25 | 60 μM | 6 |
| Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | 2019 | 9,25 | 30 μM | 3 |
| Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 2554 | 8,76 | 30 μM | 3 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 2790 | 7,5 | 30 μM | 3 |
| NiCl ₂ .6H ₂ O | 6717 | 7,1 | 30 μM | 3 |
| Cr(NO ₃) ₃ .9H ₂ O | 2481 | 2,4 | 6 μM | 0,6 |
| VOSO ₄ .5H ₂ O | 8503 | 1,5 | 6 μM | 0,6 |
| KAl(SO ₄) ₂ .12H ₂ O | 1047 | 28,4 | 60 μM | 6 |
| SeO ₂ | 800653 | 3,3 | 30 μM | 3 |

(1) Cantidad en mg añadida a 1 litro de solución madre



Figura 13. Fotografía cámara de cultivo de *Prochlorococcus*

2.3 Medios y condiciones especiales de cultivo

Los experimentos se realizaron en volúmenes de cultivo de 10 y 20 litros. Éstos se obtenían aumentando progresivamente su volumen en frascos de paredes transparentes *Nunclon Surface* de policarbonato de *Nalgene* desde 50 mL a 1L, 4 L, 10 L y 20 L, cuando la A_{674} alcanzó 0,05 unidades. La obtención de cultivos de 20 L ocurría después de 25 a 30 días tras el aumento progresivo del volumen de los mismos.

2.3.1 Crecimiento en cianato como fuente de nitrógeno

Para estudiar la capacidad de *Prochlorococcus* de utilizar cianato como fuente orgánica de nitrógeno, se realizó una dilución 1/5 de un cultivo con una absorbancia a 674 nm de 0,05 unidades en medio PCR-S11, al que se le reemplazó el amonio

como fuente habitual de nitrógeno por cianato a una concentración final de 800 μM de nitrógeno.

2.3.2 Efecto de inhibidores

Los experimentos en los que se analizó el efecto del DCMU se realizaron añadiendo 7 $\mu\text{L/L}$ de una disolución 10 mg/mL en medio PCR-S11. La concentración final del inhibidor fue 0,3 μM .

El efecto del DBMIB se analizó añadiendo 2 $\mu\text{L/L}$ de una disolución 10 mg/mL en metanol. La concentración final del inhibidor fue de 0,06 μM

Para analizar el efecto de la azaserina y del MSX se pesó la cantidad necesaria para obtener una concentración final en el cultivo de 100 μM .

2.3.3 Efecto de la ausencia de nutrientes

Los experimentos en los que se estudió el efecto de la ausencia de nutrientes se realizaron de la siguiente forma: cultivos de *Prochlorococcus* con una absorbancia a 674 nm de 0,05 unidades se centrifugaron a 18.600 g durante 5 min a 24°C, en frascos de policarbonato (*Beckman coluter*) de 500 mL estériles, correspondientes al rotor JLA 10.5 para una centrífuga *Beckman Avanti J25*. Después de recogido el volumen necesario, se realizó un lavado del precipitado que consistió en añadir a cada frasco 500 mL de medio PCR-S11 sin Fe, P y N. A continuación se centrifugó nuevamente a 18.600 g durante 5 minutos a 24°C. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en un volumen igual al del cultivo recogido en cada frasco, utilizando el medio PCR-S11 sin el nutriente deseado en cada caso. El cultivo que sirvió como control se sometió al mismo procedimiento y se resuspendió en medio PCR-S11.

2.3.4 Utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno

Cultivos de 20 L de la estirpe MIT9313 con una absorbancia a 674 nm de 0,05 unidades se centrifugaron a 18.600 g durante 10 minutos a 24°C, en 4 frascos de policarbonato (*Beckman coulter*) de 500 mL estériles, utilizando un rotor JLA 10.5 y una centrífuga *Beckman Avanti J25*. Recogido el volumen total se lavaron las células con medio PCR-S11 sin nitrógeno, centrifugando bajo las mismas condiciones anteriores. El precipitado obtenido se resuspendió así: dos frascos con 8 litros de medio PCR-S11 y los otros dos frascos con 8 litros de medio PCR-S11 con glutamato a una concentración final en cultivo de 800 µM.

2.4 Crioconservación de las estirpes de *Prochlorococcus*

Cultivos de 50 mL con una absorbancia a 674 nm de 0,05 unidades se centrifugaron a 7.700 g durante 15 min a 20°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de medio PCR-S11 y se transfirió a tubos *Eppendorf* de 1,5 mL. Seguidamente se adicionó DMSO al 7,5 %(v/v) y se mezcló suavemente por inversión. Los tubos se congelaron en nitrógeno líquido y conservaron a – 80°C (Moore *et al.*, 2007).

La recuperación de las estirpes se realizó en oscuridad y en condiciones de esterilidad pasando una pequeña cantidad de células del stock congelado, mediante un asa de siembra estéril a 25 mL de medio PCR-S11. Los cultivos se mantenían bajo condiciones de baja iluminación en la cámara de cultivo. El tiempo de recuperación varió entre 1 y 2 meses.

3. MÉTODOS DE RECOGIDA DE CÉLULAS

Las células se recogieron cuando la densidad óptica de los cultivos alcanzó 0,05 unidades de absorbancia a 674 nm, o cuando finalizaban los tiempos de tratamiento según el experimento. Centrifugando los cultivos a 4°C en frascos de policarbonato de 250 mL o 500 mL de *Beckman Coulter*, durante 5 min a 30.000 g y durante 8 min a 18.600 g, respectivamente.

Las células obtenidas de los experimentos en los que se utilizaron inhibidores como azaserina, DCMU, DBMIB y MSX, se lavaron con medio PCR-S11 fresco antes de resuspender el precipitado para su conservación, así se eliminaron restos de inhibidor que pudiesen afectar posteriores mediciones.

4. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS

Los precipitados obtenidos por centrifugación, como se describe en el apartado anterior, se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a razón de 2 mL de tampón por litro de cultivo. Para los extractos que se utilizarían en la realización de *Western blotting* se resuspendieron a razón de 0,5 mL de tampón por litro de cultivo. Seguidamente se almacenaron en tubos *Eppendorf* a – 80°C.

Para obtener los extractos crudos se utilizaron dos métodos de rotura celular dependiendo de la utilización que se le daría a cada extracto.

4.1 Rotura celular con prensa de French

El método de rotura celular mediante prensa de French se utilizó teniendo en cuenta que mediante congelación/descongelación no fue posible la detección de

actividades enzimáticas (GDH o cianasa), distinto a lo ocurrido cuando se utilizó la prensa. Además en experiencias previas por miembros de nuestro grupo la obtención y estabilidad de las proteínas es mayor mediante la prensa. Teniendo en cuenta lo anterior, dicho método fue necesario cuando los extractos crudos se utilizaron para realizar *Western blotting* y medidas de la actividad cianasa y GDH. Las suspensiones celulares se descongelaron en cubetas con hielo para su posterior rotura. Las células descongeladas se rompieron en una prensa de French *AMINCO* modelo *FA-079*. Después de romper las células los tubos se centrifugaron a 16.000 g por 5 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se extrajo mediante una pipeta y se pasó a un tubo nuevo para posteriores utilidades en SDS-PAGE y preparación de mezclas de reacción para las medidas de la actividad cianasa y GDH.

4.2 Rotura celular con perlas de vidrio

El método de rotura celular mediante perlas de vidrio se utilizó cuando los extractos crudos se destinaron para medir la actividad enzimática de la glutamato deshidrogenasa; éste permitió un mayor rendimiento de los cultivos en épocas de limitación de los mismos. Se mezclaron 320 µL de suspensión celular y 180 mg de perlas de vidrio *B. Braun Melsungen AG* de 0,10 – 0,11 mm de diámetro. Seguidamente la mezcla se agitó a máxima velocidad durante 1 min y se incubó durante 1 min en hielo. El procedimiento de agitación-incubación se repitió 7 veces. Luego la mezcla se centrifugó a 16.000 g por 5 minutos a 4°C. El extracto crudo se obtuvo tras extraer con una pipeta el sobrenadante, a partir de éste se prepararon las mezclas de reacción para las medidas de la actividad enzimática de la glutamato deshidrogenasa.

5. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

5.1 Medida del crecimiento de *Prochlorococcus*

Previamente en nuestro grupo se observó la relación entre la concentración aproximada de células en el medio y la absorbancia a 674 nm (El Alaoui *et al.*, 1999), longitud de onda a la que *Prochlorococcus* presenta su máximo de absorbancia. Teniendo en cuenta esto, para el seguimiento habitual del crecimiento de los cultivos se tomaron alícuotas de 1 mL y a continuación se midió la absorbancia a 674 nm.

5.2 Medida del espectro de fluorescencia de cultivos de *Prochlorococcus*

Con objeto de controlar la identidad de los cultivos de *Prochlorococcus* para la realización de los diferentes ensayos, se tuvo en cuenta que este organismo posee una relación $Chla_2/Chlb_2$ diferente entre estirpes de superficie y estirpes de profundidad. Esta característica hace que las estirpes de profundidad, relación igual a 1, exhiban un espectro de fluorescencia diferente a las estirpes de superficie, relación menor que 0,3. El espectro de fluorescencia permitió la diferenciación de las estirpes tomando alícuotas de 1 mL de los cultivos y midiendo el espectro de excitación desde 375 nm hasta 650 nm, fijando la longitud de emisión a 680 nm, en cubetas de cuarzo 101-QS 10 mm de *Hellma* y utilizando un fluorímetro *Perkin-Elmer* LS 50B. Los espectros obtenidos para estirpes de superficie y profundidad se muestran en la siguiente figura.

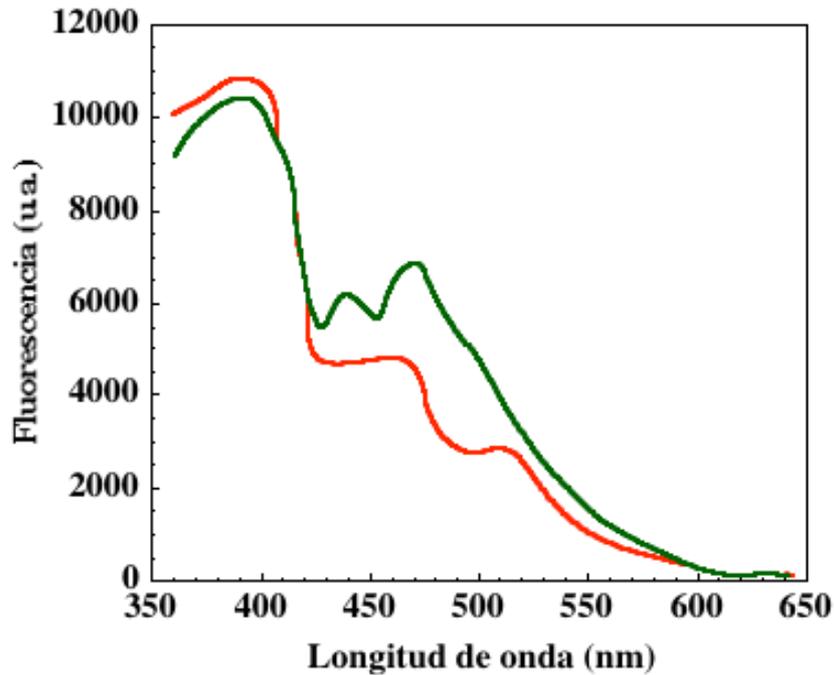


Figura 14. Espectros de fluorescencia típicos de estirpes de superficie y profundidad. Las líneas corresponden a PCC 9511, representante de superficie (rojo) y MIT9313, representante de profundidad (verde).

5.3 Cuantificación de proteína

Se utilizó el kit *Protein Assay* de *Bio-rad* basado en el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando como patrón ovoalbúmina y determinando la absorbancia a 595 nm después de 15 min de incubación a temperatura ambiente.

5.4 Cuantificación de amonio en cultivos y agua de mar

La cuantificación de amonio se determinó por el Método Nessler (Morrison, 1971). Se mezclaron 500 μ L de muestra y 500 μ L de Reactivo Nessler diluido 1:3 en agua destilada. Después de 10 min de incubación se midió la absorbancia a 420 nm y se calculó la concentración de amonio según la recta patrón previamente obtenida utilizando sulfato de amonio.

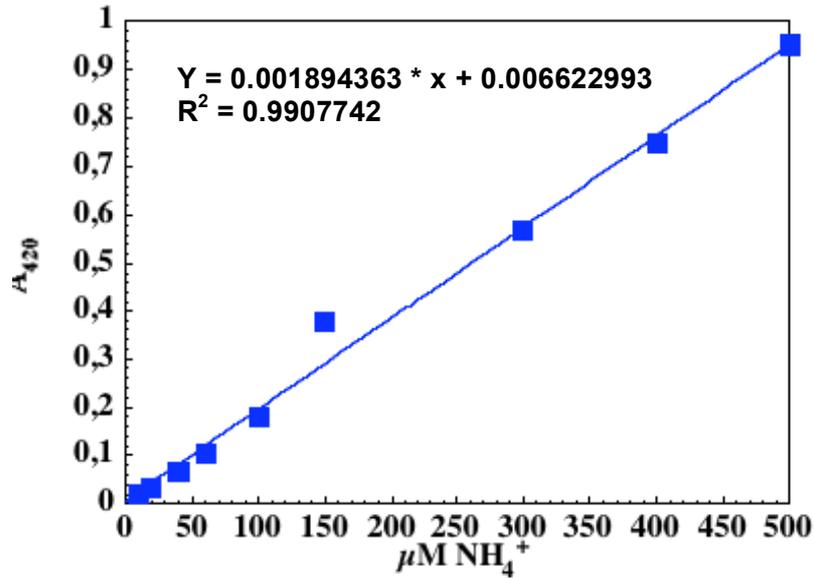


Figura 15. Recta patrón del método Nessler para medir amonio en cultivos y agua de mar.

5.5 Determinación de la concentración de cianato en cultivos

Este método se basó en la conversión de cianato a amonio en medio ácido y posterior determinación de amonio. Para determinar la concentración de cianato en cultivos se tomaron dos alícuotas, una de 500 μL y otra de 900 μL . Con los 500 μL de cultivo se midió la concentración de **amonio inicial** por el método Nessler como se describe en el apartado anterior. A las alícuotas de 900 μl se les añadió 100 μL de HCl 6 N y se incubaron a 100°C durante 1 minuto. A continuación a partir de la mezcla sometida a tratamiento térmico, se tomó una alícuota de 500 μL y se midió el **amonio final** por el método Nessler. La diferencia entre el **amonio final** y el **amonio inicial** nos dará la cantidad de amonio total producido tras la conversión de cianato a amonio en el tratamiento con calor y HCl. Aproximadamente por cada mol de cianato se formó un mol de amonio. La recta patrón se calculó utilizando como patrón cianato potásico (figura 16).

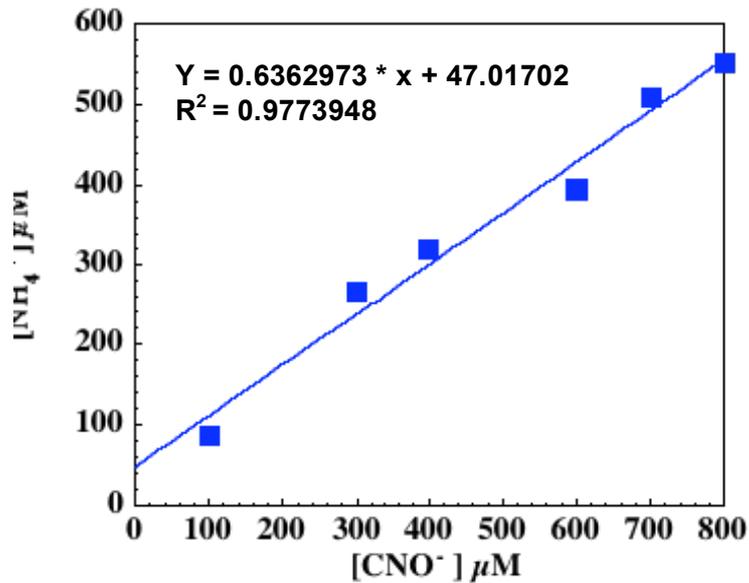


Figura 16. Recta patrón para la cuantificación de cianato en cultivos

5.6 Determinaciones enzimáticas

5.6.1 Determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa aminante

La actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) en el sentido aminante se ensayó *in vitro* como se ha descrito para la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae* F-5-2, y para la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (Florencio *et al.*, 1987; Chávez & Candau, 1991; Young-Ju *et al.*, 2002). La actividad GDH se determinó en función del NAD(P)H oxidado en la reacción utilizando un espectrofotómetro *Beckman* DU 640, a 340 nm durante 10 minutos a una temperatura de 35°C. La mezclas de reacción contenían: tampón Tris-HCl 85 mM pH 8,0, 2-oxoglutarato 100 mM, NADH 0,2 mM (para la actividad NADH-GDH) ó NADPH 0,2 mM (para la NADPH-GDH), y 40 μ L de extracto crudo de *Prochlorococcus* MIT9313. La reacción se inició añadiendo NH_4Cl 100 mM. Se utilizó como control negativo una mezcla de reacción sin cloruro de amonio.

Una unidad de actividad NAD(P)H-GDH en el sentido aminante se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de NAD(P)H por minuto en las condiciones de ensayo.

5.6.2 Determinación de la actividad glutamato deshidrogenasa desaminante

La actividad glutamato deshidrogenasa en el sentido desaminante se midió *in vitro* como se ha descrito para la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (Florencio *et al.*, 1987; Chávez & Candau, 1991). La mezcla de reacción para la determinación de la actividad GDH en el sentido desaminante contenía: Tris-HCl 50 mM pH 9,0, L-glutamato 50 mM, NAD(P⁺) 2 mM, 40 μL de extracto de *Prochlorococcus* MIT9313. La actividad GDH desaminante se determinó en función de la formación del NAD(P)H, para ello se midió el incremento en la absorbancia un espectrofotómetro *Beckman* DU 640 a 340 nm durante 30 minutos, a una temperatura de 35°C. El control negativo utilizado no contenía L-glutamato. La actividad GDH en el sentido desaminante se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μmol de NAD(P)H por minuto bajo las condiciones de ensayo.

5.6.3 Determinación de actividad cianasa

La hidrólisis de cianato catalizada por la cianasa de *Prochlorococcus* PCC 9511 fue determinada midiendo la formación de amonio mediante el método Nessler (Morrison, 1971). La mezcla de reacción contenía NaHCO₃ 3 mM, cianato potásico 2 mM, tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,0 y 50 μL de extracto crudo de *Prochlorococcus* PCC 9511, en un volumen final de 2 mL. La reacción se inició al añadir el cianato potásico. Inmediatamente se tomó una alícuota de 500 μL a la que

se le añadió 500 μL de reactivo Nessler diluido 1:3. El resto de la mezcla se incubó a 37°C durante 40 min. Trascurrido el tiempo se tomó una alícuota de 500 μL para medir el amonio formado tras la incubación. La actividad cianasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para formar 1 μmol de amonio por minuto bajo las condiciones de ensayo.

5.6.4 Análisis de cultivos de *Prochlorococcus* mediante citometría de flujo

Teniendo en cuenta que únicamente la estirpe PCC 9511 es axénica, se utilizó la citometría de flujo para comprobar el porcentaje de organismos contaminantes con respecto a *Prochlorococcus*. Muestras de 1 mL de cultivo se inyectaron en un citómetro de flujo *Epics XL* de *Beckman Coulter*. Los datos se obtuvieron utilizando el programa *Expo 32 v1.1. ADC* de *Beckman Coulter* durante el paso de 10.000 partículas a flujo lento.

Para el calibrado del equipo se utilizaron microesferas fluorescentes de 1 μm de diámetro *Flow Check High Intensity Green Alignment* de *Polysciences, Inc.* Dichas microesferas se observaron con el filtro de fluorescencia verde (FL1). La solución de microesferas se preparó justo antes de su utilización añadiendo 1 gota a 5 mL de agua destilada filtrada. A las muestras se les añadió 1 μL de esta solución por cada mL de cultivo como control interno. Teniendo en cuenta la composición de pigmentos que contiene *Prochlorococcus*, se analizó la fluorescencia roja (FL4), para los pigmentos que emiten entre 600 y 700 nm. Por otra parte se tuvo en cuenta el *forward scatter*, este parámetro consiste en la cantidad de luz procedente del láser recogida tras pasar a través de la muestra sin penetrar en la partícula por lo que puede considerarse proporcional al tamaño de dicha partícula.

Los resultados se analizaron utilizando el programa *Expo 32 v1.1 Analysis* de *Beckman Coulter*. En la figura 17 se muestra una cultivo típico de *Prochlorococcus* MIT9313, en el recuadro de la figura 17B se observa la fracción correspondiente a *Prochlorococcus*, según el análisis estadístico representa un 96% del cultivo.

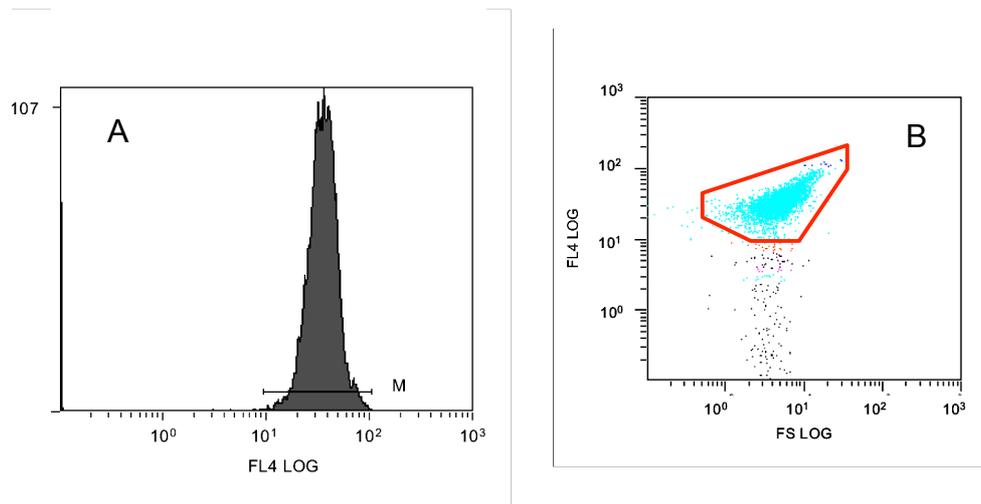


Figura 17. Perfil de *Prochlorococcus* MIT9313 en el citómetro de flujo. (A) Histograma que representa la fluorescencia roja (FL4) emitida por los pigmentos de *Prochlorococcus*. (B) Representación de la fluorescencia roja (FL4) frente al tamaño de la células (forward scatter).

6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1 Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Para la electroforesis en geles de acrilamida bajo condiciones desnaturizantes se utilizó una cubeta Mini Protean III de *Bio-Rad*, con geles separadores al 12% y geles concentradores al 4% con un grosor de 1,5 mm. La composición de los geles se describe en la tabla 7.

Para llevar a cabo el tratamiento desnaturalizante, las muestras se incubaron a 100°C en un baño termostatzado durante 5 minutos con el tampón de tratamiento SDS-PAGE (Tabla 8) al 50%. Seguidamente se enfriaron las muestras y se centrifugaron durante unos segundos. En cada pocillo del gel se cargaron 13-20 µg de proteína en un volumen final de 40 µL.

Tabla 7. Composición de los geles de acrilamida para SDS-PAGE

| Componentes | Gel separador (mL) 12% | Gel concentrador (mL) 4% |
|---|---|---|
| Agua destilada | 6,6 | 6,1 |
| Tampón | Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 5 | Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 2,5 |
| SDS 10% | 0,2 | 0,1 |
| Poliacrilamida 30% * | 8 | 1,3 |
| La solución se desgaseó con una bomba de vacío (Eyela, A-3S) durante 10 minutos | | |
| Persulfato de amónico 10% (p/v) | 0,2 | 0,1 |
| TEMED | 0,008 | 0,01 |

* La poliacrilamida se preparo al 30% con acrilamida al 29,2 % (p/v) y N-N-bismetilacrilamida al 0,8 % (p/v). La solución acuosa se filtró y se conservó en oscuridad a 4°C durante 30 días.

Tabla 8. Composición del Tampón de tratamiento SDS-PAGE

| Componentes | Volumen (mL) |
|--|---------------------|
| Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 | 0,5 |
| SDS 10% | 0,8 |
| Glicerina | 0,4 |
| Azul de Bromofenol al 0,05 % (p/v) | 0,1 |
| β-mercaptoetanol (añadido antes de utilizar el tampón) | 0,45 |

En caso de necesitar diluir la muestra para alcanzar la concentración de proteína deseada se utilizó Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Como marcadores de peso molecular se cargaron 10 µL de *Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range* de *Bio-Rad* para los *Western blotting* o 10 µL de *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* para la SDS-PAGE.

La electroforesis se llevó a cabo en un tampón compuesto por: Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 1% (p/v) a pH 8,3. Se aplicó un voltaje constante de 100 V mediante una fuente *Power Pac 300* de *Bio-Rad*, durante un tiempo aproximado de 2 horas y media.

6.2 Tinción de proteínas en geles de acrilamida

Los geles de acrilamida se tiñeron con una solución al 0,1% (p/v) de azul de *Coomasie R-250*, 40% de metanol y 10% de ácido acético. El tiempo de tinción varió entre 1 hora como mínimo y 24 horas como máximo, a temperatura ambiente y agitación suave. Seguidamente se destiñeron los geles incubando a temperatura ambiente, con agitación suave y una solución acuosa al 40% (v/v) de metanol y 10% (v/v) de ácido acético.

Tras desteñir los geles, se observaron y fotografiaron mediante un transiluminador *GenGenius Bio Imagin System* de *Syngene* mediante luz blanca. Las imágenes se trataron y analizaron utilizando el programa informático *GeneSnap GeneGenius* de *SynGene v4.00.0*.

6.3 Análisis de proteínas mediante *Western blotting*

6.3.1 Electrotransferencia de proteínas

Después de la electroforesis SDS-PAGE las proteínas se transfirieron desde los geles a membranas de nitrocelulosa. Este procedimiento se realizó de forma húmeda o semiseca, con objeto de optimizar la técnica y obtener una mejor resolución en la detección de la GDH.

6.3.1.1 Electrotransferencia húmeda

Para la transferencia húmeda se utilizó el *Mini Trans Blot Cell* de *Bio-Rad*. El tampón de transferencia contenía Tris base 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,2 y un 20% de metanol (v/v). Los geles de poliacrilamida, las membranas de nitrocelulosa de 6 x 4 cms, con 0,22 μ m de tamaño de poro proporcionadas por *Sigma* y 6 piezas de papel *Whatman* tipo 1 de 3 mm de grosor y tamaño 6 X 4 cms, se sumergieron en el tampón de transferencia. A continuación, manteniendo todos estos elementos dentro del tampón, se realizó el montaje dentro del *cassete* portagel como sigue, 3 piezas de papel *Whatman*, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y finalmente 3 piezas de papel *Whatman*. El *cassete* se colocó dentro del módulo de transferencia y éste se introdujo dentro del tanque contenedor con tampón de transferencia. El gel se orientó hacia el cátodo y la membrana hacia el ánodo. La transferencia se llevó a cabo a una intensidad de 150 mA durante 1 hora mediante una fuente *Power Pac 300* de *Bio-Rad*.

6.3.1.2 Transferencia semiseca

La transferencia semiseca se realizó mediante el *Trans Blot SD Semy-Dry Transfer Cell* de *Bio-Rad*. El tampón de transferencia semiseca estaba compuesto por Tris

base 50 mM, glicina 40 mM, 0,04% de SDS (p/v) y 20% de metanol. Finalizada la SDS-PAGE, los geles de poliacrilamida, 6 piezas de 6 x 4 cm de papel *Whatman* tipo I de 3 mm de grosor y las membranas de nitrocelulosa de 6 x 4 cm con 0,22 μ m de tamaño de poro proporcionadas por *Sigma*, se incubaron con tampón de transferencia durante 15 minutos a temperatura ambiente y agitación suave. Seguidamente se procedió al montaje del *sandwich* desde el cátodo hacia el ánodo como sigue, 3 piezas de papel *Whatman*, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, y 3 piezas de papel *Whatman*. Mediante una varilla de vidrio se eliminaron por presión las burbujas existentes dentro del *sandwich*. Finalmente se cubrió el montaje con la tapa de seguridad y se mantuvo durante 1 hora a 10 V mediante una fuente *Power Pac 300* de *Bio-Rad*.

6.3.2 Sistemas de revelado

6.3.2.1 Revelado mediante fosfatasa alcalina

Tras la transferencia a las membranas de nitrocelulosa, se procedió a bloquear los grupos reactivos de éstas, adicionando 20 mL de solución de bloqueo constituida por TBS-T y 2 % leche en polvo de *Bio-Rad*. El bloqueo se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. El TBS-T estaba compuesto por Tris base 10 mM, cloruro sódico 0,1 M y 0,1 % de Tween 20 (v/v) a pH 7,5. Finalizado el tiempo de bloqueo, las membranas se lavaron con TBS-T durante 5 minutos, tres veces. A continuación la membrana se incubó 12 horas con el anticuerpo primario (anti-GDH) diluido 1:500 (v/v) a 4°C. El anticuerpo primario fue obtenido durante el desarrollo de la tesis como describe en el apartado 10. Al cabo de 12 horas de incubación se repitió el lavado de las membranas con TBS-T durante 5 minutos, 3 veces. Luego se añadió el anticuerpo secundario obtenido en cabra frente a la

inmunoglobulina G de conejo y conjugado con fosfatasa alcalina de conejo proporcionado por *Sigma*. El anticuerpo secundario se utilizó a una dilución 1:2000 (v/v) en TBS-T y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Seguidamente se repitieron los lavados de 5 minutos con TBS-T y se adicionó a la membrana la mezcla de reacción para la fosfatasa alcalina (Tabla 9). Las membranas se incubaron con esta mezcla hasta que se observaron las bandas respectivas, en ese momento se detuvo la reacción descartando la mezcla y añadiendo agua destilada en abundancia.

Tabla 9. Composición mezcla de reacción para revelado con fosfatasa alcalina

| Componentes | Volumen |
|---|----------------|
| Etanolamina 0,1 M pH 9,5 | 20 mL |
| BCIP | |
| Bromo-cloro-indolil fosfato (25 mg/ml en dimetilformamida al 70% v/v) | 120 µL |
| NBT | |
| Solución de nitroazul de tetrazolium (50 mg/ml en dimetilformamida al 70% v/v) | 120 µL |

* La mezcla de reacción se preparó segundos antes de adicionarla a las membranas.

6.3.2.2 Revelado con peroxidasa

Después de transferir las proteínas a las membranas de nitrocelulosa, se procedió a bloquear los grupos reactivos de la nitrocelulosa adicionando una solución de TBS-T con 2% de leche en polvo de *Bio-Rad*. Las membranas se incubaron con esta solución durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave. Seguidamente se procedió a lavar con TBS-T 3 veces durante 15 minutos y 3 veces

durante 5 minutos. Una vez lavadas las membranas se añadió el anticuerpo primario (anti-GDH) en una dilución 1:250 (v/v) en TBS-T, y se incubó a 4 °C durante 16 horas con agitación suave. A continuación se repitió el lavado anterior con TBS-T. Tras el lavado se añadió el anticuerpo secundario (anticuerpo frente a inmunoglobulina G de conejo y conjugado con peroxidasa, de *Bio-Rad*) en dilución 1:3000 (v/v) en TBS-T, y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente y agitación suave. Posteriormente se repitió el lavado con TBS-T 3 veces durante 15 min y 3 veces durante 5 min. Para revelar las membranas se utilizó el kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* de *Pierce* siguiendo las instrucciones del fabricante. Pasados 2 minutos de incubación con el reactivo revelador se expusieron las membranas en el equipo *GeneGnome Syngene Bio Imaging*. Las imágenes se capturaron cada 10 s durante 2,5 min de exposición total utilizando el software *GeneSnap GeneGenius* de *Syngene v4.00.0*.

6.4 Cuantificación de la intensidad de las bandas

Una vez capturadas la imágenes la intensidad de banda correspondiente se cuantificó utilizando los programas *GeneSnap* y *GeneTools* de *Syngene v 4.00.0*.

7. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

7.1 Aislamiento de ADN genómico de *Prochlorococcus*

7.1.1 Volúmenes pequeños de cultivo

Para la obtención de ADN genómico de *Prochlorococcus*, cultivos de 50 mL en fase exponencial de crecimiento se centrifugaron a 27.000 g, durante 10 min a 4°C. El

precipitado obtenido se resuspendió en 400 μL de tampón TE (Tabla 10) y se transfirió a un tubo *Eppendorf* de 1,5 mL.

Seguidamente se añadieron 150 μL de perlas de vidrio *B. Braun Melsungen AG* de 0,10-0,11 mm de diámetro, 20 μL de SDS al 10% (p/v), 225 μL de fenol (pH 6,6) y 225 μL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1.

Tabla 10. Composición del tampón TE

| Componentes | Volumen (μl) |
|-------------------------------|---|
| Tris-HCl 50 mM pH 7,5 | 200 |
| EDTA 0,5 M pH 8,0 | 1 |
| Agua destilada y esterilizada | 800 |

Luego se agitó la mezcla en un agitador vortex durante 1 min y se incubó en hielo durante 1 min, repitiendo este procedimiento 4 veces. A continuación se centrifugó a 24.000 g durante 15 min a 4°C. Finalizada la centrifugación se transfirió la fase superior a un nuevo *Eppendorf* de 1,5 mL. Al nuevo tubo se añadieron 250 μL de fenol (pH 6,6) y 250 μL de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, y se lavó centrifugando a 24.000 g durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se extrajo de nuevo la fase superior a un *Eppendorf* de 2 mL, se añadió etanol absoluto frío y se incubó a -20°C durante 2 a 3 horas. Pasado este tiempo, se centrifugó la mezcla a 24.000 g durante 30 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el tubo bajo cabina de flujo laminar para eliminar por evaporación los restos de etanol. Obtenido el ADN se incubó en 50 μL de agua destilada estéril a 4°C durante aproximadamente 24 horas para solubilizar el ADN genómico.

Mediante este método se obtenían unos 15 μg de ADN genómico a partir de 50 mL de cultivo.

7.1.2 Grandes volúmenes de cultivo

En circunstancias en las que fue necesaria una cantidad superior a 50 µg de ADN genómico se obtuvo ADN a partir de 1 litro de cultivo. Inicialmente el cultivo se distribuyó en frascos de 250 mL y se centrifugó durante 5 min a 30.000 g a 4°C.

El precipitado obtenido se resuspendió en 0,5 mL de tampón SET frío el cual estaba compuesto por Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, EDTA 1 mM y 25% de sacarosa (v/v). La solución resultante se transfirió a un tubo *Falcon* de 12 mL estéril, y se le añadieron 2 mg de lisozima y 0,125 mL de EDTA 0,5 M pH 7,0. Seguidamente se incubó durante 1 h a 37°C con agitación suave. Después de este tiempo se adicionaron

0,5 mg de proteinasa K y el volumen necesario de SDS 10 % para alcanzar una concentración final de 2,5 %. La solución se incubó a 45°C durante toda la noche.

Al día siguiente, dicha solución se transfirió a un tubo Corex II estéril de 15 mL al que se añadió un volumen igual de una solución compuesta por fenol (pH 6,6), cloroformo y alcohol isoamílico en proporción 25:24:1. La mezcla se agitó en un vortex y centrifugó a 3.000 g durante 30 min a 4°C. El procedimiento de extracción con esta solución se repitió 3 veces. A continuación se realizó un lavado solo con cloroformo y alcohol:isoamílico 24:1.

La fase superior del tubo se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó un volumen igual de isopropanol para precipitar el ADN de forma visible, esto permitió tomar el material genético con una punta de pipeta estéril. El ADN se transfirió a un tubo nuevo con 50 µL de tampón TE (descrito en el apartado anterior) y se sometió a una precipitación con 5 µL de acetato sódico 3 M y 125 µL de etanol al 100%. La mezcla se incubó durante 2 horas a -20°C, pasado este tiempo se centrifugó a 24.000 g durante 15 min. A continuación se descartó el sobrenadante y se añadió

500 μ L de etanol frío al 70%. Con el fin de limpiar el ADN de sales se sometió a centrifugación durante 15 min a 24.000 *g*. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado bajo cabina de extracción para resuspenderlo en 100 μ L de agua destilada estéril dejándolo durante 24 horas a 4°C.

Utilizando ese método se obtenían unos 250 μ g de ADN genómico a partir de 1 L de cultivo.

7.2 Aislamiento de ARN total de *Prochlorococcus*

Las alícuotas de 500 mL tomadas en los diferentes experimentos y destinadas al análisis de la expresión génica se recogieron en frascos *Beckman* de 500 mL, se centrifugaron durante 8 min a 18.500 *g* y 4°C, en una centrífuga *Beckman Coulter Avanti J25* con un rotor JLA 10.5. El precipitado se resuspendió en 250 μ L de tampón de resuspensión para ARN constituido por acetato sódico 10 mM pH 4,5, sacarosa 200 mM y EDTA 5 mM. Las muestras se conservaron a – 80°C hasta la extracción. Para la extracción de ARN se utilizó el kit *Aurum Total RNA Mini Kit* de *Bio-Rad* siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.3 Cebadores

7.3.1 Diseño de cebadores

Las secuencias de los genes *gdhA*, que codifica para la glutamato deshidrogenasa de la estirpe MIT9313 y *cynS* que codifica para la cianasa en la estirpe PCC 9511, se obtuvieron de las bases de datos *Genbank* del *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), de la *Cyanobacteria Gene Annotation Database* (CYORF) (<http://cyano.genome.jp/>) y del *DOE Joint Genome Institute* (JGI) (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>). Los cebadores se

diseñaron mediante el programa *Oligo v4.05* de *National Biosciences Inc. Plymouth*, y fueron suministrados por *Sigma-Genosys Ltd*, e *Isogen Life Science*.

7.3.2 Cebadores para la amplificación del gen *cynS* de la estirpe PCC 9511

Las diferentes parejas de cebadores diseñados para la amplificación del gen *cynS* de la estirpe PCC 9511 se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 11. Cebadores para el gen *cynS* de *Prochlorococcus* PCC 9511

| Nombre | Secuencia (5' – 3') |
|---------------|----------------------------|
| FCEA | ATTAAGAGAAACAAGAGCAG |
| RCEA | AGATTATTTTTATGGAGGAC |
| FCEB | AGGAGGGATGAAACAAAGAG |
| RCEB | TACGACAAAGATGCGAAAAC |
| FCEC | AAGAGCAGTAGAAGAGGTGA |
| RCEC | TAGATTATTTTTATGGAGGA |
| FCED | AAACAAGAGCAGTAGAAGAG |
| RCED | TAGATTATTTTTATGGAGGA |
| FCEE | TGGACAGACCACGTGATAGC |
| RCEE | GGTCCATGCTTGAACAACC |

7.3.3 Cebadores para la amplificación del gen *gdhA* de la estirpe MIT9313

Para la amplificación del gen *gdhA* de *Prochlorococcus* MIT9313 se diseñó y utilizó una sola pareja de cebadores. Las secuencias en el sentido 5'→3' son:

FEGA: GCTGTTGTCTGTTTATTGCC

REGA: TTTGCTTGTCCCTTTTGATT

7.3.4 Cebadores para los estudios de expresión del gen *cynS* de la estirpe PCC9511

En la tabla 12 se muestran las parejas de cebadores diseñados para la amplificación de pequeños fragmentos del gen *cynS*, para los estudios de expresión de la cianasa en la estirpe PCC 9511.

Tabla 12. Cebadores para estudios de expresión del gen *cynS* en PCC 9511

| Nombre | Secuencia (5' – 3') |
|---------------|----------------------------|
| RT-FECA | CAAAAAAGGAAAAAATCTA |
| RT-RECA | GGAATAACAGGGTCTAAACA |
| RT-FECB | TAAAAGCAAAAAGGAAAAA |
| RT-RCEB | AGTGCGGCTATCAAAGAAGT |

7.3.5 Cebadores para los estudios de expresión en *Prochlorococcus* MIT9313

Para los estudios de expresión mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real se diseñaron cebadores para la amplificación de fragmentos de los genes *gdhA*, que codifica para la glutamato deshidrogenasa, y como control interno el gen *rnpB* que codifica para una ribonucleoproteína (Tabla 13).

Tabla 13. Cebadores para los genes *gdhA* y *rnpB* de la estirpe MIT9313

| Gen | Nombre | Secuencia (5' – 3') |
|-------------|---------------|----------------------------|
| <i>gdhA</i> | RT-FEGA | TTTTATTCTTTCCAACCGTG |
| | RT-REGA | CATCGGCAGACCAGTAAGAC |
| | RT-FEGB | GAGCGGATGACGGAACCTGA |
| | RT-REGB | CTTCCCTCCACCCATCGGCA |
| | RT-FEGC | TGCCTTCCCTTGTGCTACTC |
| | RT-REGC | ACGACTCCAAGATAGACGCA |
| <i>rnpB</i> | FRMP | CTATCTAGGACCGCCGTTAC |
| | RRPM | GAGAGTGCCACAGAAAAACA |

7.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mezcla de reacción para la amplificación de genes utilizando como sustrato células o genómico de *Prochlorococcus* se describe en la siguiente tabla.

Tabla 14. Mezcla de reacción para PCR

| Componentes | Concentración final (para 25 ó 50 μL) |
|-----------------------------|---|
| Tampón $MgCl_2$ 10X | 0,2 mM |
| Nucleótidos | 0,2 mM |
| Cebadores | 0,8 ng/ μ L |
| Células ⁽¹⁾ | 1 ó 2 μ L |
| ADN genómico ⁽²⁾ | 0,2-0,4 ng/ μ L |
| Polimerasa (1U/ μ l) | 0,5 o 1 U/ μ L |
| Agua destilada estéril | 18,5 ó 37 μ L |

⁽¹⁾ En amplificaciones en las que se utilizó como sustrato células de *Prochlorococcus*, se tomaron 2 mL del cultivo deseado y se centrifugaron a 16.100 g durante 5 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 10 μ L de agua destilada estéril.

⁽²⁾ En amplificaciones en las que se utilizó como sustrato ADN genómico, se siguió el protocolo anteriormente descrito para la obtención de ADN, usando una concentración de 0,2 – 0,4 ng/ μ L.

Las diferentes polimerasas utilizadas para la amplificación de los genes *cynS* y *gdhA* se encuentran en la tabla 15.

Las reacciones se incubaron en termocicladores *GeneAmp PCR System 2400* de *Perkin Elmer* y *iCycler Multicolor Real Time PCR Detection System* de *Bio-Rad*, y se prepararon en tubos estériles de 0,2 μ L *Multiply-Pro cup* de *Sarstedt* libres de ADN humano, ADNasas y ARNasas.

Tabla 15. Polimerasa utilizadas en las mezclas de PCR

| Nombre | Proveedor |
|-----------------------------------|--------------------|
| Amplitaq Gold | Applied Biosystems |
| CERTAM Kit | Biotoools |
| DNA Taq Polymerase | Biotoools |
| Kit MBL Pfu Polymerase | MBL |
| Pfu DNA Polymerase | Biotoools |
| Pfu Ultra Hotstart DNA Polymerase | Stratagene |
| Taq Polimerase | MBL |

7.5 RT-PCR semicuantitativa a tiempo real

7.5.1 Transcripción inversa

Para obtener ADNc a partir de ARN se utilizó el Kit *iScript™ cDNA Synthesis* de *Bio-Rad*, siguiendo las instrucciones del fabricante para la preparación de las mezclas de reacción con un volumen final de 20 μ L y utilizando aproximadamente 400 ng de ARN total. Las mezclas de transcripción inversa se prepararon en tubos estériles de 0,2 μ L de *Sarstedt* libres de ADN humano, ADNasas y ARNasas. Se utilizó un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* de *Perkin-Elmer*. El protocolo consistió en 5 min a 25°C, 30 min a 42°C y 5 min a 85°C.

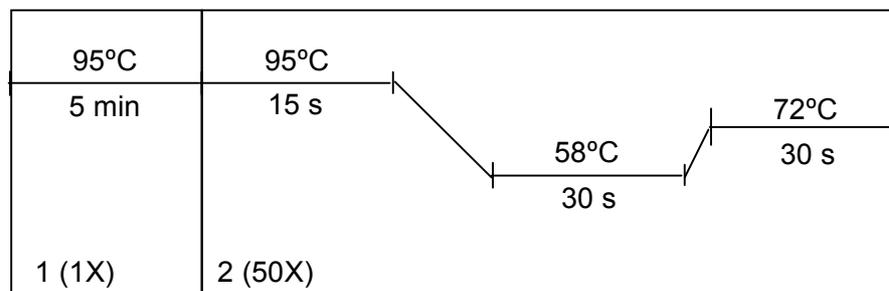
7.5.2 PCR en tiempo real

Las amplificaciones se realizaron utilizando placas de 96 pocillos de *Axigen Scientific* cubiertas con una lámina *iCycler IQ Optical Tape* de *Bio-rad*. Las mezclas de reacción se describen a continuación.

Tabla 16. Mezclas de reacción para PCR a tiempo real

| Componentes de la mezcla | Volumen (μL) | Concentración final |
|---|---|----------------------------|
| Agua destilada estéril | 16-18 | - |
| Tampón 10 X MgCl_2 2 mM de Biotools | 2,5 | 0,2 mM de MgCl_2 |
| Mezcla de nucleótidos 10 mM | 0,5 | 0,2 mM |
| Cebador Forward (3 pmoles/ μL) | 1-2 | 0,12 pmoles/ μL |
| Cebador Reverse (3 pmoles/ μL) | 1-2 | 0,12 pmoles/ μL |
| SYBRGreen I/fluoresceína de Bio-Rad (Dilución 1/10 ⁴ en DMSO). | 0,6 | -- |
| Taq DNA Polimerasa de Biotools (1U/ μL) | 0,4 | 0,016 U/ μL |
| ADNc | 1 | -- |

El protocolo de amplificación (figura 18) fue seguido de incremento progresivo de la temperatura desde 60 hasta 100°C, con un aumento de 0,5°C por ciclo. Este paso adicional se realizó teniendo en cuenta que los productos de PCR deseados tienen una temperatura de fusión que permite diferenciarlos de otros productos interferentes. De esta manera se garantizó que el proceso fuese eficiente y se amplificarían únicamente los genes a estudiar.

Figura 18. Protocolo de PCR a tiempo real para los genes *gdhA* y *rnpB*

7.5.3 Análisis de resultados

Las curvas sigmoidales obtenidas tras la amplificación se analizaron utilizando el programa *iCycler iQ v 3.0* de *Bio-Rad*.

El objetivo fue determinar el ciclo en el cual se inició el incremento de la fluorescencia, este punto es también llamado ciclo umbral o Ct y se determinó para cada una de las mezclas. Los valores de Ct son proporcionados automáticamente por el programa mencionado anteriormente.

Identificados los Ct se procedió a la normalización de datos aplicando el método de los deltas o de los dobles incrementos (Livak & Schmittgen, 2001) que se describe a continuación.

$$\textcircled{1} \quad \boxed{Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen control interno}} \quad \text{Bajo la condición experimental}$$

$$\textcircled{2} \quad \boxed{Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen control interno}} \quad \text{Control condición experimental}$$

$$\textcircled{1} - \textcircled{2} = \boxed{\Delta \Delta Ct}$$

En nuestro caso el gen control interno fue el *rnpB* y el gen problema *gdhA*. El incremento de expresión para un gen determinado bajo una condición experimental específica se calculó según la siguiente fórmula.

$$\text{Incremento de Expresión} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

7.5.4 Determinación de la eficiencia de los cebadores

Para normalizar los datos de expresión génica utilizando el método descrito anteriormente, es necesario que la eficiencia de las parejas de cebadores para los genes *gdhA* y *rnpB*, se encuentre entre el 80 y el 100%. Esto significa que en cada

ciclo, los cebadores generen dos nuevos fragmentos de amplificación por cada fragmento de ADN molde. Para garantizar esto se debe calcular previamente la eficiencia para cada pareja de cebadores.

El cálculo de la eficiencia se realizó preparando mezclas de reacción para RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando diluciones de ADNc como sustrato. Finalizada la PCR se representaron los valores de Ct frente al logaritmo de la concentración de sustrato. La eficiencia se calculó según la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001):

$$E = [10^{(-1/m)} - 1] \times 100$$

Donde E, es la eficiencia expresada en porcentaje y *m* es la pendiente de la recta obtenida de la representación Ct vs Log [ADNc].

7.6 Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Para visualizar y purificar fragmentos de ADN y ARN se utilizaron geles de agarosa al 1 y 1,5 % (p/v). La agarosa (*D-1 de baja EEO*) fue proporcionada por *Pronadisa*. Dependiendo de la cantidad de muestras y el volumen de muestra se prepararon geles de 30 o 100 mL en tampón TBE. El tampón estaba constituido por Tris base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM pH 8,3. Tras mezclar la agarosa con el TBE y fundirla calentándola en un microondas, se enfrió y adicionó bromuro de etidio a una concentración 0,8 µg/mL. Seguidamente se agitó suavemente y se vertió en cubetas de 7 x 10 cm *Mini-sub Cell GT* para geles de 30 mL, y de 15 x 10 cm *Wide Mini-Sub Cell GT* para geles de 100 mL, ambas de *Bio-Rad*.

Para depositar las muestras dentro de los pocillos, se les añadió 10% (v/v) de tampón de carga, constituido por 0,25% (p/v) de azul de bromofenol, 0,25 (p/v) de xilenocianol y 30 % de glicerol (v/v).

En uno de los pocillos de cada gel se depositaron 7 μ L de solución de marcadores de peso molecular preparados previamente digiriendo el fago λ con la enzima de restricción *Pst I* durante 12 h a 37°C. En algunos casos se utilizó también como patrón de peso molecular el fago λ digerido con la enzima *HindIII*.

Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando un voltaje constante de 100 V utilizando una fuente de alimentación modelo 1000-500 de *Bio-Rad*. Los geles se visualizaron en un equipo *Gene Genius* de *Syngene* mediante un transiluminador con luz ultravioleta *GelVue UV* de *Syngene* irradiando los mismos a 302 nm. Las imágenes se analizaron con el programa informático *GeneSnap* de *Syngene v4.00.0*.

7.7 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa y productos de PCR

Las bandas de interés observadas en los geles de agarosa fueron extraídas del gel cortandolas con un bisturí y conservadas en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL. Para la extracción del ADN de la agarosa o de las soluciones de PCR se utilizaron los Kits comerciales *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* de *Amersham Biosciences/GE Healthcare* y *Perfecprep Gel Cleanup* de *Eppendorf*, siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes.

7.8 Secuenciación de ADN

Para llevar a cabo la secuenciación se utilizaron los secuenciadores automáticos de ADN de *Applied Biosystems*, modelos *ABI Prism 373XL Stretch*, *ABI Prism 310*

Genetic Analyzer y *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer*, equipados con el programa *BigDye Terminator v3.1* de *Applied Biosystems*.

Los fragmentos de ADN purificados se enviaron al Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI), Unidad de Genómica de la Universidad de Córdoba. Para obtener un resultado claro y preciso de la secuencia, se envió una mezcla de 3,2 picomoles de cada uno de los cebadores y ADN disuelto en agua destilada estéril a razón de 15-20 ng por cada 100 pb para productos de PCR, y 300-500 ng cuando se trataba de plásmidos.

7.9 Análisis informático de secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante los programas informáticos *SeqEdit v4.0*, *Sequence Analysis v1.2*, *MegAling v4.0* y *4Peaks v1.6*. La comparación con las secuencias descritas en la base de datos <http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/blast.html> se realizó utilizando *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Schaffer *et al.*, 2001).

8. CLONACIÓN Y SOBREENPRESIÓN EN SISTEMAS HETERÓLOGOS

8.1 Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas

Escherichia coli fue la bacteria utilizada como hospedador del vector de clonación.

Las estirpes utilizadas para la clonación y la sobreexpresión fueron:

Tabla17. Estirpes de *E.coli* empleadas para la clonación del gen *gdhA* de *Prochlorococcus*

| Estirpe de <i>E.coli</i> | Genotipo | Referencia |
|---------------------------------|---|---|
| HB101 | supE44 hsdS20(r _B ⁻ m _B ⁻)recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xul -5 mtl -1 F-,ompT, hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻), gal dcm, | Sambrook., J. <i>et al.</i> 1989 Grodberg., J. Y |
| BL21(DE3) | λ(DE3)(lac, lacUV5-t7 GENE, indl, Sam7, nin5 | Dunn., J.J. 1988 |
| BL21 | F-,ompT, hsdS(r _B ⁻ , m _B ⁻), gal dcm | Studier., F. <i>et al.</i> 1986 |

Escherichia coli HB101 es un tipo de la estirpe K12 auxotrofa para los aminoácidos Leucina, prolina y timina (Rothen *et al.*, 1997). HB101 es un híbrido resultante del cruce entre las estirpes K12 y B. Esta estirpe presenta altos índices de eficiencia de transformación y se utiliza habitualmente para la producción de gran cantidad de copias de un plásmido determinado.

La estirpe BL21(DE3) es derivada de la estirpe BL21 y utilizada frecuentemente debido a los altos niveles de expresión de genes clonados dentro de vectores de expresión que contienen el bacteriofago T7 como promotor, como por ejemplo los vectores de la serie pET. El gen que codifica para la ARN polimerasa del bacteriofago T7 es llevado al bacteriófago λDE3, que es integrado dentro del cromosoma de *Escherichia coli* BL21 (Studier & Moffatt, 1986).

Echerichia coli BL21 es una estirpe que carece de los genes para la producción de las proteasas MmpT y Lon, ha sido específicamente utilizada para obtener altos niveles de expresión de proteínas de fusión a glutatión transferasa (GST).

8.2 Condiciones y medio de cultivo

8.2.1 Luria Bertani (LB)

El medio líquido LB se preparó disolviendo 20 g de *LB Broth* de *Pronadisa* en 1000 mL de agua destilada. Las placas de agar LB se prepararon disolviendo 35 g de *LB Agar (Lenox)* de *Pronadisa* en 1000 mL de agua destilada. Ambos medios se esterizaron en autoclave a 120°C durante 20 min.

Tras la esterilización el agar LB se repartió en cajas de Petri de 9 cm y se dejó solidificar bajo cabina de flujo laminar. Las placas se secaron incubando durante 12 h a 37°C. Los medios se almacenaron a 4°C para su conservación.

Para seleccionar las colonias transformantes se utilizó el medio líquido LBA, el cual se preparó añadiendo ampicilina a 100 µg/mL al medio LB previamente preparado. En el caso de las placas de agar LB, se añadió ampicilina a 100 µg/mL una vez esterilizado el *LB agar (Lenox)* y justo antes de repartirlo en las cajas de Petri. La solución *stock* de ampicilina se esterilizó en filtros *Millipore* de 0,22 µm y se conservó a -20°C.

Para la transformación de la estirpe BL21 se utilizó el medio líquido LBG, que se preparó añadiendo glucosa a una concentración final de 20 mM al medio LB previamente esterilizado. Las placas de agar LBGA se prepararon añadiendo glucosa a una concentración final de 20 mM al agar LBA previamente esterilizado y justo antes de repartirlo en las cajas de Petri.

8.2.2 Medio de expresión 2XYTA

El medio 2X YTA se utilizó para la expresión de los genes clonados en el vector pGEX-4T-1, y se preparó disolviendo 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, ambos de *Panreac* y 5 g de cloruro sódico de *Merck*, en 1000 mL de agua destilada.

A continuación se ajustó el pH a 7,0 con hidróxido de sodio y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min. Después de esterilizado el medio, se enfrió a 50°C y se añadió asepticamente ampicilina hasta una concentración final de 100 µg/mL. La solución de ampicilina se preparó y conservó como se describe en el apartado anterior.

8.2.3 Condiciones de cultivo y conservación de estirpes de *E. coli*

Las células de *Escherichia coli* de las diferentes estirpes utilizadas se incubaron a 37°C durante un tiempo mínimo de 12 h. Los cultivos líquidos se incubaron en tubos *Falcom* de 10 o 50 mL, o en matraces estériles. Los cultivos que necesitaron oxigenación se incubaron en agitadores orbitales *HT INFOS CH-4103* y *Unitron*. Los cultivos obtenidos en placas de agar se incubaron en una estufa termostata a 37°C. Las estirpes utilizadas se conservaron a -80°C en un medio líquido LB suplementado con 15% de glicerol (v/v).

8.3 Vectores de clonación

8.3.1 *pGEM-T easy vector*

El vector de clonación *pGEM-T easy vector* (figura 19) fue proporcionado por *Promega*. Este vector posee en los extremos 3' timina que se unen por complementariedad con los extremos poliA de los productos de PCR facilitando la inserción de éstos en el vector. De otro lado los sitios T7 y SP6 proporcionan una amplia variedad de sitios de corte para enzimas de restricción que permiten la posterior inserción del fragmento deseado. Los clones son seleccionados por resistencia a ampicilina.

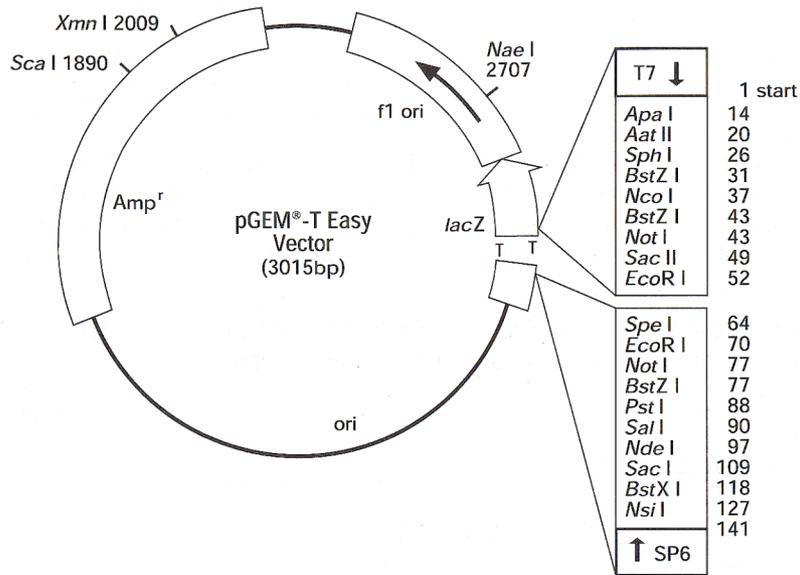


Figura 19. Mapa génico del vector de clonación pGEM-T easy

8.3.2 Vector pGEX-4T-1

El vector de clonación y sobreexpresión *pGEX-4T-1* fue proporcionado por *Amersham Biosciences/GE Healthcare*. Este vector se utiliza para sobreexpresar proteínas de fusión a glutatión transferasa. Estas proteínas se construyen insertando el gen de interés en uno de los múltiples sitios de unión al vector. La expresión está bajo el control del promotor *lac*, el cual es inducido por la presencia del IPTG. Tras la inducción se expresará la GST unida por su amino terminal al carboxil terminal de la proteína de interés. El vector proporciona también un sitio de reconocimiento para trombina que permite separar la proteína de interés de la GST (figura 20).

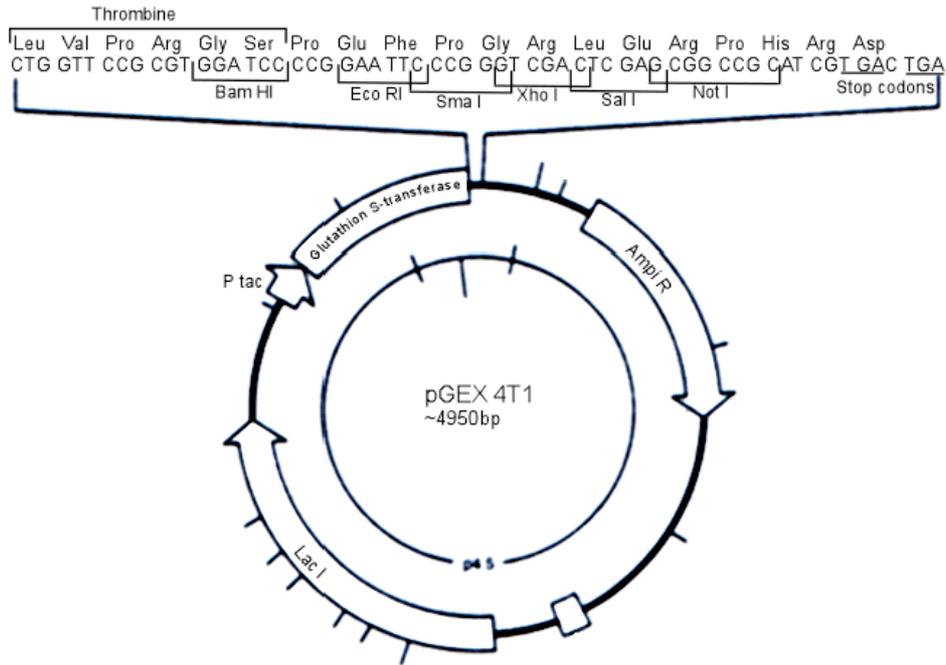


Figura 20. Mapa génico del vector de clonación y sobreexpresión pGEX-4-T1

8.4 Aislamiento y manipulación de ADN

8.4.1 Aislamiento y purificación de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

Con objeto de extraer y purificar ADN plásmidico de *E. coli* se utilizaron los kits *Gen Elute Plasmid Miniprep PLN-70* de *Sigma Aldrich* y *GFX Microplasmid Prep Kit* de *Amersham Biosciences/GE Healthcare*, siguiendo las instrucciones descritas por los fabricantes en los manuales de usuario.

8.4.2 Digestión de ADN con enzimas de restricción

Para la clonación utilizando los vectores *pGEM-T easy* y *pGEX-4T-1* se utilizaron las enzimas de restricción *SpeI* y *EcoRI*. El tampón de reacción se seleccionó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las digestiones se incubaron a 37°C durante 1 hora y en todas ellas se utilizó una unidad de enzima por cada µg de ADN.

8.4.3 Fosforilación de Insertos

Para fosforilar los fragmentos de ADN se utilizó la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 de *Amersham Biosciences/GE Helthcare*. Se prepararon mezclas de reacción que contenían el tampón de reacción, 5U de enzima, 1 µg de ADN y ATP 0,4 µM. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 30 min.

8.4.4 Desfosforilación de extremos plasmídicos

El vector pGEX-4T-1 fue desfosforilado para evitar su recircularización mediante el tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) de *Amersham Biosciences/GE Healthcare*. Previamente se preparó una dilución de CIAP a una concentración final de 2 U/µL en el tampón de reacción a un volumen final de 10 µL. A partir de esta solución se añadió 1 µL a 50 µL de plásmido 0,1 µg/µL digerido con *EcoRI*. Seguidamente se incubó la mezcla a 37°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo se procedió a inactivar la enzima a 85°C durante 15 minutos.

8.4.5 Ligaciones

8.4.5.1 Vector pGEM-T easy

La mezcla de reacción utilizada para ligar fragmentos de ADN en el plásmido pGEM-T easy se describe en la tabla 18.

La concentración de ADN obtenido por PCR se cálculo según la siguiente ecuación:

$$\text{ng de inserto} = \frac{\text{ng de vector} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb de vector}} \times \text{relación inserto:vector}$$

En donde los ng de vector son 50, el tamaño del inserto 1,7 Kb, el tamaño del vector 3 Kb y la relación inserto:vector es 3:1. La mezcla se incubó a 4°C durante 12 -14 h.

Tabla 18. Mezcla de reacción para ligaciones en el vector pGEM-T easy

| Componente | Volumen (μL) | Concentración Final |
|--------------------------------|---|----------------------------|
| 2X Tampón de ligación rápida * | 5 μL | 1X |
| pGEM-T easy vector * | 1 μL | 50 ng |
| ADN PCR | 2,7 μL | 85 ng |
| T4 DNA ligasa * | 1 μL | 1 U |
| Agua destilada estéril | 0,3 μL | -- |

(*) Componentes proporcionados por el fabricante

8.4.5.2 Vector pGEX-4T-1

En la siguiente tabla se muestra la mezcla de reacción para la ligación de fragmentos de ADN en el vector pGEX-4T-1.

Tabla 19. Mezcla de reacción para la ligación en el vector pGEX-4T-1

| Componentes | Cantidad (μl) | Concentración final | Proveedor |
|------------------------|--|----------------------------|------------------|
| Tampón T4 DNA ligasa | 2 | 1X | Sigma Aldrich |
| T4 DNA ligasa | 5 | 20 U | Sigma Aldrich |
| Vector pGEX-4T-1 | 2 | 2 μg | Amersham |
| Fragmento ADN | 10 | 10 μg | -- |
| Agua destilada estéril | 1 | -- | -- |

Siguiendo las recomendaciones del fabricante la relación inserto:vector fue de 1:5 y la mezcla se incubó a 16°C durante 12 – 14 h.

8.5 Métodos de transferencia de ADN

8.5.1. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de la estirpe *Escherichia coli* HB101 utilizadas para la transformación con el vector *pGEM-T easy*, se inoculó una colonia de dicha estirpe en 50 mL de medio líquido LB suplementado con cloruro de magnesio a una concentración final de 10 mM. El cultivo se incubó a 37°C durante 16 horas. Transcurrido el tiempo se pasaron 0,5 mL del cultivo a 49,5 mL de medio LB suplementado con cloruro de magnesio a una concentración final de 10 mM. Este nuevo cultivo se incubó a 37°C con agitación suave hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,4. Llegado a este punto el cultivo se transfirió a tubos de centrifuga estériles de 25 mL para el rotor JA-20 de *Beckman* y se mantuvieron en hielo durante 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 760 g durante 15 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en 1/3 del volumen inicial (17 mL) de tampón RFI frío (Tabla 20) y se incubó en hielo durante 15 min. A continuación se repitió la centrifugación anterior y el precipitado se resuspendió en 1/12,5 del volumen inicial (4 mL) de tampón RFII frío (Tabla 20) y se incubó durante 15 min en hielo. Las células se distribuyeron en tubos *ependorf* de 1,5 mL en alícuotas de 0,6 mL por tubo y se almacenaron a -80°C.

Tabla 20. Composición de los tampones RFI y RFII

| Tampon RFI | Tampón RFII |
|-------------------------------|------------------------|
| Acetato potásico 30 mM pH 6,9 | MOPS 10 mM pH 7,0 |
| Cloruro de manganeso 50 mM | Cloruro potásico 10 mM |
| Cloruro potásico 100 mM | Cloruro cálcico 75 mM |
| Cloruro cálcico 100 mM | Glicerol 15% (p/v) |
| Glicerol 15% (p/v) | |

En el caso de las células de *E. coli*, BL21 para la transformación con el vector pGEX-4T-1, mediante un asa redonda estéril se transfirió una alícuota de las células conservadas a -80°C a placas con agar LB, y se incubó durante 16 h a 37°C . Transcurrido el tiempo se seleccionó una colonia aislada y se inoculó en 50 mL de medio líquido LB. Este cultivo se incubó a 37°C con 250 rpm de agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,5. Posteriormente las células se centrifugaron a 2500 g durante 15 min a 4°C , y el precipitado se resuspendió en 5 mL (1/10 del volumen inicial) de TSS frío. El tampón TSS se preparó previamente disolviendo 1 gr de triptona, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de cloruro sódico, 10 g de polietilenglicol, 5 mL de DMSO y 5 mL de cloruro de magnesio 1M en 100 mL de agua destilada estéril ajustando pH a 6,5 con HCl o NaOH. El tampón se esterilizó mediante filtros de $0,22\ \mu\text{m}$ de *Millipore* y se conservó a 4°C . Las células competentes se mantuvieron en hielo y se utilizaron inmediatamente para la transformación.

8.5.2 Transformación de células competentes

8.5.2.1 Transformación de *E. coli* HB101 utilizando el vector pGEM-T easy

Para la transformación de células competentes de *E. coli* HB101 con el vector pGEM-T easy, se mezclaron 10 μL de la ligación con 200 μL de células competentes. La mezcla se mantuvo en hielo durante 1 h para posteriormente calentarla a 42°C durante 2 min. A continuación se mantuvo nuevamente en hielo durante 3 min. Seguidamente se añadieron 400 μL de medio líquido LB suplementado con cloruro de magnesio 10 mM. Este cultivo se incubó en un tubo *Falcon* estéril a 37°C durante 45 min con agitación suave. Las células se cultivaron

en placas de agar LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL, y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

8.5.2.2 Transformación de *E. coli* BL21 utilizando el vector pGEX-4T-1

Las células de *E. coli* BL21 se transformaron mezclando 200 µL de células competentes con 10 µL de mezcla de ligación. Esta mezcla se incubó en hielo durante 45 min. Seguidamente se incubó a 42°C durante 2 min y nuevamente se mantuvo en hielo por 2 a 3 min. A los 210 µL de mezcla se le añadieron 800 µL de medio LBG pre incubado a 40°C. A continuación las células transformadas se incubaron a 37°C, con 250 rpm de agitación, durante 1 h para su proliferación. Finalizado dicho tiempo se procedió a cultivar las células en placas de LBGA pre incubadas a 37°C y se continuó con la incubación a esta temperatura durante 24 horas.

8.6 Análisis de colonias transformantes

El éxito de la clonación se confirmó utilizando las colonias transformantes obtenidas como sustrato para una PCR. En el caso del vector *pGEM-T easy* se utilizaron cebadores homólogos diseñados específicamente para los genes clonados y utilizando las condiciones de amplificación según dichos cebadores. Para el vector pGEX-4T-1 se utilizó la siguiente pareja de cebadores cuya secuencia se encuentra descrita en el manual de instrucciones del vector.

pGEX 5' GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG

pGEX 3' CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

El protocolo de amplificación incluyó 35 ciclos, cada uno de ellos con una fase de desnaturalización a 95°C durante 1 min, la fase de hibridación a 55°C durante 1 min y la fase de extensión a 72°C durante 2 min. Seguidamente se confirmó la presencia de inserto observando el producto de PCR en geles de agarosa al 1%.

8.7. Condiciones de expresión en cultivos

Después de obtener los clones positivos se procedió a la expresión del gen clonado para la obtención de proteína recombinante.

Mediante un asa redonda estéril se pasó una alícuota del clon positivo conservado a -80°C a 10 mL de medio 2XYTA, y se incubó a 37°C con 250 rpm durante 15 h en un incubador rotatorio *Infor AG* modelo *Unitron*. Los 10 mL de cultivo se pasaron a 1 L de medio 2XYTA en un matraz de 5 L de capacidad que se incubó a 37°C con 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 1,4. Obtenida la densidad celular indicada, se añadieron 5 mL de IPTG 100 mM para inducir la expresión de las proteínas de fusión incubando a 20°C con 250 rpm de agitación durante 2 h y 30 min, en un incubador rotatorio *Infors AG* modelo *Unitron*. El cultivo inducido se centrifugó en tubos de 500 mL a 11.900 g durante 10 min a 4°C en un rotor JLA 10.5 de *Beckman*. El precipitado se resuspendió en 50 mL de PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,3). Para evitar la acción de proteasas se añadió PMSF 1 mM. Las células se rompieron con presión a 1000 psi en una prensa de French. Para lograr un mayor rendimiento del proceso la suspensión se sometió dos veces a la rotura en prensa. Seguidamente con objeto de facilitar la obtención de las proteínas de fusión se añadió 2 % de Triton X-100 y se incubó a 4°C con agitación suave durante 30 min. A continuación se centrifugó la suspensión en tubos de centrífuga de 25 mL para el rotor JA20 de *Beckman*, a

12.000 g durante 10 min a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se le añadió 5 mM de DTT, esto favorecería la unión del glutatión a la GST. El procedimiento para la purificación de proteínas de fusión a GST se describe en el siguiente apartado.

9. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN

9.1 Purificación en columna de glutatión agarosa

La glutamato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* MIT9313 expresada en *E. coli* se purificó como proteína de fusión con GST mediante cromatografía de afinidad utilizando glutatión inmovilizado en una matriz de agarosa. La glutatión agarosa (*Glutathione-Agarose lyophilized powder*) se obtuvo de *Sigma Aldrich* y para su preparación y montaje en columna se siguieron las instrucciones del fabricante.

El extracto celular obtenido como se describe en el apartado anterior, se aplicó dentro de la columna de glutatión agarosa con un flujo de 400 µL/min utilizando una bomba *LKB Pump-1* de *Amersham Biosciences/GE Healthcare* circulando en continuo a través de la misma durante 16 h a 4°C. A continuación se aplicaron 50 mL de Tritón X-100 1% en PBS para lavar la columna y remover residuos. Para eluir la glutamato deshidrogenasa unida a la GST se inyectaron 5 mL de glutatión reducido 10 mM en 50 mM Tris-HCl pH 9,5, y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación se aplicó a la columna PBS obteniendo 5 mL de GDH+GST. Esta fracción se conservó a -20°C para su posterior proteólisis y análisis por SDS-PAGE.

9.2 Proteolisis de la GDH+GST utilizando trombina

Al producto de elusión obtenidos tras la cromatografía anterior se les añadió 100 U de trombina 1 U/ μ L de *Amersham Biosciences/GE Healthcare*. A continuación se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas con agitación suave. Transcurrido el tiempo de proteolisis, con objeto de concentrar la GDH, se centrifugó la mezcla a 4.000 g durante 30 min a 24°C utilizando un tubo centricon *Amicon Ultra 15* de 30.000 Da de *Millipore*. El soluto obtenido en la unidad de filtro se extrajo con una micropipeta y se resuspendió en tubo *Eppendor* de 1,5 mL con 1 mL de PBS 1X. La GDH obtenida se conservó a -20 °C.

9.3 Purificación de la GDH a partir de geles de acrilamida

La proteína obtenida fue sometida a electroforesis SDS-PAGE (apartado 6.1) para separar la mezcla de proteínas y visualizar la GDH mediante tinción con *Coomasie*. Identificada la proteína según su tamaño, con ayuda de un bisturí se cortó la banda correspondiente a la GDH para extraerla del gel de poliacrilamida y se añadió 2 mL de PBS 1X. Seguidamente se homogenizó hasta obtener una solución espesa y de textura fina, utilizando un *Ultra-Turrax T25* de *Janke and Kunkel Ika Labortechnik*. Este homogenizado se utilizó para la obtención de anticuerpos en conejos.

10. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE ANTICUERPOS

10.1 Homogenización del antígeno con adyuvante de Freund

Al homogenizado de acrilamida conteniendo GDH, obtenido en el apartado anterior, se le añadieron 2 mL de adyuvante completo de Freund (*Difco*). Esto se mezcló hasta obtener una emulsión densa y uniforme.

10.2 Protocolo de inmunización

Los 4 mL del homogenizado anterior se inyectaron con jeringas de 5 mL preparadas con agujas de 30 X 15 mm, en cuatro dosis de 1 mL en ambos lados de la zona dorsal de la escápula y de las caderas de conejos de laboratorio proporcionados por el Servicio Centralizado de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba.

La inoculación se hizo por vía subcutánea, pinzando la piel del conejo e introduciendo la aguja aproximadamente 1 cm para evitar la pérdida de emulsión.

La pauta de inmunización se observa en la siguiente tabla.

Tabla 21. Pauta de inmunización seguida para la obtención de anticuerpos anti-GDH

| <i>Día</i> | <i>Dosis</i> | <i>Inoculación</i> | <i>Extracción</i> |
|------------|--------------|--------------------------|------------------------|
| 1 | | | Suero pre-inmune (SNI) |
| 7 | 1 | Adyuvante completo + GDH | |
| 21 | 2 | Adyuvante completo + GDH | |
| 28 | | | 1 ^a |
| 36 | 3 | Adyuvante completo + GDH | |
| 42 | | | 2 ^a |
| 51 | 4 | Adyuvante completo + GDH | |
| 62 | | | 3 ^a |
| 66 | 5 | Adyuvante completo + GDH | |
| 71 | | | 4 ^a |
| 78 | 6 | Adyuvante completo + GDH | |
| 85 | | | 5 ^a |
| 89 | | | 6 ^a |

10.3 Extracción de sangre

Tanto para la obtención del suero no inmune (SNI) como de los sueros anti-GDH, se extrajo la sangre de la arteria central de la oreja del conejo. Para ello se cortó el pelo sobre la vena con ayuda de un bisturí y se desinfectó la zona de punción con alcohol. A continuación se introdujo una aguja hipodérmica de 0,9 X 25 mm en dicha arteria. La sangre se recogió en tubos con heparina (una gota por cada 5 mL de sangre). Finalizado el sangrado se lavó con agua destilada la zona de punción y se desinfectó con alcohol.

10.4 Purificación parcial de anticuerpos

Las muestras de sangre se centrifugaron en tubos *Corex* de 15 mL a 48.400 g en un rotor JA20 de *Beckman* durante 15 min a temperatura ambiente. Seguidamente se extrajo el sobrenadante y se traspasó a tubos *Falcom* de 10 mL. Para eliminar posibles interferencias debidas al sistema de complemento, el plasma obtenido se incubó a 56°C durante 15 min, se dejó enfriar y se conservó a -20°C. A continuación se realizó una precipitación de inmunoglobulinas mediante sulfato amónico, añadiendo a cada tubo la cantidad de sulfato correspondiente al volumen de cada muestra hasta alcanzar una saturación del 45%. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min con agitación suave. Transcurrido el tiempo las muestras se centrifugaron a 17.400 g durante 30 min a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió a razón de 1 mL de PBS por cada 3 mL de plasma. Los anticuerpos obtenidos se conservaron a -20°C para su posterior utilización en la inmunodetección de GDH.

10.5 Optimización del *Western blotting* para la detección de la GDH

Los anticuepos anti-GDH obtenidos en el apartado anterior se utilizaron como anticuerpo primario en la técnica de inmunodetección de proteínas (*Western blotting*). Para esto fue necesario optimizar la concentración de anticuerpo primario a utilizar preparando tres diluciones de anti-GDH 1/1000, 1/500 y 1/250 en TBS-T. Después de realizar el procedimiento descrito en el apartado 6.3.2.2 se eligió la concentración de anticuerpo primario que permitió la detección de la banda correspondiente a la GDH y la obtención de una mayor resolución tras el revelado de la membrana de nitrocelulosa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ambientes marinos el nitrógeno es un elemento fundamental para el desarrollo de diversos organismos, entre ellos las cianobacterias. Éstas pueden utilizar diferentes fuentes de nitrógeno para obtener compuestos nitrogenados importantes para el mantenimiento de la célula, no obstante dichas fuentes pueden llegar a ser escasas (Capone, 2000). En función de ello, *Prochlorococcus* y otros organismos han adaptado sus genomas para lograr sobrevivir en zonas donde la disponibilidad de formas de nitrógeno es limitada. Al inicio de este trabajo de tesis doctoral, nos propusimos conocer si *Prochlorococcus* pudiese utilizar otras formas de nitrógeno diferentes al amonio, principalmente fuentes orgánicas como los aminoácidos y el cianato. Para ello se estudiaron genes como el *cynS* que posiblemente permita a la estirpe de superficie PCC 9511 utilizar cianato como fuente de nitrógeno y el gen *gdhA* presente solo en 4 estirpes de las 13 actualmente secuenciadas, que podría participar como una posible ruta alternativa en la asimilación de amonio. Esto con objeto de aportar información al conocimiento de la razón por la que dichos genes se conservan únicamente en estirpes específicas. A continuación se describirán los resultados obtenidos en el estudio de dichos genes.

1. LA CIANASA DE *Prochlorococcus* PCC 9511

1.1 Detección de actividad cianasa

Para iniciar el estudio de la asimilación de cianato como fuente de nitrógeno era importante conocer si *Prochlorococcus* sintetizaba formas activas de la enzima bajo condiciones normales en cultivos de laboratorio.

Como ya se ha mencionado las estirpes PCC 9511 (MED4), NATL1 y NATL2 poseen el gen *cynS* responsable de la síntesis de la cianasa. Pero únicamente la

estirpe MED4 posee los genes implicados en el transporte de cianato. La cianasa cataliza la reacción entre el cianato y el bicarbonato produciendo carbamato que espontáneamente se descompone en cianato y dióxido de carbono (Anderson & Little, 1986). Para la detección de la actividad cianasa se utilizaron extractos crudos obtenidos de las estirpes PCC 9511, SS120 y MIT9313. Las mezclas de reacción y las condiciones de medición se describieron en el apartado 5.6.3 del capítulo anterior.

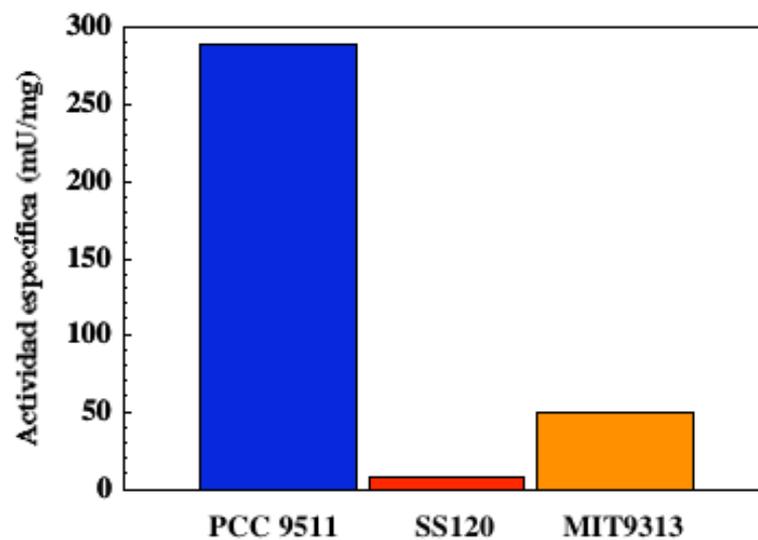


Figura 21. Actividad cianasa en extractos crudos de las estirpes de *Prochlorococcus* PCC 9511, SS120 y MIT9313.

La actividad cianasa se detectó en las estirpes PCC 9511 y MIT9313 cultivadas en medio carente de cianato. Los datos obtenidos con esta última posiblemente sean producto de los organismos heterótrofos contaminantes propios de estirpes no axénicas. Por otra parte los valores no son tan significativos con respecto a PCC 9511.

Esto indica que en *Prochlorococcus* PCC 9511 se sintetiza cianasa en su forma activa, sin embargo esto no coincide con lo descrito para organismos como *E.coli*

que solo sintetizan la enzima en respuesta al cianato extracelular (Anderson & Little, 1986).

Teniendo en cuenta lo anterior, el siguiente paso fue obtener y mantener cultivos de PCC 9511 en cianato como fuente de nitrógeno. Los resultados obtenidos se describen en el siguiente apartado.

1.2 Cultivo de *Prochlorococcus* PCC 9511 en presencia de cianato

Para la obtención de cultivos de *Prochlorococcus* PCC 9511 que utilizaran cianato como fuente de nitrógeno, se realizó una transferencia desde medio PCR-S11 al mismo medio excepto que se reemplazó el amonio por cianato potásico a una concentración final de 800 μM . Dicha transferencia consistió en hacer una dilución 1:5 del cultivo de PCC 9511 en medio PCR-S11 + cianato. Se transfirieron también cultivos de la estirpes SS120 como control negativo.

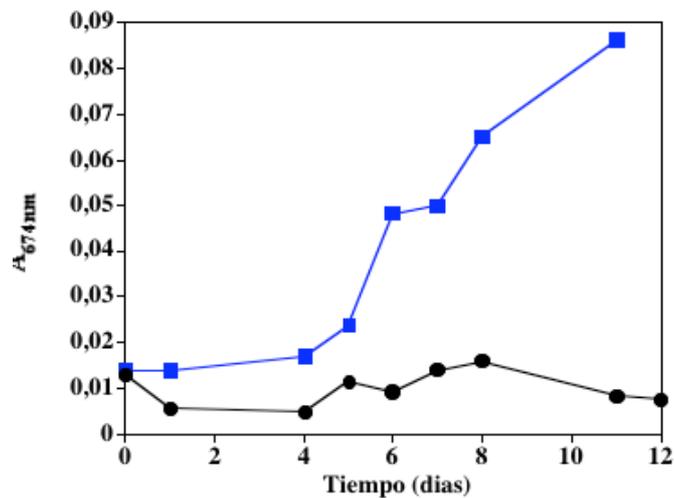


Figura 22. Crecimiento de la estirpes (■) PCC 9511 y (●) SS120 en presencia de cianato como fuente de nitrógeno.

Como se observa en la figura 22, la estirpe PCC 9511 tuvo la capacidad de incrementar su crecimiento en medio con cianato, en contraste con la estirpe SS120 que no logró sobrevivir bajo dicha condición.

Si tenemos en cuenta que el cianato se descompone espontáneamente a amonio en pH inferiores a 9, es posible que tras la transferencia los cultivos de PCC 9511 mostraran crecimiento no por la utilización de cianato como tal, sino por la asimilación del amonio producido en dicha descomposición química; sin embargo esto no ocurrió en la estirpe SS120 cultivada bajo las mismas condiciones.

Para comprobar que los cultivos de PCC 9511 crecían gracias a la presencia de cianato en el medio procedimos a cuantificar el amonio que se formaba en los cultivos, mediante el método Nessler (ver apartado 5.4 en Materiales y Métodos). Utilizando la recta patrón del método se determinó la cantidad de amonio que se formaba en función del tiempo (figura 23).

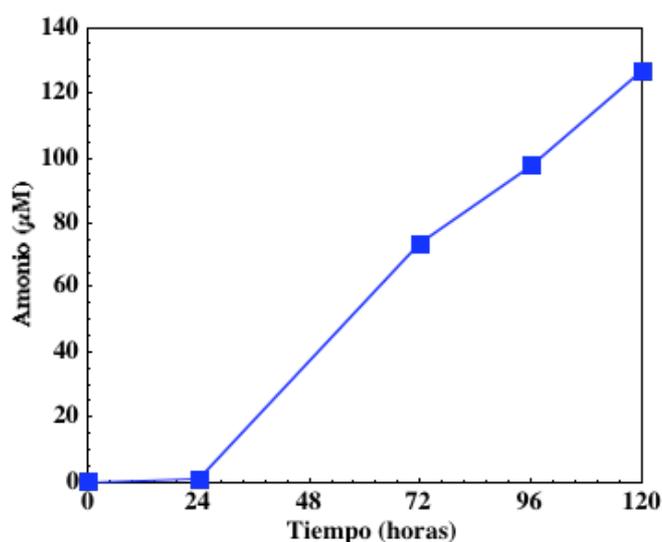


Figura 23. Tasa de formación de amonio en cultivos de *Prochlorococcus* PCC 9511+cianato.

Los datos obtenidos tras 120 horas de incubación de un cultivo de *Prochlorococcus* PCC 9511 mantenido en presencia de cianato, muestran un incremento en la concentración de amonio aproximadamente de 126 μM .

Además de esto, aplicando la metodología descrita para la cuantificación de cianato en cultivos, se midió también la concentración de dicho elemento paralelo al crecimiento de PCC 9511 en medio PCR-S11 + cianato.

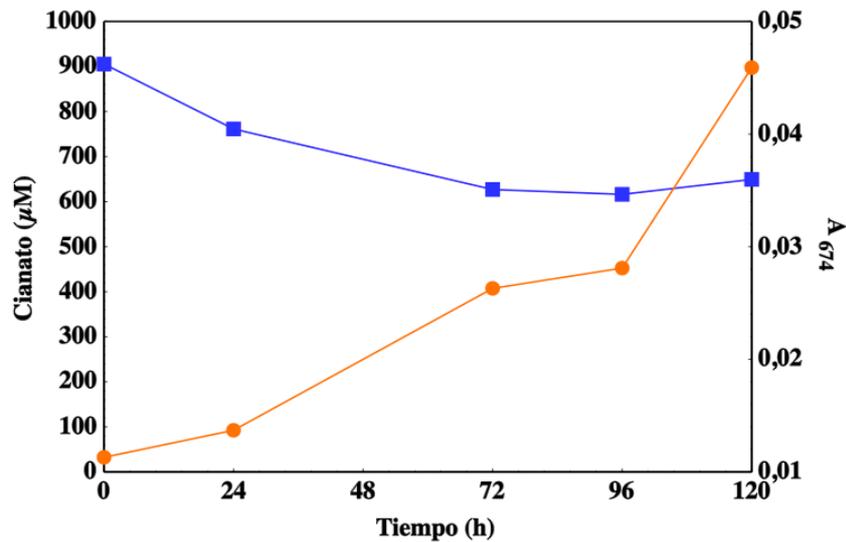


Figura 24. Concentración de cianato (■) y crecimiento de *Prochlorococcus* PCC 9511 (●) en medio PCR-S11 con cianato como fuente de nitrógeno.

El descenso en la concentración de cianato es el valor que indica una asimilación del mismo en cultivos de *Prochlorococcus* PCC 9511.

En la figura anterior se observa una disminución en dicha concentración hasta 257 μM en 120 horas. Por otra parte, si consideramos que por degradación espontánea de cianato se forma en el mismo tiempo 126 μM de amonio (figura 23). Restando estos dos valores podemos considerar que el cianato neto consumido en 120 horas fue 131 μM . Estos resultados sugieren que parte del crecimiento de *Prochlorococcus* PCC 9511 en presencia de cianato es producto de la presencia de dicho elemento, lo que supone que éste puede ser utilizado como fuente nitrógeno. No obstante, como se confirmará mas adelante, la utilización de cianato parece ser

parcial como fuente de nitrógeno adicional, es decir *Prochlorococcus* no puede utilizar única y exclusivamente cianato para su crecimiento.

1.3 Actividad cianasa en cultivos de PCC 9511 crecidos en presencia de cianato

Para estudiar el efecto de la presencia de cianato en el medio sobre la actividad cianasa, se transfirieron cultivos de PCC 9511 a medio PCR-S11 con cianato. Se incluyó un control negativo en el cual *Prochlorococcus* se transfirió a medio PCR-S11 con amonio. Tras varios intentos de medir la actividad bajo estas condiciones, los únicos datos obtenidos se representan en la figura 25, en el que se aprecia un leve incremento de la actividad en presencia de cianato tras 48 horas de incubación con respecto al tiempo 0 horas y al control en presencia de amonio.

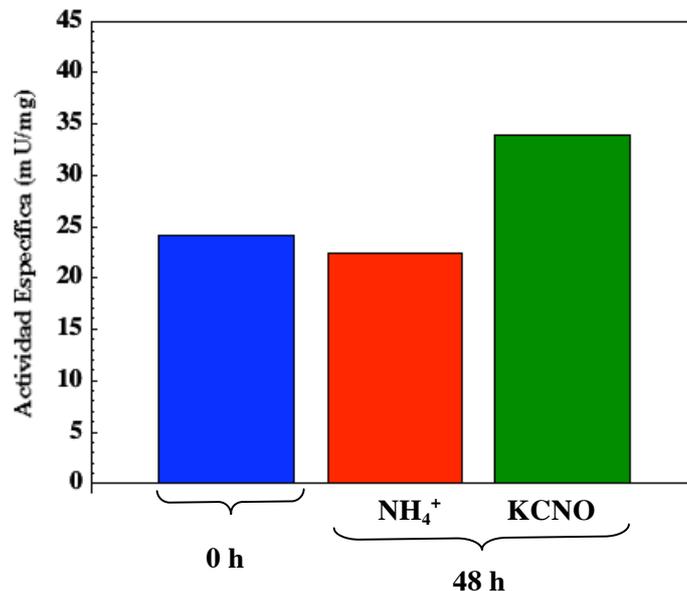


Figura 25. Actividad cianasa en cultivos de PCC 9511 transferidos a cianato.

La razón por la que no se obtuvieron otras medidas radica en la dificultad para mantener cultivos en cianato, los cuales permanecían viables únicamente en volúmenes de 50 mL no siendo posible el aumento de los mismos hasta 1 L,

volumen mínimo para obtener suspensiones celulares que permitieran romper en prensa de French y así medir actividad cianasa.

Esto indica que la contribución de cianato como fuente de nitrógeno para *Prochlorococcus* es parcial, aunque el organismo logre sobrevivir en presencia de dicho elemento necesita amonio para proliferar y desarrollarse.

1.4 Amplificación del gen *cynS*

El gen *cynS* se encuentra en el operon *cyn*, acompañado por los genes *cynA*, *cynB* y *cynD*, lo cuales codifican para las subunidades que componen el transportador tipo ABC de cianato. Este operón se encuentra en el genoma de *Prochlorococcus* PCC 9511, actualmente secuenciado en su totalidad.

Con el objetivo de purificar la cianasa para estudios de caracterización enzimática y regulación *in vitro*, se abordó la amplificación del gen *cynS*. Para ello se diseñaron 5 parejas de cebadores reseñados en la tabla 11 de Materiales y Métodos; éstos se aplicaron siguiendo diferentes protocolos de amplificación modificando la temperatura de hibridación o el número de ciclos.

También se realizaron gradientes de sales utilizando diferentes concentraciones de cloruro magnesico, se varió la concentración de cebador y se emplearon diversas *Taq* polimerasas como *Amplitaq Gold* de *Applied Biosystems*, *CERTAM Kit* de *Biotoools*, *DNA Taq polimerase* de *Biotoools*, *Kit MBL Pfu DNA polimerase* de *MBL*, *Pfu Ultra Hotstart DNA Polimerase* de *Stratagene* y *Taq polimerase* de *MBL*.

Como sustrato de la reacción se utilizó ADN genómico puro, con diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-7} , y células frescas y enteras. Además se digirió ADN genómico con *HindIII* la cual no cortaba el gen *cynS*. El producto de la digestión se sometió a una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, seguidamente se corto y purificó la zona

en la que suponíamos se encontraba el gen de interés y el purificado se utilizó como sustrato para la PCR con todas las parejas de cebadores.

Finalmente y después de muchos intentos el resultado fue negativo, algo que no ha ocurrido únicamente con este gen sino también con otros como *icd*, *glnA* y *meIB*, todos pertenecientes a PCC 9511 (datos obtenidos por otros miembros del grupo). En este sentido se han analizado las causas por las que no se logran las amplificaciones en esta estirpe sin obtener explicación clara para esta particularidad.

2. GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE *Prochlorococcus* MIT9313

2.1 Rotura celular para la obtención de extractos crudos

2.1.1 Rotura celular mediante congelación y descongelación

El primer paso para llevar a cabo la detección de la actividad glutamato deshidrogenasa fue la rotura de la pared celular para obtener extractos crudos y medir dicha actividad. En estudios previos con la glutamina sintetasa (El Alaoui *et al.*, 2001; El Alaoui *et al.*, 2003) se ha descrito que mediante congelación a -20°C y descongelación se permite la salida de la GS para su posterior análisis.

En cianobacterias la GDH se ha asociado con la membrana de los tilacoides (Sallala & Nimera, 1990). Teniendo en cuenta lo anterior y que en *Prochlorococcus* los tilacoides están paralelos a la membrana celular (Shimada *et al.*, 1995) nuestros primeros intentos de detección de actividad enzimática se realizaron utilizando la fracción insoluble tras la rotura celular. No obstante, después de diversas modificaciones en cuanto a condiciones y mezcla de ensayo, no se observó actividad GDH. Esto nos llevó a analizar también la fracción soluble para saber si la

enzima se encontraba en ésta, de la misma manera se realizaron pruebas bajo diferentes condiciones y mezcla de ensayo, sin obtener indicios de actividad enzimática.

En este punto se consideró que aunque el procedimiento de congelación/descongelación rompía la pared celular, afectaba de alguna manera a la enzima provocando su inactivación.

2.1.2. Rotura celular mediante prensa de French

Este procedimiento se ha utilizado con frecuencia en otras cianobacterias como *Nostoc muscorum*, *Anabaena cilíndrica* y *Anacystis nidulans* (Papen *et al.*, 1983). Por otra parte, la rotura por prensa de French, se utilizó también en nuestro grupo para el estudio de la isocitrato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* (López-Lozano, F. A., 2007). Los extractos de *Prochlorococcus* se obtuvieron como se describe en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos. En estas condiciones, la glutamato deshidrogenasa se mantenía estable, obteniéndose actividad enzimática en la fracción soluble tras la rotura.

2.1.3. Rotura celular mediante perlas de vidrio

Una vez detectada la actividad se planteó la necesidad de utilizar una menor cantidad de suspensión celular para llevar a cabo la rotura, teniendo en cuenta que para romper con la prensa de French se requería un volumen mínimo de 2 mL de suspensión celular. Este volumen implicaba obtener cultivos como mínimo de 1 litro por punto de muestreo; es decir cuando se requería medir actividad enzimática y expresión génica, era necesario obtener volúmenes de cultivo de 20 L para cada experimento. Para aprovechar mejor los cultivos obtenidos y hacer más versátil su

manejo, diseñamos un método de rotura celular utilizando perlas de vidrio que requería 250 mL de cultivo por punto de muestreo, para obtener 500 μ L de suspensión celular, suficientes para la rotura por este método.

2.2 Detección y caracterización de la actividad NADP-GDH de *Prochlorococcus*

2.2.1 Detección de actividad NADPH-GDH

El gen *gdhA*, que codifica para la glutamato deshidrogenasa, se encuentra en las estirpes de profundidad MIT9313, MIT9303 y en las estirpes de superficie MIT9515 y MIT9215 (Kettler *et al.*, 2007). Con objeto de conocer el papel de esta enzima en el metabolismo del nitrógeno de *Prochlorococcus* inicialmente nos propusimos detectar la actividad NADPH-GDH.

La estirpe MIT9313 no es axénica, es decir coexiste con microorganismos heterótrofos, sin embargo en nuestras condiciones de cultivo predomina sobre ellos. Para conocer los niveles de actividad enzimática producidos por *Prochlorococcus* y por dichos microorganismos, se utilizaron extractos crudos de la estirpe MIT9313, y de las estirpes carentes del gen *gdhA*, SS120 (no axénica) y PCC 9511 (axénica). Comparando los niveles de actividad enzimática obtenidos en cada caso podríamos conocer los valores producidos por los microorganismos heterótrofos en el caso de la estirpe SS120, y los niveles producidos tanto por dichos organismos como por *Prochlorococcus*, en el caso de la estirpe MIT9313. La estirpe PCC 9511 se utilizó como control negativo para dicha detección.

Así, se partió de las condiciones de ensayo previamente descritas para otros organismos (Florencio *et al.*, 1987; Chávez & Candau, 1991; Inokuchi *et al.*, 1997; Young-Ju *et al.*, 2002), realizando las modificaciones y ajustes necesarios para la

óptima detección de la actividad con extractos de *Prochlorococcus*. Con objeto de verificar la detección en cada una de las condiciones y mezclas ensayadas se utilizó como control positivo una solución de glutamato deshidrogenasa de hígado de bovino (*Fluka*) a una concentración de 1 mg/mL (aprox 43 U/mg).

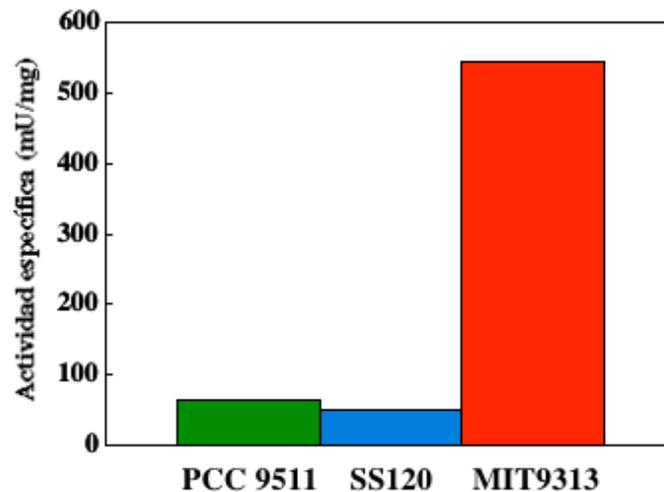


Figura 26. Actividad NADPH-GDH con extractos de diversas estirpes de *Prochlorococcus*.

Como se observa en la figura 26, nuestros resultados confirman la presencia de glutamato deshidrogenasa en su forma activa, en extractos de la estirpe de profundidad MIT9313. Comparando los niveles de actividad de dicha estirpe con los obtenidos en las estirpes SS120 (carente del gen *gdhA*) también de profundidad, y PCC 9511 (carente del gen *gdhA*) de superficie; se observa una diferencia significativa de aproximadamente un 90% más en MIT9313. Teniendo en cuenta que los valores obtenidos con la estirpes carentes del *gdhA* son similares en los dos casos y que la estirpe PCC 9511 es axénica, esto indica que el 10% restante obtenido puede ser ruido de fondo producido por el método de detección de la actividad, dado que a 340 nm no solo absorbe el NADPH sino también otros elementos presente en la mezcla de reacción. De cualquier forma dichos niveles de

actividad son poco representativos frente a MIT9313 y sugieren que son netamente producidos por esta estirpe.

2.2.2 Optimización del ensayo enzimático

2.2.2.1 Actividad GDH en el sentido aminante

Inicialmente se optimizó la mezcla de reacción para la detección de la actividad GDH en el sentido aminante, según lo descrito previamente para *Synechocystis* PCC 6803 (Florencio *et al.* , 1987), utilizando una mezcla que contenía Tris-HCl 85 mM pH 8,0, 2-oxoglutarato 10 mM, NH₄Cl 100 mM y NADPH 0,2 mM. Las reacciones se incubaron a 35°C. Teniendo en cuenta que después de recogidas las células de *Prochlorococcus* se resuspendían en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5, se optó por utilizar éste mismo como tampón para la reacción, ajustando su concentración a 85 mM y pH 8,0. Teniendo como base esta mezcla de reacción procedimos a optimizar la concentración de cada uno de los sustratos.

La concentración de cloruro de amonio fue el primer sustrato en optimizar; en la siguiente tabla se muestra como a una concentración de 150 mM se obtienen los mayores niveles de actividad.

Tabla 22. Actividad NADPH-GDH en función de la concentración de amonio

| Concentración final de cloruro de amonio (mM) | Actividad específica (mU/mg) |
|--|-------------------------------------|
| 50 | 373 ± 2,6 |
| 100 | 468,4 ± 30,1 |
| 150 | 514,7 ± 9,7 |

A continuación se probaron diferentes concentraciones de NADPH y NADH como cofactores (Tabla 23). Aunque en las bases de datos, el gen *gdhA* de *Prochlorococcus marinus* estirpe MIT9313 codifica para una glutamato

deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, era importante probar también el NADH teniendo en cuenta que existen glutamato deshidrogenasas que pueden utilizar las dos moléculas como cofactores (Scheid *et al.*, 1980; Carrigan *et al.*, 2005). Sin embargo al utilizar NADH no se detectó actividad enzimática con extractos de *Prochlorococcus* MIT9313, lo que sugería que en dicho organismo la enzima es NADPH dependiente. La concentración de NADPH a utilizar sería de 0,2 mM; esto coincidió con la concentración utilizada en otros estudios con cianobacterias (Florencio *et al.*, 1987; Chávez & Candau, 1991).

Tabla 23. Actividad NADPH-GDH en función de la concentración de NADPH

| Concentración final de NADPH (mM) | Actividad específica (mU/mg) |
|--|-------------------------------------|
| 0,1 | 481,9 ± 24,8 |
| 0,2 | 498,7 ± 2,9 |
| 0,3 | 440,2 ± 49,6 |

Es posible que una concentración superior afectara la enzima disminuyendo la actividad debido al exceso de sustrato.

También se optimizó la concentración de 2-oxoglutarato obteniendo un valor de 10 mM (Tabla 24), el cual está dentro de las concentraciones utilizadas para la detección de la actividad NADPH en otros organismos como *Aspergillus niger* (Choudhury & Puneekar, 2007), *Synechocystis* (Florencio *et al.*, 1987; Chávez & Candau, 1991) y *Klebsiella pneumoniae* (Kim *et al.*, 2002).

Tabla 24. Actividad NADPH-GDH en función de la concentración de 2-oxoglutarato

| Concentración de 2-oxoglutarato (mM) | Actividad específica (mU/mg) |
|---|-------------------------------------|
| 5 | 265,7 ± 59,5 |
| 10 | 440,9 ± 14,1 |
| 20 | 415,3 ± 39,3 |

Por otra parte, en plantas superiores las GDHs pueden afectarse por la presencia de cationes divalentes (Yoneyama & Kumazawa, 1974; Kindt *et al.*, 1980; Yamaya & Suzuki, 1984; Itagaki *et al.*, 1990); además en algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii* la actividad de tres isoenzimas de GDH se estimuló por iones de Ca^{2+} (Moyano *et al.*, 1992) y en el alga verde *Bryopsis maxima* la presencia de Ca^{2+} no tuvo ningún efecto sobre la actividad enzimática. Por tanto, quisimos observar el efecto de tres concentraciones diferentes de cloruro de calcio sobre la actividad NADPH-GDH.

Tabla 25. Actividad NADPH-GDH en función de la concentración de Ca^{2+}

| Mezcla de reacción | % Actividad específica |
|---------------------------|-------------------------------|
| Sin Ca^{2+} | 100 |
| CaCl_2 5 mM | 94,9 |
| CaCl_2 10 mM | 92,3 |
| CaCl_2 20 mM | 74,6 |

Los resultados obtenidos indican que los cationes divalentes de calcio no tienen un efecto significativo sobre la actividad NADPH-GDH, indicando que el calcio no actúa

como elemento de unión entre la enzima, el amonio o el 2-oxoglutarato, y que tampoco confiere a la enzima mayor estabilidad estructural para unirse a dichos sustratos.

2.2.2.2 Actividad GDH en el sentido desaminante

De la misma manera que se optimizó la mezcla de reacción para la detección de la actividad GDH en el sentido aminante, se procedió a optimizar dicha mezcla para la detección de la actividad enzimática en el sentido inverso de la reacción, es decir desaminante.

La mezcla de reacción patrón utilizada se basó en la descrita para *Synechocystis* PCC 6803 (Florencio *et al.* , 1987; Chávez & Candau, 1991) utilizando el mismo tampón Tris-HCl 85 mM y cambiando el pH a 9,0. La concentración de L-glutamato fue de 50 mM y la de NADP⁺ 2 mM. Dado que no se detectó actividad dependiente de NADH, no se intentó detectar actividad en el sentido desaminante utilizando NAD⁺. La mezcla de reacción se incubó a 35°C durante 10 minutos.

Tras los 10 min de incubación no se detectó actividad enzimática, por esto procedimos a incubar la mezcla durante 30 min, midiendo absorbancia a 340 nm cada 2 minutos. Transcurridos los 30 min pudimos observar niveles de actividad específica de entre 50 a 100 mU/mg los cuales eran razonables para *Prochlorococcus*, según lo observado en otras enzimas como Isocitrato deshidrogenasa (López-Lozano, F. A., 2007). Inicialmente se ensayó la actividad NADP-GDH en función de diferentes concentraciones de NADP⁺ (Tabla 26).

Tabla 26. Actividad NADP⁺- GDH en función de la concentración de NADP⁺

| Concentración de NADP⁺ (mM) | Actividad específica (mU/mg) |
|---|-------------------------------------|
| 1 | 74,2 ± 13,8 |
| 2 | 68,5 ± 9,8 |
| 3 | 63,7 ± 10,9 |

La concentración de NADP⁺ a utilizar para la detección de la actividad GDH en el sentido desaminante, es variable dependiendo del organismo. En la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 es de 2 mM (Florencio *et al.* , 1987), en el alga verde *Bryopsis maxima* es de 0,1 mM (Inokuchi *et al.* , 1997) y en *Klebsiella pneumoniae* de 5 mM (Young-Ju *et al.* , 2002). Según nuestros resultados, los niveles más altos de actividad específica se obtienen con una concentración de 1 mM. A concentración de 2 y 3 mM se produce un descenso de la actividad de hasta el 20%. A continuación se probaron 4 concentraciones diferentes de L-glutamato, principal sustrato de la reacción en el sentido desaminante (Tabla 27). El máximo valor de actividad se obtuvo utilizando 100 mM de L-glutamato. Sin embargo, se utilizó 50 mM teniendo en cuenta que en ensayos enzimáticos previos ésta ofreció mayor reproducibilidad y estabilidad en la mezcla de reacción.

Tabla 27. Actividad NADP-GDH en función de la concentración de L-glutamato

| Concentración de L-glutamato (mM) | Actividad específica (mU/mg) |
|--|-------------------------------------|
| 10 | 22,7 ± 6,7 |
| 20 | 41,1 ± 4,8 |
| 50 | 73,2 ± 10,1 |
| 100 | 96,6 ± 2,3 |

Finalmente se ensayó el efecto de la presencia de calcio sobre la mezcla de reacción, teniendo en cuenta que en la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803 la presencia de este catión divalente aumentó en un 108% la actividad desaminante (Florencio *et al.* , 1987). Sin embargo, los resultados obtenidos (Tabla 28) muestran que el Ca^{2+} 10 mM incrementó la actividad específica de la NADP-GDH en tan solo un 16% de su valor normal. Consideramos que dicho aumento es poco significativo y que la presencia de calcio no es determinante para la detección de la actividad en el sentido desaminante.

Tabla 28. Actividad NADP-GDH en función de la concentración de Ca^{2+}

| Mezcla de reacción | Actividad específica (mU) |
|---------------------------|----------------------------------|
| Sin CaCl_2 | 83,9 ± 7,7 |
| CaCl_2 5 mM | 95,9 ± 9,1 |
| CaCl_2 10 mM | 97,5 ± 11,9 |
| CaCl_2 20 mM | 95,1 ± 15,9 |

2.3 Caracterización de la actividad NADP(H)-GDH

2.3.1 Caracterización del ensayo enzimático

Para caracterizar la actividad GDH tanto en el sentido aminante como en el desaminante, se utilizaron datos obtenidos en ensayos que incluían mezclas de reacción deficientes de cada uno de los componentes, utilizados en un momento dado como controles negativos. Esto permitió descartar que la actividad enzimática obtenida fuese producto de un artefacto en la metodología de detección de la misma. Comparadas dichas mezclas de reacción fue posible afirmar que el NADPH reducido u oxidado era producto de la presencia de la GDH en el extracto crudo de *Prochlorococcus* MIT9313.

Los resultados confirman que la actividad enzimática detectada bajo nuestras condiciones de ensayo, fue de origen enzimático y no debido a una catálisis química. Como se observa en la tabla anterior, únicamente en las mezclas de reacción (aminante y desaminante) que contenían los componentes necesarios se produjo un descenso en la concentración de NADPH, para el caso de la reacción de aminación, o un incremento en la concentración del mismo, para el caso de la reacción de desaminación.

Tabla 29. Caracterización del ensayo de la NADP(H)-GDH de *Prochlorococcus MIT9313*

| Mezcla de reacción | Actividad específica (mU/mg) |
|---------------------------|-------------------------------------|
| Completa (aminante) | 170,28 |
| Sin NH ₄ Cl | 0 |
| Sin 2-oxoglutarato | 0 |
| Sin NADPH | 0 |
| Sin Extracto crudo | 0 |
| Completa (desaminante) | 45,5 |
| Sin L-glutamato | 0 |
| Sin NADP ⁺ | 0 |
| Sin Extracto | 0 |

2.3.2 Actividad aminante vs desaminante

En diversos organismos, la actividad aminante es mayor que la desaminante, es decir la relación aminante:desaminante es superior a 1. Por ejemplo, en el alga verde *Bryopsis maxima* la actividad desaminante es aproximadamente un 60% menor que la aminante (Inokuchi *et al.* , 1997), en la cianobacteria *Synechocystis*

PCC 6803 la actividad desaminante es el 12 % de la aminante para la NADPH-GDH en ausencia de iones de calcio (Florencio *et al.* , 1987). En la arqueobacteria termofílica *Thermococcus* spp la actividad desaminante es un 16% de la actividad aminante (Hudson *et al.*, 1993). No obstante, para algunos organismos el hecho de que la actividad aminante sea mayor que la desaminante no supone que a nivel fisiológico el sentido de la reacción sea una aminación reductiva, dado que los valores de actividad son obtenidos bajo condiciones experimentales que pueden ser diferentes en la célula y no reproducibles en el laboratorio.

Bajo nuestras condiciones de ensayo, en *Prochlorococcus* MIT9313 la actividad desaminante resultó ser un 18 – 20 % de la actividad aminante, coincidiendo con la tendencia mostrada por los organismos antes mencionados.

2.3.3 Determinación de la temperatura óptima para la actividad GDH

La temperatura óptima de un ensayo enzimático se define como la temperatura a la que se obtienen los máximos valores de actividad específica, y bajo la cual dicha actividad es estable durante la medición (Segel, 1975). Optimizada la mezcla de reacción, se determinó la temperatura óptima a la cual el NADPH se reducía, en el caso de la reacción aminante, ó a la que el NADP⁺ se oxidaba, en el caso de la reacción en el sentido desaminante.

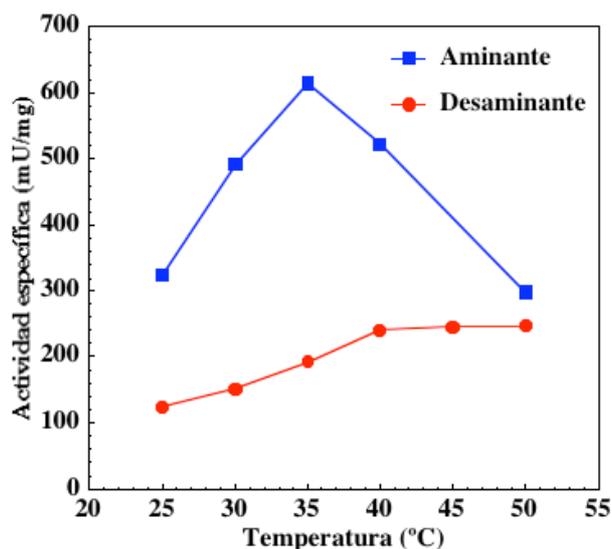


Figura 27. Curvas de temperatura óptima de la actividad GDH de *Prochlorococcus MIT9313*

En otros microorganismos se ha descrito que la temperatura óptima de la actividad GDH, en ambos sentidos de la reacción, se encontraba entre 25 a 30°C, aunque existen GDH que muestran actividad a temperaturas superiores a 50°C como en el caso de la cianobacteria *Phormidium laminosum* (Martinez-Bilbao *et al.*, 1988). La temperatura óptima obtenida bajo nuestras condiciones de ensayo con extractos de *Prochlorococcus MIT9313* fue de 35°C para la actividad aminante y 40°C la reacción en el sentido desaminante.

2.3.4 Determinación del pH óptimo

Para la determinación del pH óptimo de las reacciones aminante y desaminante, se utilizó una mezcla de Tris, MOPS y Glicina, tampones cuyos pK_a permiten cubrir límites de pH desde 6,5 hasta 10,5. La concentración final de esta mezcla fue de 400 mM para cada tampón. A continuación se hicieron 7 alícuotas de 30 mL cada una ajustando el pH asignado a las mismas (7,0 – 7,5 – 8,0 – 8,5 – 9,0 – 9,5 y 10) con NaOH o HCl según el caso. Seguidamente se completó el volumen de cada

disolución hasta 60 mL obteniendo una concentración del tampón mezcla de 200 mM. Finalmente se utilizó cada una de las disoluciones con su pH respectivo para medir la actividad enzimática en ambos sentidos de la reacción. Como se ha mencionado anteriormente la concentración final del tampón en la mezcla de ensayo para la detección de la actividad NADP(H)-GDH fue de 85 mM. En la figura 28 se muestra como el pH óptimo de actividad varía dependiendo del sentido de la reacción.

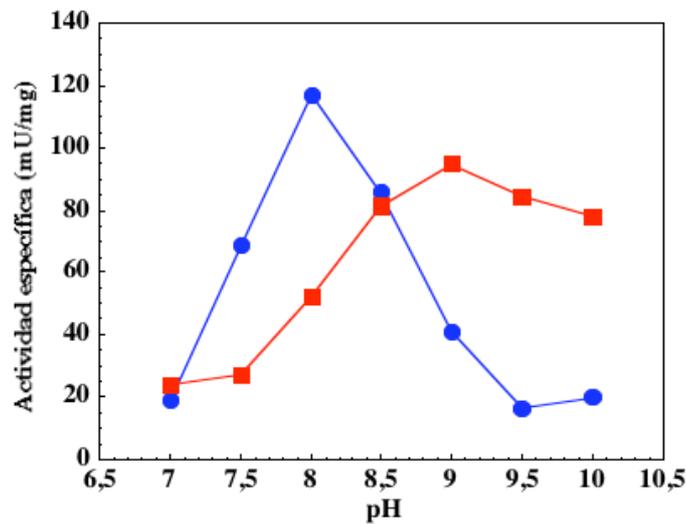


Figura 28. Curva de pH óptimo para la actividad GDH (●) aminante y (■) desaminante

La mayor actividad en el sentido aminante se observó a pH 8. La reacción en el sentido desaminante mostró un mejor comportamiento a pH 9. Estas diferencias de pH entre el sentido de la reacción no son desconocidas, de la misma manera ocurre en otras cianobacterias como *Synechocystis* PCC6803, (Florencio *et al.* , 1987), la enterobacteria *Klebsiella pneumoniae* (Young-Ju *et al.* , 2002), en algas verdes como *Bryopsis maxima* con pH óptimo para la aminación reductiva de 7,5 y 8,6 para la desaminación oxidativa (Inokuchi *et al.* , 1997) o en células eucariotas como en el

hongo *Aspergillus niger* con un pH óptimo para la reacción aminante de 8,0 y 9,3 para la reacción desaminante.

Según el pH del medio, los grupos de unión a sustrato de las enzimas presentes en las cadenas laterales de sus aminoácidos, pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. El hecho de que la GDH de *Prochlorococcus* MIT9313 muestre diferente pH para la actividad aminante que la desaminante, sugiere que para cada sentido de la reacción es necesario que dichas cargas cambien para darle a la enzima la conformación adecuada para la actividad catalítica.

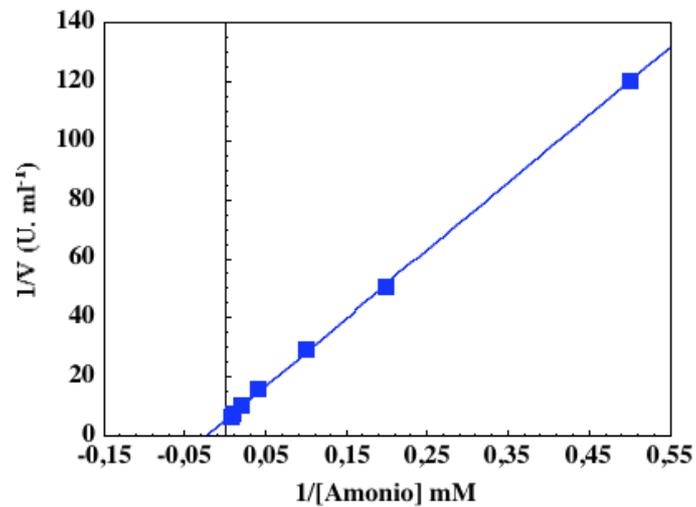
2.3.5 Determinación de las constantes de Michaelis-Menten (K_m) para los sustratos de la actividad glutamato deshidrogenasa

Para el cálculo de las constantes de Michaelis-Menten se midió la actividad enzimática en diferentes concentraciones de sustrato, utilizando extractos crudos de *Prochlorococcus* MIT9313.

A continuación se representaron los inversos de las velocidades iniciales frente a los inversos de las concentraciones de sustrato utilizadas (método de Lineweaver-Burke). En el caso del 2-oxoglutarato se representó el cociente entre la concentración de sustrato y la velocidad frente a la concentración de sustrato (método de *Hanes or Woolf*). Este método fue utilizado teniendo en cuenta que fue la representación permitió un mejor ajuste de los datos obtenidos y un coeficiente de correlación de la recta más alto. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 29 a 32. Los valores de K_m se calcularon mediante la ecuación de la recta obtenida en cada una de las representaciones con cada sustrato. Las constantes se relacionan en la siguiente tabla.

Tabla 30. Valores de K_m para la GDH de *Prochlorococcus MIT9313*

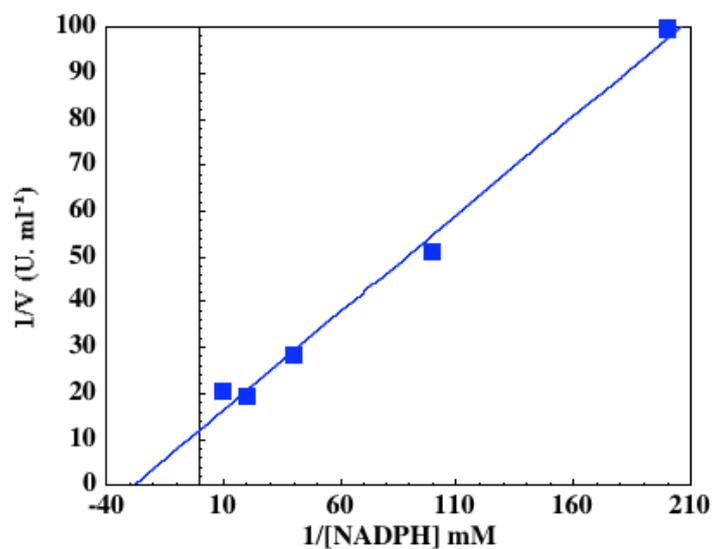
| Sustrato | K_m (mM) |
|----------------|------------|
| Amonio | 43,72 |
| NADPH | 0,035 |
| L- glutamato | 56,45 |
| 2-oxoglutarato | 5,8 |



$$1/V = 229,6178 (1/[amonio]) + 5,251762$$

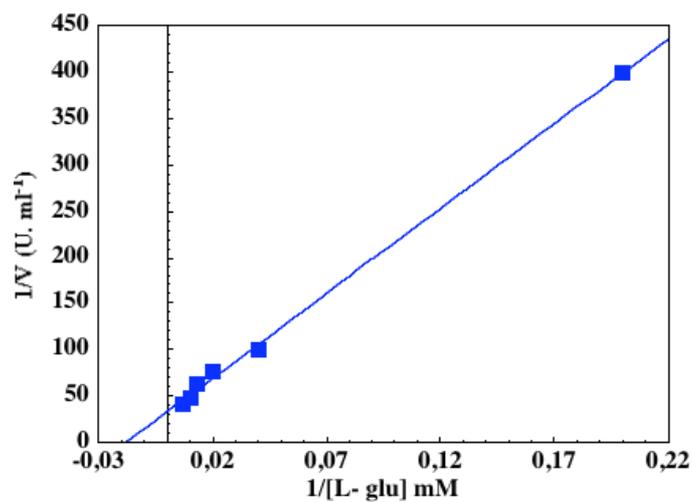
$$R^2 = 0,9996418$$

Figura 29. Cálculo de constante de Michaelis-Menten para el amonio



$$1/V = 0,4277248 (1/[NADPH]) + 12,1402$$
$$R^2 = 0,9921603$$

Figura 30. Cálculo de constante de Michaelis-Menten para el NADPH



$$1/V = 1835,449 (1/[L-glu]) + 32,51704$$
$$R^2 = 0,9984431$$

Figura 31. Cálculo de constante de Michaelis-Menten para el glutamato

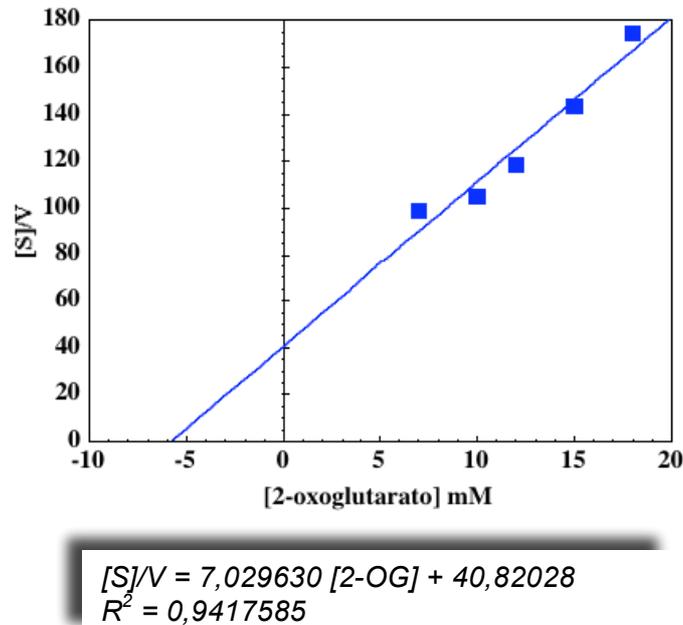


Figura 32. Cálculo de K_m para el 2-oxoglutarato según el método de Hanes or Woolf

Inicialmente es de resaltar que los valores se obtuvieron utilizando extractos crudos de *Prochlorococcus* MIT9313. Esto pudo influir de manera significativa en los resultados finales teniendo en cuenta que en dichos extractos no solo se añaden a la mezcla de reacción la glutamato deshidrogenasa de dicha estirpe, sino otros elementos o compuestos que podrían afectar la medición final, tales como diversos sustratos, iones, otras proteínas, etc.

Por ello es importante repetir dicha determinación utilizando la proteína purificada, no obstante los valores obtenidos proporcionaron información acerca de la afinidad de la enzima por los sustratos.

Por otra parte, analizando los valores de K_m para cada uno de los sustratos en diversas especies (Hudson & Daniel, 1993), se observa una amplia variabilidad entre los valores para el amonio y el glutamato; por ejemplo, en *Chlamydomonas reinhardtii* la isoenzima 1 posee un valor de K_m para el glutamato de 0,64 mM y para el amonio de 36 mM (Moyano *et al.*, 1992), mientras que en

Salmonella typhimurium ocurre lo contrario, la K_m para el glutamato es de 50 mM y para el amonio de 0,29 mM (Coulton & Kapoor, 1973). También es posible que los valores entre uno y otro sustrato sean similares y no difieran como en el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con una K_m de 10 y 11 mM para el glutamato y el amonio, respectivamente. Estas diferencias evidencian la amplia diversidad de GDHs que existen, y que las K_m para las glutamato deshidrogenasas dependen de las especies y del ambiente en el que se desarrollan las mismas.

En cuanto a los valores obtenidos con extractos de *Prochlorococcus* MIT9313, aparentemente existe una mayor afinidad por el amonio que por el glutamato. Aunque los valores de K_m para el amonio y el glutamato no definan el sentido de la reacción (aminante ó desaminante), es posible que la GDH de este organismo tenga una doble función, dado que aunque exista una mayor afinidad por el amonio, los valores son similares.

Comparando los valores de K_m para el amonio obtenidos tanto para GS (El Alaoui *et al.* , 2003) como para la GDH en *Prochlorococcus* se observa la misma situación que en otros organismos, en los cuales la GS muestra una mayor afinidad por el amonio que la GDH. Esto sugiere que en *Prochlorococcus* la GS es la principal vía de asimilación de amonio. Incluyendo en esta comparación el valor obtenido para el 2-oxoglutarato, de los tres sustratos implicados en la reacción, la GDH muestra una mayor afinidad por este último.

En la tabla 30 se observa que la GDH necesita altas concentraciones tanto de amonio como de glutamato para que la enzima funcione a la mitad de su velocidad máxima. En condiciones en las que las concentraciones de sustrato no alcancen estos valores la GDH llevará a cabo su función a velocidades muy inferiores a dicha velocidad.

2.4 Optimización de determinación de la expresión génica por qRT-PCR en tiempo real

Para la aplicación de la técnica de RT-PCR en tiempo real es necesario que tanto la pareja de cebadores del gen problema, como la pareja de cebadores del gen control interno (gen con expresión constitutiva), tengan una eficiencia de entre el 80 y el 100%. Como ya se ha mencionado, esto significa que dichas parejas de cebadores amplificarán, a partir de una molécula molde de ADN, dos moléculas nuevas del fragmento por cada ciclo de PCR con una eficiencia de entre el 80 y el 100%.

2.4.1 Cálculo de la eficiencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen *gdhA* de *Prochlorococcus* MIT9313.

Como se describe en el apartado 7.5.4 del capítulo anterior, se utilizaron diluciones de ADNc de 600, 400, 200 y 80 ng/ μ L. A continuación se preparó una mezcla de PCR para cada concentración de ADNc como se ha descrito previamente en la tabla 16. La concentración final de cebadores utilizada fue de 0,12 pmoles/ μ L para cada una de las diluciones. Seguidamente se representaron los valores de Ct obtenidos para cada dilución, frente al log en base 10 de cada concentración de ADNc utilizada.

La pendiente de la recta obtenida, según la representación de los datos en la figura 33 fue de -3,16. Reemplazando dicho valor en la ecuación:

$$E = [10^{(-1/m)} - 1] \times 100$$

$$E = [10^{(-1/-3,16)} - 1] \times 100$$

$$E = [10^{(0,32)} - 1] \times 100 = 108 \%$$

En nuestro caso obtuvimos una eficiencia de 108%. Eficiencias superiores al 100% generalmente indican error de pipeteo en la preparación de las diluciones de ADNc y de cada una de las series, también coamplificación de productos inespecíficos como dimeros de primer.

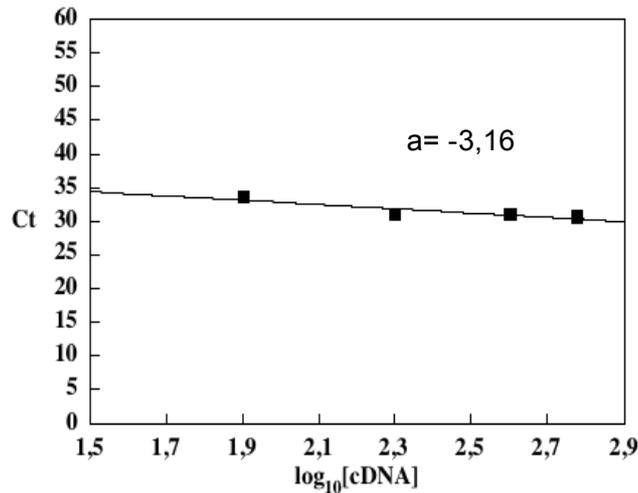


Figura 33. Eficiencia de los cebadores diseñados para el gen *gdhA*

Sin embargo en la práctica es normal encontrar eficiencias entre el 90 y el 110 %, lo que sugiere que la pareja de cebadores utilizada para la amplificación del gen *gdhA* de *Prochlorococcus* MIT9313 es óptima para su aplicación en la técnica.

2.4.2 Cálculo de la eficiencia de los cebadores utilizados para la amplificación del gen *rnpB* de *Prochlorococcus* MIT9313.

El gen *rnpB* que codifica para una ribonucleasa tipo P (RNase P) precursora de la secuencia de ARN, se encuentra en bacterias, arqueobacterias y cianobacterias, y se ha utilizado como control interno en diferentes estudios de expresión mediante RT-PCR en tiempo real. Este gen se ha utilizado también como control interno en otros estudios de expresión con *Prochlorococcus* (Mary & Vaultot, 2003).

Para utilizar el gen *rnpB* como control interno se diseñó una pareja de cebadores específica para un fragmento del gen en base al genoma de la estirpe MIT9313. A continuación se procedió al cálculo de su eficiencia, así como se describe en el apartado anterior. Utilizando concentraciones conocidas de ADNc de 800, 600, 400, 200 y 80 ng/ μ L, se prepararon mezclas de PCR con 4 concentraciones finales por cada cebador: 0,12, 0,24, 0,36 y 0,48 pmoles/ μ L. Finalmente se representaron los valores de Ct obtenidos para cada concentración de cebador frente al logaritmo en base 10 de cada concentración de ADNc.

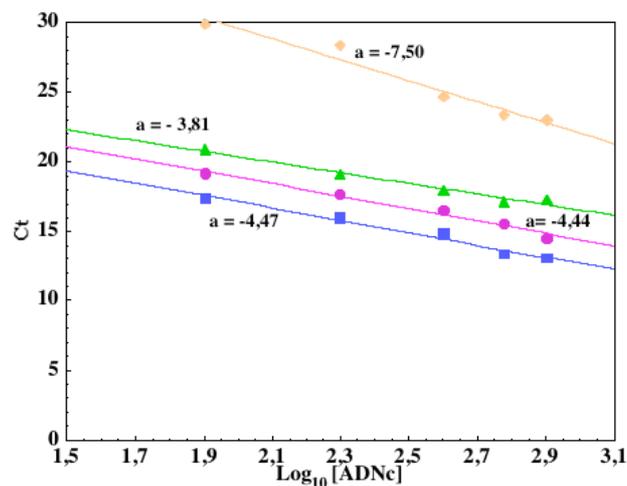


Figura 34. Eficiencia de los cebadores diseñados para la el gen *rnpB* de la estirpe MIT9313. En la gráfica se representan los datos correspondientes a la concentración final de cada cebador en la mezcla de PCR (◆) 0,12 pmoles/ μ L, (▲) 0,24 pmoles/ μ L, (●) 0,36 pmoles/ μ L y (■) 0, 48 pmoles/ μ L.

La mejor eficiencia obtenida se obtuvo utilizando una concentración final en la mezcla de PCR, por cada cebador de 0,24 pmoles/ μ L, es decir añadiendo 2 μ L de cada cebador por reacción de PCR. Esto significa que bajo nuestras condiciones de experimentación la pareja de cebadores para la amplificación del gen *rnpB*, por cada molécula de ADN molde amplificarán dos nuevas moléculas de ADN en cada ciclo de PCR, con una eficiencia del 87%.

2.5 Amplificación y clonación del gen *gdhA* de *Prochlorococcus* MIT9313

Prochlorococcus muestra a lo largo de año épocas de proliferación y épocas de dificultad para el crecimiento de los cultivos (Moore, 1997). Actualmente no se conoce un patrón de comportamiento de dichas épocas como tampoco las razones que justifiquen este hecho. Es decir en algunas épocas del año es posible obtener cultivos en abundancia en cuanto a volumen, mientras que en otras los cultivos más pequeños, de 50 mL, muestran un crecimiento limitado.

En función de esto, planteamos clonar el gen *gdhA* en *E. coli* utilizando el vector pGEM-T de esta manera se obtendrían copias del gen independiente a la obtención de cultivos de *Prochlorococcus*. Posteriormente se clonaría dicho gen en un vector de expresión para purificar la GDH. Para llevar a cabo esta estrategia fue necesario en primera instancia amplificar el gen *gdhA*.

2.5.1 Amplificación del gen *gdhA* de *Prochlorococcus* MIT9313

Para la amplificación del gen *gdhA* que codifica para la glutamato deshidrogenasa, se diseñó una pareja de cebadores que denominamos FEGA/REGA (forward expresión *gdhA*/Reverse expresión *gdhA*) ver apartado 7.3.3 (Materiales y Métodos). Para las reacciones de PCR se utilizaron como sustratos células enteras, células sometidas a congelación/descongelación previo a la PCR, ADN genómico puro, ADN genómico diluído 1/100 y 1/1000. Al protocolo de amplificación se le modificó principalmente la temperatura de hibridación.

Tras varios ensayos con gradientes de temperatura y los diferentes sustratos se logró la amplificación del fragmento deseado con el siguiente protocolo:

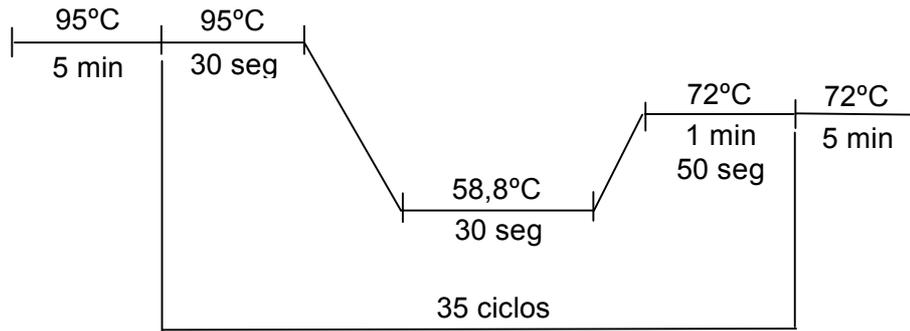


Figura 35. Protocolo de amplificación del gen *gdhA*

El gen *gdhA* tiene un tamaño de 1.356 pb y la pareja de cebadores FEGA/REGA amplifican un fragmento de 1.569 pb.

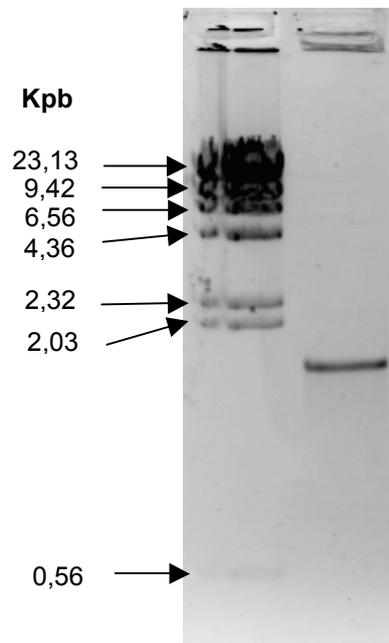


Figura 36. Amplificación del gen *gdhA*. En la calle 1 se observa el fago λ digerido con *HindIII* como marcadores de peso molecular, en la siguiente calle la banda obtenida utilizando como sustrato células enteras.

Utilizando como sustrato células enteras de la estirpe MIT9313 se obtuvo una única banda que, según los cálculos tiene un tamaño aproximado a 1.900 pb. Dicha banda se cortó y purificó para su posterior secuenciación en la Unidad de Genómica del Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de

Córdoba. Obtenida la secuencia se realizó un análisis informático para compararla con la secuencia de ADN descrita en las bases de datos para el gen *gdhA* de *Prochlorococcus* MIT9313. Nuestra secuencia mostró un porcentaje de identidad del 94% lo que nos confirmó que habíamos amplificado efectivamente la secuencia del gen *gdhA*.

2.5.2 Clonación del gen *gdhA*

2.5.2.1 Clonación en el vector pGEM-T

Mediante el sistema de clonación *pGEM-T easy vector* y células de *Escherichia coli* HB101, siguiendo las instrucciones del fabricante se obtuvieron 3 posibles clones (figura 37A) que tendrían por inserto el gen *gdhA*.

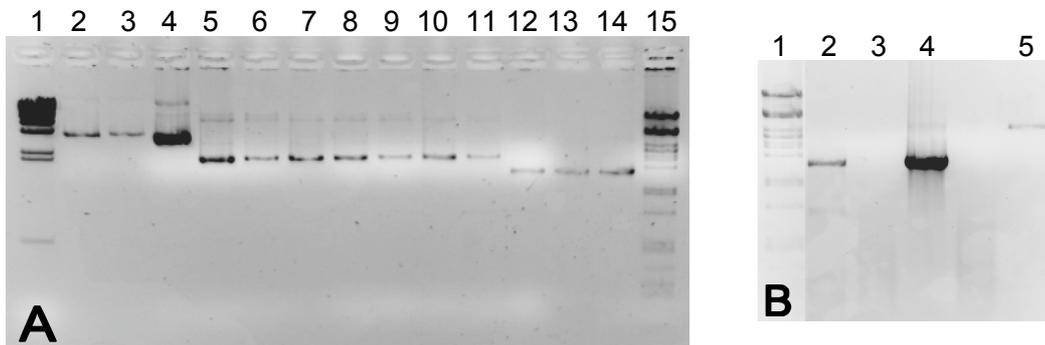


Figura 37. (A) ADN plasmídico obtenido a partir de las colonias resistentes a ampicilina en placas de agar LBA. El plásmido pGEM-T (3 Kb) sumado el inserto (1,5 Kb) muestran bandas de aprox 4,5 Kb. En las calles 2 a 4 se observan 3 posibles clones positivos. En las calles 5 a 11 se observan clones negativos, y en las calles 12 a 15 controles del gen *gdhA*. Las calles 1 y 15 corresponden a marcadores de peso molecular, λ HindIII y λ pstI. **(B)** En la calle 2 se observa un control positivo de *gdhA*. La calle 3 corresponde a un control negativo. En la calle 4 el inserto amplificado a partir de ADN plasmídico y en la calle 5 un control con pGEM-T.

La confirmación de los clones se realizó mediante PCR utilizando la pareja de cebadores FEGA/REGA, empleada para la amplificación del gen, y como sustrato ADN plasmídico de cada clon. De esta manera obtuvimos un clon positivo con nuestro gen de interés como inserto (figura 37B).

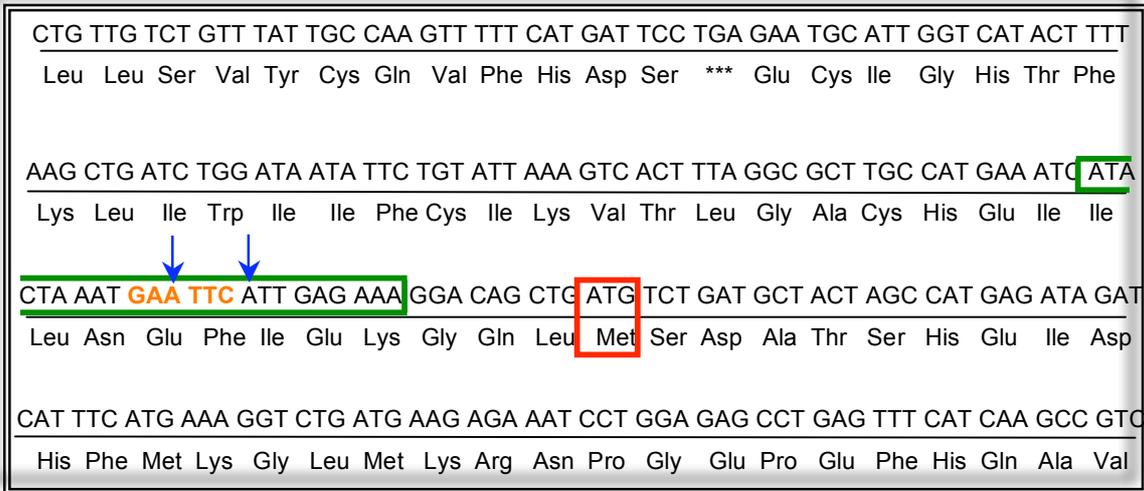
2.5.2.2. Clonación en el vector de expresión pGEX-4T -1

Siguiendo con la estrategia de clonación y sobreexpresión se clonó el gen *gdhA* en el vector pGEX-4T-1 que permite sobreexpresar proteínas junto a la glutatión transferasa, es decir como proteínas de fusión.

Inicialmente, a partir de la secuencia del fragmento que amplificaron los cebadores FEGA/REGA (secuencia FEGA/REGA) se buscaron sitios de restricción para las enzimas *BamH I*, *EcoR I*, *Sma I*, *Sal I*, *Xho I*, y *Not I*, todas ellas específicas para dicho vector. Así, se observó que excepto *EcoR I*, todas las demás enzimas cortaban al interior del fragmento en algún sitio. Sin embargo, la secuencia del fragmento amplificado no mostraba sitios de corte para *EcoR I* en sus extremos. Con objeto de obtener los sitios de restricción para dicha enzima se diseñaron cebadores degenerados. En la figura 38 se observa el inicio y el final de la secuencia a insertar, resaltando los cebadores degenerados y las mutaciones obtenidas.

Insertada la mutación mediante PCR se procedió al corte con *EcoR I*, para la posterior fosforilación del inserto, ligación con el vector pGEX-4T-1 y transformación en células competentes de *Escherichia coli* BL21. Con este procedimiento se obtuvieron 8 posibles clones con o sin inserto.

A



B

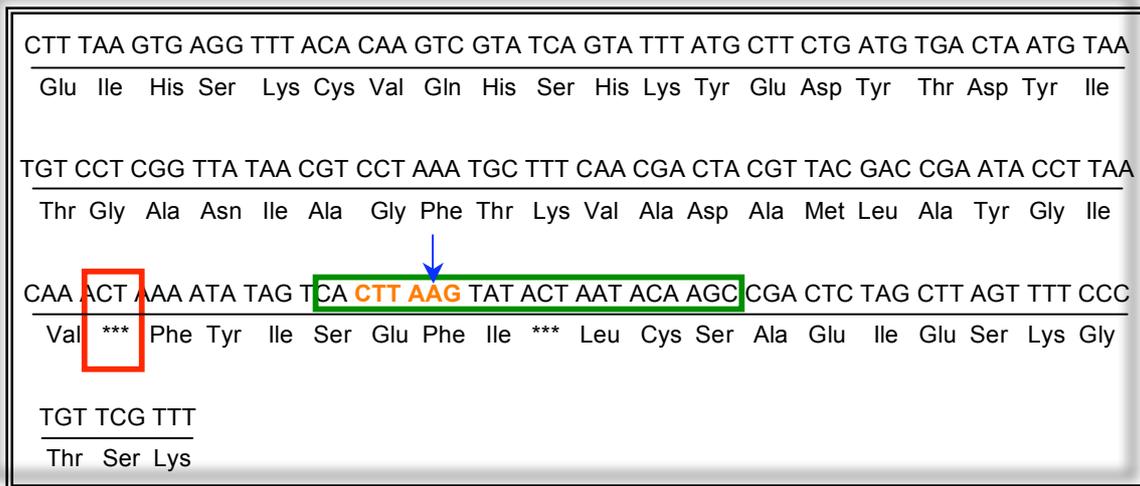


Figura 38. Diseño de cebadores degenerados para la clonación del gen *gdhA* en el vector de expresión pGEX-4T-1. En la **figura A**, resaltado en rojo se muestra el inicio de la transcripción, el cebador forward se observa enmarcado en verde, **sitio de restricción para *EcoR I***, las flechas azules indican la transversión de citosina por adenina y la inserción de adenina. En la **figura B**, se observa resaltado en rojo el fin de la transcripción, enmarcado en verde el cebador reverse, **sitio de restricción para *EcoR I***, la flecha azul indica el reemplazo de timina por adenina.

Para saber si los clones obtenidos contenían el gen *gdhA* funcional, se realizó una prueba de expresión de cada uno de ellos induciendo la expresión con IPTG. A

continuación las células transformantes se incubaron a 100°C durante 5 minutos para posteriormente ser analizadas mediante una SDS-PAGE. En todo el proceso de la prueba se incluyó un control negativo carente del inserto.

Esta prueba se realizó teniendo en cuenta que, en experiencias previas se obtuvieron clones positivos que tras verificar la secuencia de ADN del inserto no expresaron el complejo GST+GDH.

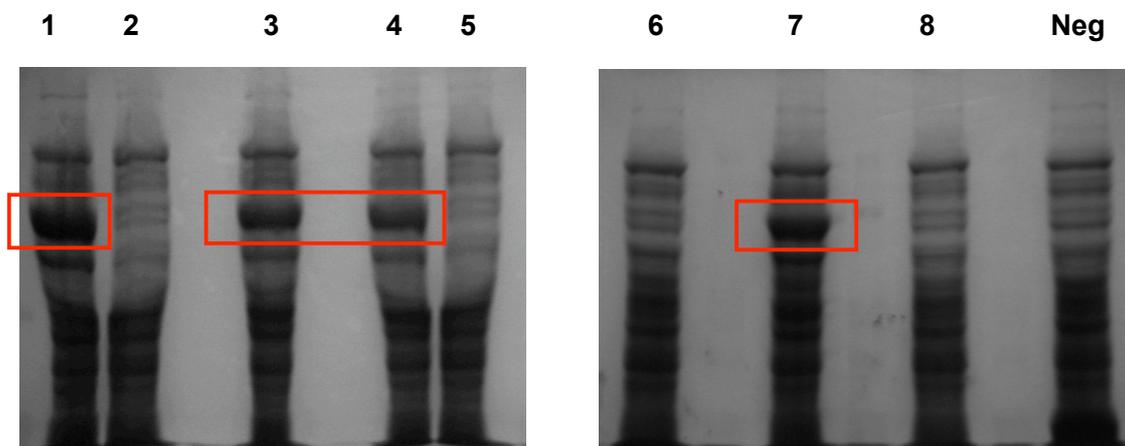


Figura 39. Electroforesis SDS-PAGE de las muestras obtenidas tras la inducción con IPTG. En las calles 1, 3, 4 y 7 se observa una banda claramente diferenciada de las demás, la cual corresponde al complejo formado entre GDH+GST (80 KDa aprox). Comparadas con el control negativo (plásmido sin inserto), las demás colonias transformantes no mostraron expresión.

Esto puede ocurrir en sistemas heterólogos de expresión como consecuencia de la posible degradación protéica o por cambios post-traduccionales producidos por el metabolismo de *Escherichia coli*.

Los resultados obtenidos confirman la presencia del gen *gdhA*, en fase y con sentido de lectura, dentro del plásmido de expresión pGEX-4T-1. Además, el gen se expresa en presencia de IPTG, lo que permitió continuar con la siguiente fase

que consistió en ajustar las condiciones de expresión para volúmenes superiores con objeto de obtener una cantidad considerable de proteína para su purificación.

2.6 Sobreexpresión y purificación de la GDH de *Prochlorococcus* MIT9313.

Para lograr la sobreexpresión y purificación de la GDH utilizando los clones obtenidos fue necesario optimizar las condiciones de expresión.

1. La *densidad óptica del cultivo a 600 nm antes de la inducción* de 1,4 fue el punto en el cual se obtuvo la mayor cantidad de proteína en la fracción soluble limitando la formación de cuerpos de inclusión.

2. *Concentración de IPTG, temperatura, tiempo y agitación para la inducción de la sobreexpresión*, factores determinantes especialmente por el efecto que ejercen sobre la formación de cuerpos de inclusión. En nuestro caso, la mayor cantidad de proteína se obtuvo en la fracción insoluble, es decir como cuerpos de inclusión. En este sentido se optimizaron las condiciones mencionadas para favorecer la obtención de proteína en la fracción soluble.

3. El *Método de rotura celular* que nos ofreció mayor eficacia, rendimiento y estabilidad a las proteínas de fusión fue la prensa de French.

4. *Utilización de inhibidores de proteasas y su concentración óptima*, para aumentar la concentración de proteína de fusión disponible en la fracción soluble.

5. *Concentración óptima de Triton X-100*, para permitir una mayor solubilización del complejo GDH+GST.

6. *Utilización y concentración óptima de DTT* como agente que favoreció la unión de la GST a la columna de glutatión en el proceso de purificación.

Finalmente las condiciones óptimas de expresión y purificación obtenidos se describen en materiales y métodos, apartados 8.7 y 9.1, respectivamente. Este

procedimiento se realizó con los clones numero 1 y 4 (ver figura 39), al obtener la secuencia del inserto (gen *gdhA*) se comprobó que aunque en ambos se observaba expresión de la proteína, el clon 4 presentaban dos mutaciones puntuales, una en el aminoácido 94 (lisina por arginina) y la otra en el aminoácido 178 (isoleucina por valina). Comparando la secuencia de aminoácidos de *Prochlorococcus* MIT9313 con otras cianobacterias, se pudo observar que la primera mutación se encuentra en un sitio conservado en los demás organismos, sugiriendo que dicha lisina podría tener un papel importante a nivel estructural.

La otra mutación no se encuentra en un sitio conservado por otras cianobacterias indicando que aparentemente no es muy relevante. De otra parte el clon 1 no mostró mutaciones por lo que se optó por utilizar éste durante todo el proceso de sobreexpresión y purificación.

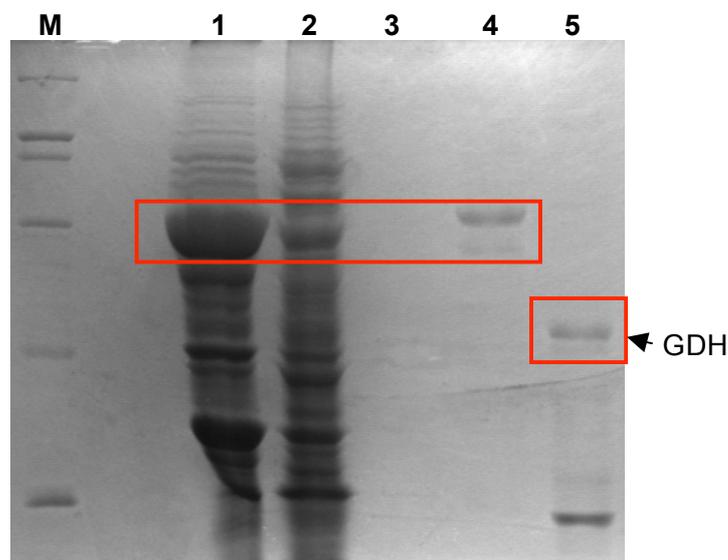


Figura 40. Electroforesis con cada una de las fracciones del proceso de purificación de GDH. (M) Corresponde a los marcadores de peso molecular Broad Range de Biorad. La calle 1 muestra la acumulación de GDH formando cuerpos de inclusión en la fracción insoluble tras la rotura celular. La calle 2 contiene la fracción soluble antes de su paso por la columna de glutatión. La banda obtenida en la calle 4 corresponde al complejo GDH + GST tras la elución con glutatión reducido. En la calle 5 se puede observar la GDH tras la proteólisis con trombina.

Como se observa en la figura anterior, la mayor cantidad de proteína sobreexpresada se mantenía en la fracción insoluble tras la rotura celular. Es decir, dicha proteína se acumuló en la membrana celular de *E. coli* BL21 formando cuerpos de inclusión. En este punto se probaron diferentes procedimientos para la recuperación de la proteína a partir estos sin obtener éxito. Con objeto de obtener la mayor cantidad de proteína en la fracción soluble, se optimizó el procedimiento de sobreexpresión hasta obtener los niveles que se observan en la calle 2 de la figura 40. De esta manera logramos obtener una pequeña parte de GDH que sería suficiente para las posteriores pruebas de actividad.

Una vez realizada la proteólisis, utilizando la fracción que contenía tanto GDH como GST (calle 5 figura 40), se realizaron pruebas para determinar la funcionalidad de la proteína. No obstante, después de muchos intentos variando las concentraciones de proteína y sustratos, además de buscar la actividad en el sentido aminante y desaminante, e incluso adicionar a las mezclas de reacción cloruro cálcico, no se detectó actividad GDH.

Las razones por las que la GDH no mostró actividad pueden ser diversas. La sobreexpresión y purificación de proteínas utilizando sistemas heterólogos puede llevar a obtener proteínas no funcionales debido a que en los organismos utilizados, en nuestro caso *E.coli*, las proteínas no se expresan de la misma manera que de forma natural. La proteína se ve afectada principalmente en cuanto a la estructura dado que después de la sobreexpresión se generan monómeros que necesitan, en muchos casos, unirse a otros para obtener una conformación que permita la unión a sustratos y promueva la actividad enzimática.

La GDH obtenida se usó para obtener anticuerpos que fueron aplicados en la técnica del *Western blotting* para la detección de proteína en estudios fisiológicos.

2.7 Obtención de anticuerpos anti-GDH de *Prochlorococcus*

La GDH obtenida se concentró utilizando un tubo Centricon de *Eppendorf* centrifugando a 4.000 g durante 30 min.

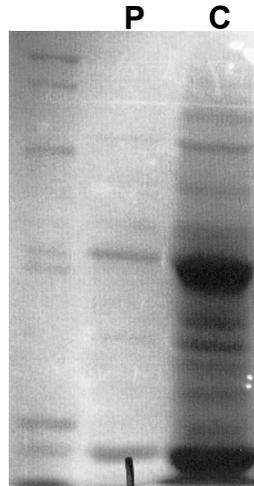


Figura 41. Electroforesis con la GDH obtenida tras la proteólisis y antes de concentrarla (P) y después de la concentración con el tubo Centricon (C)

El concentrado de GDH se extrajo a partir de los geles de acrilamida (apartado 9.3 de Materiales y Métodos) y se utilizó para producir anticuerpos en conejos.

Después de obtenidos y purificados los anticuerpos (según apartado 10 del capítulo anterior) se realizaron las pruebas para la detección de GDH de *Prochlorococcus* MIT9313. Tras la optimización del *Western blotting*, se detectó la proteína utilizando la fracción obtenida después de la elución en el procedimiento de purificación, es decir GDH+GST. La detección se logró utilizando los anticuerpos obtenidos en el antisuero número 4. Éste fue extraído después de la 5ª dosis según la pauta de inmunización (Tabla 21).

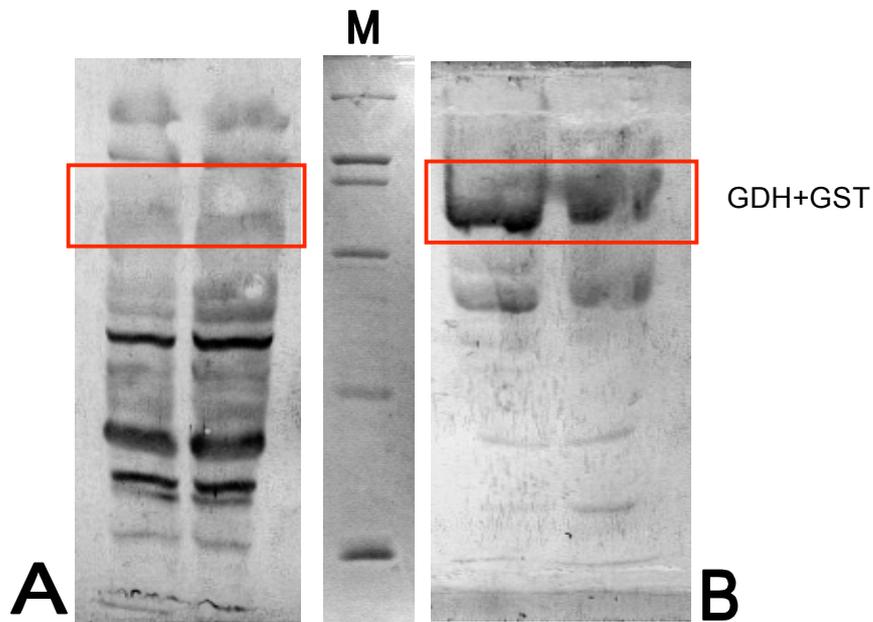


Figura 42. Western blotting de prueba de antigenicidad para anti-GDH. (M) Marcadores de peso molecular broad range de Biorad. La imagen A corresponde a muestras de GST+GDH utilizando como anticuerpo primario suero no inmune. La imagen B, muestra la reacción GDH+GST frente al antisuero n° 4.

Finalmente, la dilución óptima para la utilización de los anticuerpos obtenidos en el antisuero n° 4 fue 1/250. Dichos anti GDH se utilizaron para la detección de la enzima en diferentes experimentos fisiológicos bajo diferentes condiciones.

2.8 Regulación fisiológica de la GDH de *Prochlorococcus* MIT9313

La regulación fisiológica de la GDH se estudió analizando la expresión relativa del gen *gdhA*, midiendo la actividad enzimática, y en algunos casos detectando la GDH mediante *Western blotting*. Estas técnicas fueron aplicadas bajo diferentes condiciones con el objetivo de investigar el papel de la enzima en el metabolismo del nitrógeno de *Prochlorococcus* MIT9313.

2.8.1 Efecto de la adición de inhibidores específicos

2.8.1.1 Efecto del MSX

La vía GS/GOGAT se ha reconocido como la principal ruta de asimilación de amonio en cianobacterias (Meeks *et al.*, 1978). Aunque el amonio también podría ser incorporado mediante la enzima GDH con la posible ventaja de que mediante esta ruta no se requiere gasto energético, la vía de la GDH tiene menor importancia especialmente debido a su menor afinidad por el amonio.

El MSX se ha descrito como un inhibidor específico de la glutamina sintetasa (GS) (Pace & Mc, 1952), inhibiendo la asimilación de amonio y provocando la acumulación de glutamato.

Nuestro objetivo era estudiar si la inhibición de la GS permitiría a la GDH ejercer de vía única para la incorporación de este elemento. Para ello, añadimos MSX a una concentración de 100 μM a un cultivo de *Prochlorococcus* MIT9313, a continuación se observó el efecto del inhibidor sobre el crecimiento del cultivo. El crecimiento se siguió a 674 nm, como se observa en la figura 43 el MSX provocó un descenso de la población celular hasta ocasionar la muerte del cultivo.

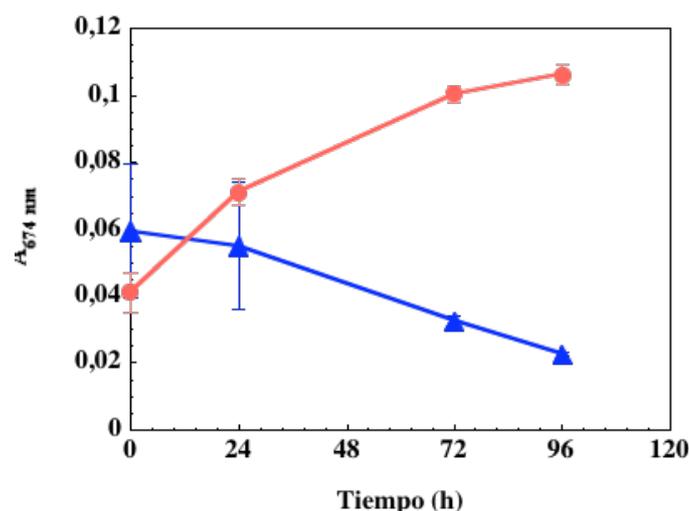


Figura 43. Efecto del MSX sobre el crecimiento de *Prochlorococcus* MIT9313

(●) Cultivo control sin MSX. (▲) Cultivo con MSX 100 μM

En contraste con lo observado en el alga verde *Stichococcus bacillaris* que tiene la capacidad de asimilar amonio y nitrato en presencia de MSX (Ahmad & Hellebust, 1985), *Prochlorococcus* MIT9313 no puede crecer en presencia del inhibidor. Sin embargo, esto no es un comportamiento atípico teniendo en cuenta que en otros organismos como bacterias y plantas el MSX ejerce el mismo efecto (Bechtold *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2003).

También se analizó el efecto del inhibidor sobre la expresión del gen *gdhA* y la actividad NADPH-GDH, añadiendo MSX 100 μ M y tomando alícuotas para medir independientemente tanto actividad como expresión, a tiempos 1, 6 y 24 horas.

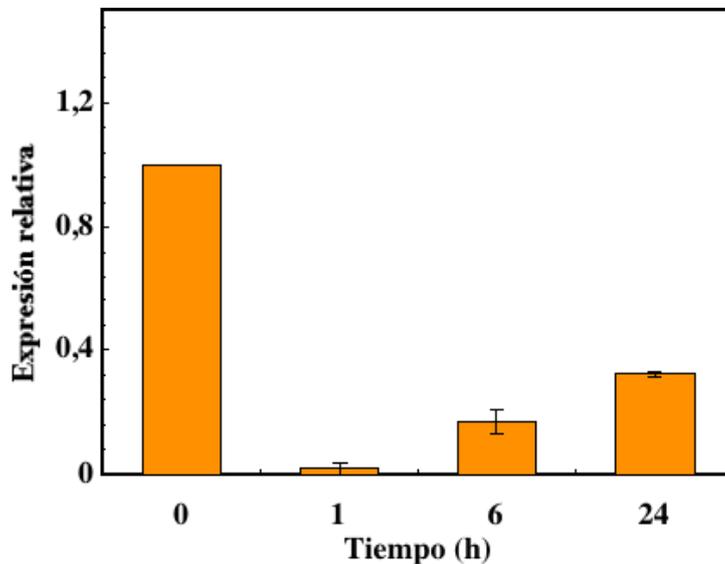


Figura 44. Expresión del gen *gdhA* en presencia de MSX 100 μ M

Poco se conoce acerca del efecto del MSX sobre la expresión del gen *gdhA* en cianobacterias; en nuestro caso la adición del inhibidor a los cultivos provocó una represión de la expresión del gen después de 1 hora de incubación. Tras 6 horas los niveles de expresión tienden a recuperarse extendiéndose hasta las 24 horas, aunque sin alcanzar la normalidad con respecto al control a tiempo 0 horas.

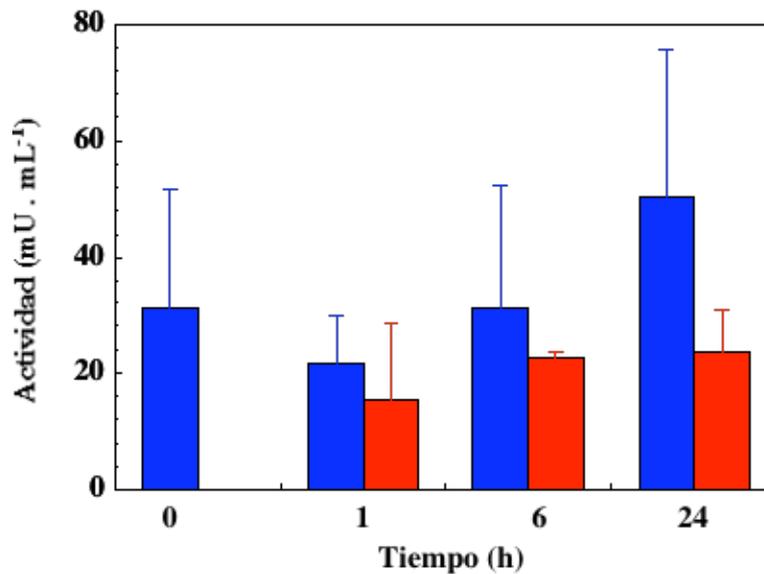


Figura 45. Efecto del MSX sobre la actividad NADPH-GDH. En azul el control sin MSX y en rojo el cultivo con MSX 100 μ M.

Por otra parte, el inhibidor produjo un descenso en la actividad con respecto a los controles a cada tiempo. Como se observa en la figura, en las muestras control los niveles de actividad tienden a aumentar en función del tiempo, mientras que en el cultivo de *Prochlorococcus* MIT9313 con MSX la actividad disminuye levemente pasada una hora y se mantiene constante durante el tiempo del experimento. Además la diferencia de actividad entre el control y el cultivo con MSX se va incrementando en cada uno de los tiempos. Estos resultados están relacionados con los obtenidos para la expresión del gen *gdhA* que se reprime en presencia del MSX (figura 44) inhibiendo la síntesis de GDH. Es posible que la actividad obtenida sea producto de un remanente de proteína almacenado en la célula, sin embargo la actividad no se incrementa y se observa una amplia diferencia con respecto a los controles.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la GDH de *Prochlorococcus* MIT9313 no puede funcionar como única vía de asimilación de amonio por lo que la vía

GS/GOGAT constituye la ruta principal de incorporación de dicho elemento en esta estirpe.

2.8.1.2 Efecto de la azaserina sobre la GDH

A continuación analizamos el efecto de la inhibición de GOGAT sobre la expresión génica, la actividad NADPH-GDH, y la concentración de proteína.

La azaserina es un inhibidor específico de la GOGAT (Pinkus, 1977), que inhibe el metabolismo del nitrógeno e incrementa los niveles intracelulares de 2-oxoglutarato. Después de añadir azaserina 100 μM a cultivos de *Prochlorococcus* MIT9313 se tomaron alícuotas a tiempos de 5 y 24 horas para medir expresión del gen *gdhA*, y actividad NADPH-GDH.

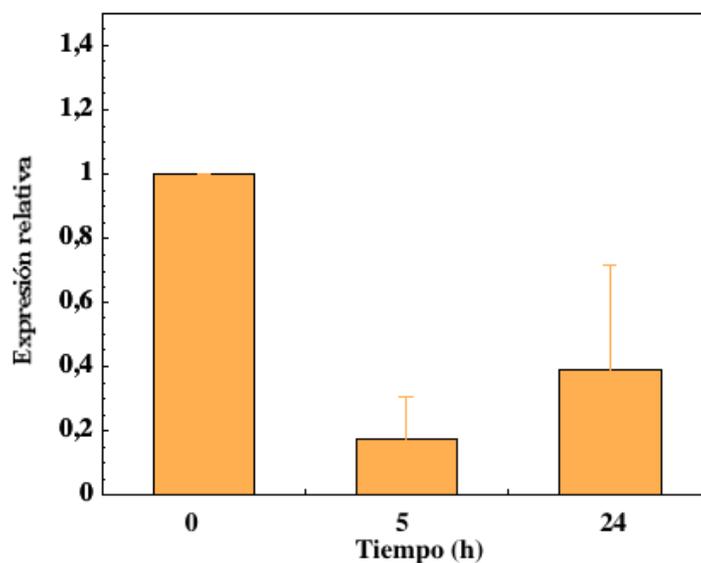


Figura 46. Efecto de la azaserina 100 μM sobre la expresión del gen *gdhA*

La presencia de azaserina en el cultivo ejerció un efecto de represión de la expresión del gen *gdhA* (figura 46), con una leve recuperación a las 24 horas. Sin embargo, este leve incremento no superó el 20 % sugiriendo que el incremento en

la concentración intracelular de 2-oxoglutarato puede ser una señal negativa para la expresión de dicho gen.

Estos resultados coincidieron con los datos obtenidos después de medir la actividad enzimática, observando una reducción de la misma en cerca del 90 % en extractos obtenidos a partir de cultivos a los que se les añadió azaserina.

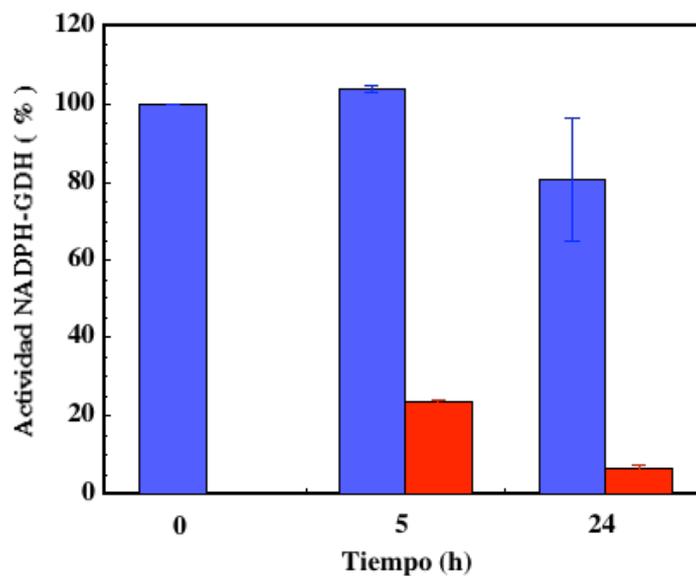


Figura 47. Efecto de la azaserina sobre la actividad NADPH-GDH. En azul actividad en cultivo control y en rojo actividad en cultivo con azaserina 100 µM

Adicionalmente se analizó el efecto de dicho inhibidor sobre la concentración de GDH en *Prochlorococcus* MIT9313. Siguiendo el procedimiento anterior se tomaron alícuotas a tiempos 1 y 24 h para detectar la GDH mediante *Western blotting*.

Como se observa en la siguiente figura, la síntesis de GDH se ve inhibida en presencia de azaserina, posiblemente por el incremento en la concentración intracelular de 2-oxoglutarato. Es así como tras 24 horas de incubación con el inhibidor, bajo nuestras condiciones de detección, no se observa presencia de GDH, comparado con los controles sin azaserina.

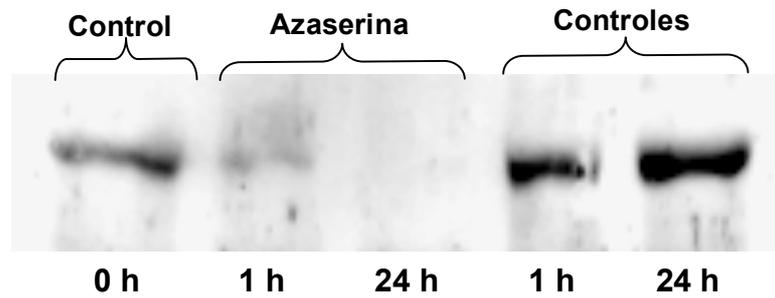


Figura 48. GDH en presencia de Azaserina. Western blotting realizado utilizando extractos crudos de *Prochlorococcus* MIT9313 obtenidos a partir de cultivos que contenían azaserina 100 μ M.

En cianobacterias el ciclo de Krebs se encuentra incompleto al carecer de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Stanier & Cohen-Bazire, 1977), enviando al 2-oxoglutarato hacia el ciclo GS/GOGAT. El 2-oxoglutarato constituye el punto de conexión entre los metabolismos del nitrógeno y el carbono, parece ser la molécula señal para regular la expresión de diferentes genes implicados en ambos metabolismos (Flores & Herrero, 2005).

Tras añadir azaserina a cultivos de *Prochlorococcus* con el subsiguiente incremento de los niveles intracelulares de 2-oxoglutarato, enzimas del metabolismo del nitrógeno y el carbono como la glutamina sintetasa (GS) (El Alaoui *et al.* , 2001) e isocitrato deshidrogenasa (IDH) (López-Lozano, A. *et al.*, 2005) incrementan tanto su expresión como la actividad enzimática.

Sin embargo los resultados obtenidos para la GDH no coinciden con el comportamiento típico de enzimas relacionadas con la asimilación de nitrógeno, sugiriendo que tanto la expresión del gen *gdhA*, como la actividad enzimática y por ende la concentración de proteína se ven afectados negativamente bajo condiciones en las que la relación C/N se incrementa.

Es posible que la concentración de 2-oxoglutarato constituya una señal reguladora de la GDH, que a razón del incremento en dicha concentración inhibe su síntesis, posiblemente debido a que la célula no requiera la catálisis de la enzima para la obtención del 2-oxoglutarato.

2.8.1.3 Efecto del estado energético de los cultivos

En nuestro trabajo se estudió también el efecto producido por la inhibición de la cadena de transporte de electrones fotosintética sobre la glutamato deshidrogenasa. Para ello utilizamos el DCMU que actúa sobre el fotosistema II (PSII) impidiendo el flujo de electrones desde PSII hasta el *pool* de plastoquinonas provocando que éstas últimas se mantengan en un estado energético oxidado (Trebst, 1980). También se utilizó el DBMIB el cual actúa sobre el citocromo *b₆f* impidiendo el flujo de electrones desde el *pool* de plastoquinonas hacia dicho citocromo, ocasionando que las plastoquinonas se mantengan en un estado energético reducido (Rich *et al.*, 1991).

Los experimentos consistieron en añadir DCMU a una concentración de 0,3 μ M a cultivos de MIT9313. En otro cultivo diferente de la misma estirpe se añadió DBMIB a una concentración 0,06 μ M. A continuación se tomaron alícuotas de los cultivos a tiempos 1 y 24 horas para medir expresión génica obteniendo los resultados que se muestran en la figura 49.

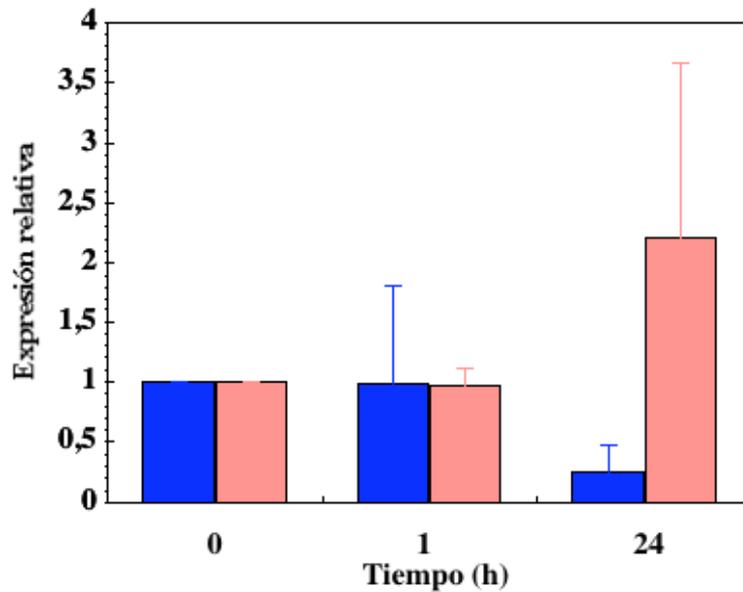


Figura 49. Efecto del DCMU (en azul) y el DBMIB (en rosa) sobre la expresión del gen *gdhA* de la estirpe MIT9313.

Como se puede observar el DCMU produjo un descenso de la expresión del gen *gdhA*, con un efecto mucho más marcado a las 24 horas de tratamiento. En contraste, la presencia del DBMIB no fue una señal para el descenso de la expresión génica, provocando incluso un incremento de la misma al tiempo final del ensayo.

También se tomaron alícuotas de la estirpe MIT9313 cultivada en presencia de los inhibidores para medir actividad enzimática (figura 50). El efecto del DCMU sobre ésta fue una reducción del 64 % en 1 hora y más del 90 % a las 24 horas, con respecto al control. En cuanto al DBMIB no tuvo un efecto significativo sobre la actividad GDH que se mantuvo en valores próximos a la normalidad durante todo el tiempo de tratamiento.

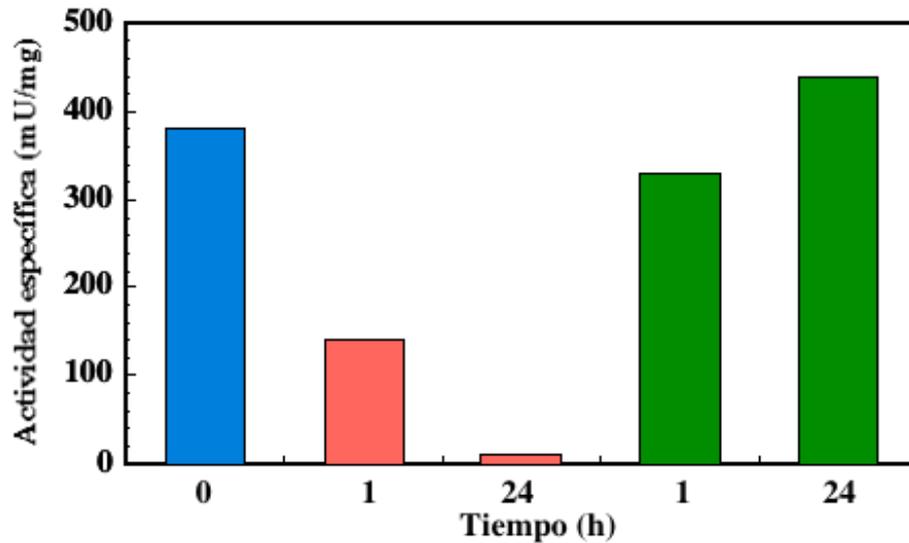


Figura 50. Efecto del DCMU y el DBMIB sobre la actividad NADPH-GDH. Actividad obtenida en extractos crudos; en azul control a 0 horas, en rojo efecto del DCMU, y en verde efecto del DBMIB.

Además del análisis de la actividad enzimática y la expresión génica en presencia de dichos inhibidores, también se detectó la concentración de GDH mediante *Western blotting*. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura.

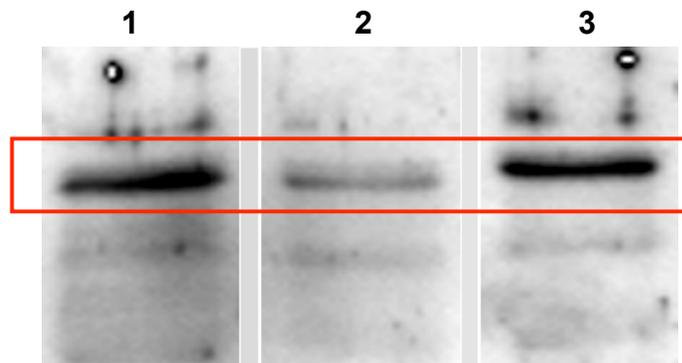


Figura 51. *Western blotting* utilizando muestras obtenidas en presencia de DCMU y DBMIB. El recuadro rojo resalta la banda correspondiente a la GDH de *Prochlorococcus MIT9313*. La calle 1 corresponde al control 24 horas; en las calles 3 y 4 se observan las muestras obtenidas a partir de cultivos en presencia de DCMU y DBMIB, respectivamente, tras 24 horas de incubación.

Según el análisis de imagen realizado mediante los programas *GeneSnap* y *Gene Tools* de *Syngene* la cuantificación de la intensidad de la bandas con respecto al control a las 24 horas (calle 1), obtenemos que la banda correspondiente a la GDH en presencia de DCMU (calle 2) presenta una intensidad del 70 %, un 30 % menos que el control. Por otra parte la banda que corresponde a la GDH en presencia de DBMIB (calle 3) presenta una intensidad del 170 %, es decir un 70 % más que el control.

Nuestros resultados indican que el estado oxidado del *pool* de plastoquinonas ocasionado por la presencia de DCMU implica una señal de descenso de la expresión del gen *gdhA* e inhibición de la síntesis de GDH, mientras que el estado reducido de dicho *pool* no parece tener un efecto significativo sobre la expresión génica, la actividad enzimática y la concentración de proteína.

Si tenemos en cuenta que el DCMU actúa antes del *pool* de plastoquinonas y el DBMIB después de dicho *pool*, nuestros resultados sugieren que el estado redox de las plastoquinonas podría tener un papel regulador de la glutamato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* MIT9313. Sin embargo, sería necesario realizar un estudio más profundo para determinar dicha función reguladora.

2.8.2 Efecto de la ausencia de nutrientes

Como ya se ha mencionado anteriormente, entre los nutrientes más importantes para el metabolismo de las cianobacterias se encuentran el fósforo, el hierro y el nitrógeno (Post, 2005). La presencia o limitación de dichos nutrientes en el medio son determinantes para el desarrollo de la especie. De esta manera se activan redes específicas del metabolismo que incluyen desde el control de transportadores de dichos nutrientes hasta el control de la expresión de genes implicados en su

asimilación (Karl, 2002; Mills *et al.*, 2004; Arrigo, 2005), todo ello con el objeto de garantizar el mantenimiento de la célula.

Las principales fuentes de nitrógeno son el nitrógeno gaseoso, nitrato, nitrito, amonio y algunas fuentes orgánicas como urea, cianato y aminoácidos. El amonio es la molécula preferida por las cianobacterias y su asimilación se lleva a cabo mediante la vía GS/GOGAT y está controlada por un complejo sistema de regulación (Flores & Herrero, 2005; Muro-Pastor *et al.*, 2005). En ausencia de amonio se activa la síntesis de la proteína NtcA, factor de regulación del metabolismo de este elemento, e induce la expresión de todos aquellos genes implicados en el transporte y asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno.

En cuanto a la ausencia de fósforo, otro de los elementos limitantes de la producción primaria del océano (Arrigo, 2005), la respuesta a la limitación de este elemento en *Synechocystis* PCC 6803, está controlada por un sistema de transducción de señales constituido por una quinasa sensor (SphS) y un regulador transcripcional (SphR). Este sistema activa el regulón Pho, constituido por una serie de genes implicados en el transporte y asimilación de fosfato (Suzuki *et al.*, 2004).

Por otra parte, el hierro es un elemento clave como constituyente de proteínas implicadas en fotosíntesis, respiración y fijación de nitrógeno (Falkowski *et al.*, 1998; Morel & Price, 2004). Como se mencionó en la introducción, el hierro es el cuarto elemento más abundante de la tierra; sin embargo su utilización biológica es limitada debido a que el ión ferroso se oxida a férrico formando hidróxidos insolubles a pH fisiológicos (Boyer *et al.*, 1987; Braun *et al.*, 1998). Por este motivo las células han desarrollado sistemas como los sideróforos o sistemas rédox localizados en la membrana plasmática que les permiten reducir el ión férrico a ferroso y así transportar el hierro al interior de la célula.

Con objeto de estudiar el efecto de la ausencia de nutrientes esenciales para el desarrollo de *Prochlorococcus* sobre la regulación de la glutamato deshidrogenasa, se transfirieron cultivos de la estirpe MIT9313 a medio PCR-S11 carente de hierro, fósforo y nitrógeno, independientemente (ver apartado 2.3.3 en materiales y métodos). A partir de cada condición (- Fe, - P, y - N) se tomaron alícuotas a 24 y 48 horas para medir el efecto de la ausencia de cada nutriente sobre la actividad enzimática. De forma similar se realizaron los experimentos para analizar el efecto de dichas condiciones sobre la expresión del gen *gdhA*, excepto que las diferentes muestras se tomaron a tiempos 48 y 120 horas.

En ensayos previos, mediante el método Nessler se cuantificó el amonio en cultivos en ausencia de nitrógeno observando que a 48 horas existe amonio residual en el medio. Esto nos llevó a prolongar los tiempos de incubación a 120 horas para medir la expresión del gen *gdhA*. Para homogenizar el experimento, se tomaron alícuotas a los mismos tiempos en las condiciones ausencia de hierro y fósforo.

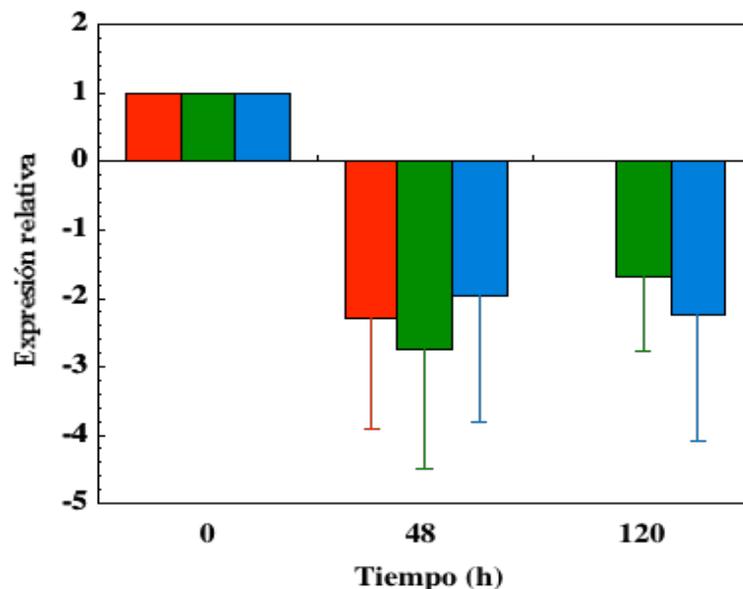


Figura 52. Expresión del gen *gdhA* en ausencia de nutrientes. Ausencia de hierro, ausencia de fósforo, ausencia de nitrógeno.

Los datos obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, muestran represión del gen *gdhA*, desde dos veces en ausencia de hierro y nitrógeno, y hasta casi 3 veces en ausencia de fosfato. Es de resaltar que la expresión no se pudo determinar en el cultivo en ausencia de hierro a las 120 horas, por el drástico descenso de la población en el transcurso del experimento. Esto último coincidió con experiencias previas en otras estirpes como PCC 9511 y SS120 (El Alaoui *et al.* , 2003; López-Lozano, A. *et al.* , 2005).

En cuanto a la actividad NADPH-GDH, en ausencia de hierro la actividad presenta un marcado descenso durante el tiempo del experimento con respecto del control. En contraste, en ausencia de fosfato y nitrógeno no hubo cambios muy significativos en los valores de actividad durante el tiempo de ensayo.

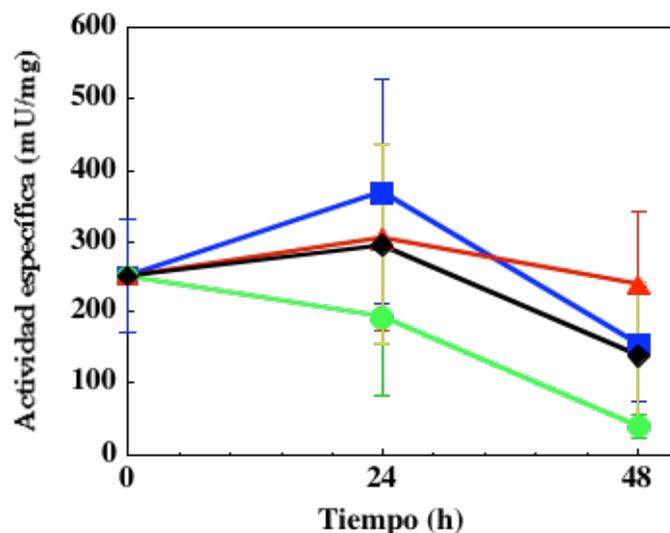


Figura 53. Efecto de la ausencia de nutrientes sobre la actividad NADPH-GDH. (■) control en PCRS11, (●) cultivo en PCRS11 sin hierro, (▲) cultivo en PCRS11 sin fosfato, (◆) cultivo en PCRS11 sin nitrógeno.

Considerando que el gen *gdhA* podría estar regulado por el factor de transcripción NtcA, se analizó la secuencia del promotor de dicho gen encontrando un posible sitio de unión a NtcA en la posición -54 con la secuencia GTA N₇ CAC.

Comparando con el sitio típico de unión a NtcA, GTA N₈ TAC (Luque *et al.*, 1994) observamos que en el promotor de *gdhA*, dicho sitio es muy similar a la secuencia canónica. El cambio en la secuencia no significa que el sitio no sea reconocible por NtcA, teniendo en cuenta que pueden cambiarse A/T por G/C (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002), sin embargo tampoco garantiza que el gen este regulado por dicho factor de transcripción. Sería interesante realizar experimentos de unión de la proteína NtcA al sitio de reconocimiento encontrado en el promotor de *gdhA*, para obtener información más detallada sobre el papel de NtcA como regulador de este gen.

2.8.3 Efecto de la edad del cultivo

El envejecimiento supone para las células una condición de estrés que representa un incremento en la densidad celular y una disminución de la disponibilidad de amonio en el medio, lo que conlleva una competencia intercelular por otras fuentes de nitrógeno disponibles. También supone que en el medio se encuentren formas de nitrógeno como los aminoácidos que han sido excretadas producto del metabolismo de otros organismos o del mismo *Prochlorococcus*. Esta situación implica la activación de sistemas de asimilación de nutrientes que hagan más eficiente el metabolismo celular y que permitan la utilización de otras fuentes de nitrógeno diferentes al amonio.

Para estudiar el efecto del envejecimiento sobre la expresión del gen *gdhA* y la actividad GDH se tomaron muestras de un cultivo de MIT9313 cada vez que la absorbancia a 674 nm se incrementó en 0,01 unidades, tomando como punto de inicio el momento el que el cultivo alcanzó una A₆₇₄ de 0,03.

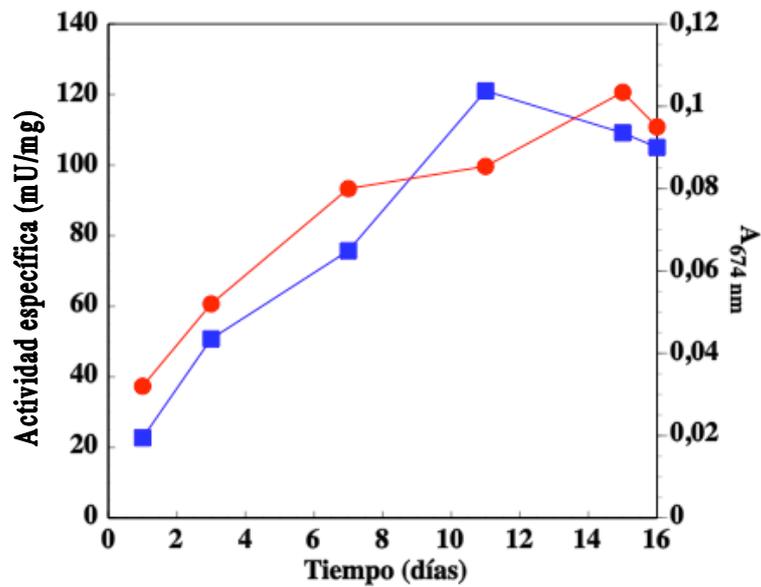


Figura 54. Actividad NADPH-GDH en función de la edad del cultivo. Crecimiento de *Prochlorococcus* MIT9313 a lo largo de los días (■), actividad específica paralelo al tiempo de cultivo (●).

Los datos de actividad específica obtenidos a lo largo del tiempo muestran un incremento de la misma paralelo a la curva de crecimiento de *Prochlorococcus* MIT9313, obteniéndose los valores máximos al finalizar la fase exponencial de crecimiento.

Los datos obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real indican que la expresión del gen *gdhA* aumenta en paralelo a la edad del cultivo (figura 55).

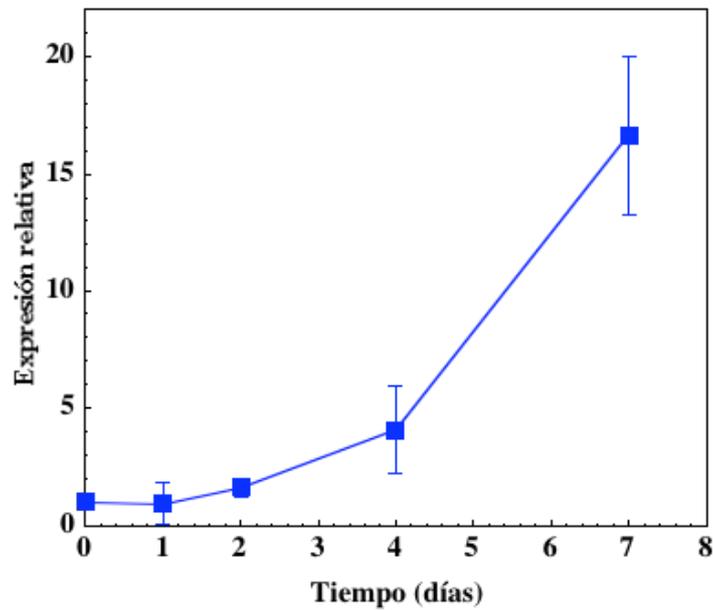


Figura 55. Expresión del gen *gdhA* en función de la edad del cultivo

Estos resultados coincidieron con la evolución de la cantidad de proteína al cuantificar la GDH, mediante *Western blotting*, en extractos de *Prochlorococcus* MIT9313 obtenidos a distintos tiempos de cultivo (figura 56).

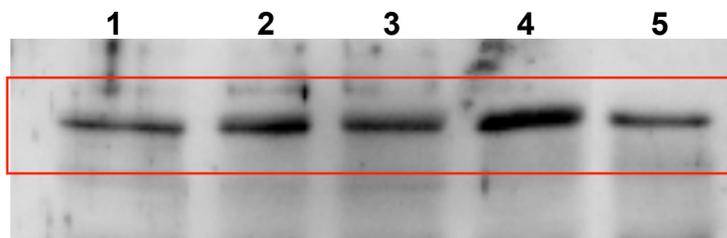


Figura 56. Western blotting de la evolución de GDH a lo largo del tiempo de cultivo.

1. T= 0 días; 2. T= 1 día; 3. T= 2 días; 4. T= 3 días; 5. T= 4 días.

Nuestros resultados indican que la síntesis de GDH se activa cuando se incrementa la edad del cultivo, posiblemente para reasimilar amonio o para utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno. De la misma manera sucede con la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803 en la cual la actividad NADP-GDH se incrementó cuando el cultivo entró en la fase estacionaria de crecimiento (Lucena-Soto, 2003).

Es decir, en conjunto los resultados sugieren que la GDH en condiciones en las que en el medio existen fuentes alternativas de nitrógeno como los aminoácidos, excretadas al mismo según avanza el tiempo de cultivo, producto del metabolismo de *Prochlorococcus* o de otro organismos, podría participar en la asimilación de dichos metabolitos indicando una posible función catabólica.

2.8.4 Utilización de glutamato como fuente de nitrógeno

Según experimentos realizados en diferentes áreas subtropicales de los océanos del mundo, se ha descrito que *Prochlorococcus* tienen la capacidad de utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno (Zubkov *et al.*, 2003; Zubkov *et al.*, 2004; Zubkov & Tarran, 2005; Mary *et al.*, 2008; Mary *et al.*, 2008).

Por otra parte, teniendo en cuenta el sentido desaminante de la reacción catalizada por la GDH, en la cual a partir de glutamato se forma amonio y 2-oxoglutarato, dicha enzima puede tener funciones catabólicas similares a las descritas en levaduras y hongos (Miller, S. M. & Magasanik, 1990).

En base a esto nos planteamos la hipótesis de que *Prochlorococcus* MIT9313 pudiese utilizar la GDH como vía de utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno. Para comprobarlo se transfirió un cultivo de MIT9313 desde medio PCR-S11 con amonio como fuente habitual de cultivo, a medio PCR-S11 al que se reemplazó el amonio por glutamato como fuente alternativa de nitrógeno. A continuación se tomaron alícuotas a tiempos 1 y 24 horas para determinar los niveles tanto de expresión génica como de actividad desaminante, teniendo en cuenta que es el sentido de la reacción en el que se degrada el glutamato para producir amonio.

En cuanto a la expresión génica, como se observa en la figura 57, a tiempo final de 24 horas se presenta un incremento de hasta 5 veces en la expresión del gen *gdhA* por lo que podríamos suponer que el gen *gdhA* se activa en presencia del aminoácido para sintetizar GDH y el glutamato para obtener amonio y 2-oxoglutarato.

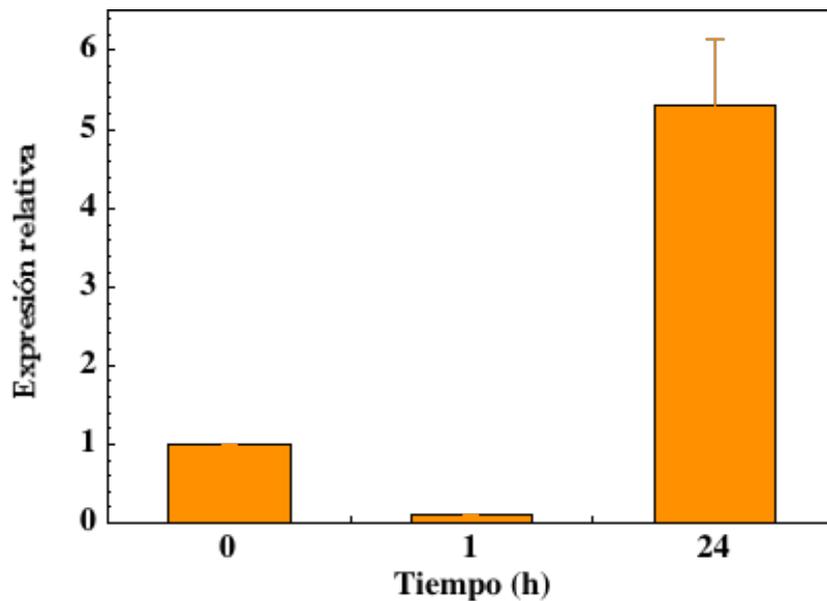


Figura 57. Expresión del gen *gdhA* en presencia de glutamato como fuente de nitrógeno

Los experimentos para determinar niveles de actividad a tiempos superiores a 1 hora se dificultaron debido a que el glutamato es una fuente perfecta de carbono para los posibles organismos heterótrofos contaminantes que se encuentran en convivencia con *Prochlorococcus*; es de recordar que la estirpe MIT9313 no es axénica. Por ello al cuantificar la proteína total en los extractos, mediante el método *Bradford*, para normalizar la actividad específica, se obtuvieron valores muy altos que no corresponden a la proteína total de *Prochlorococcus* sino a la sumatoria de ésta última con la producida por todos los organismos contaminantes. De esta

manera se obtuvo un solapamiento de la cantidad de proteína real obtenida de *Prochlorococcus*, afectando los valores finales de actividad enzimática. Esto mismo ocurrió en nuestros intentos por detectar la GDH mediante *Western blotting* en los que se observaron incrementos de la enzima a tiempo 1 hora. Sin embargo a tiempos superiores las muestras obtenidas fueron muy poco claras.

En general, podemos decir que es posible que la glutamato deshidrogenasa cumpla un papel catabólico en el metabolismo del nitrógeno en *Prochlorococcus* MIT9313 y participe en la utilización de glutamato u otros aminoácidos como fuente de nitrógeno. Sin embargo, son necesarios futuros experimentos para determinar el transporte de dichas moléculas al interior de la célula. Hay que resaltar que en el genoma del organismo se encuentran genes que codifican para posibles transportadores de aminoácidos, aunque se desconoce cuáles y de qué tipo.

3. VISIÓN GLOBAL

Reuniendo la información obtenida en este trabajo podemos hacer un balance positivo con respecto a los objetivos planteados al inicio del mismo.

Inicialmente el primer objetivo planteado fue el estudio de la asimilación de fuentes orgánicas de nitrógeno como el cianato. En este sentido los resultados obtenidos muestran que *Prochlorococcus* PCC 9511 posiblemente tenga la capacidad de sobrevivir en presencia de cianato, dado que sintetiza formas activas de cianasa, la enzima encargada de la asimilación de este elemento. La enzima se detectó aplicando las condiciones descritas para la cianobacteria marina *Synechococcus* (Miller, A. G. & Espie, 1994). No obstante la utilización de cianato como fuente de nitrógeno fue parcial dado que no se lograron mantener cultivos de *Prochlorococcus* única y exclusivamente en presencia de cianato.

Por otra parte se presentó de nuevo la dificultad del trabajo con esta estirpe, en primera instancia para la obtención y el mantenimiento de cultivos, y por otro lado para la amplificación de fragmentos de ADN utilizando como sustrato ADN genómico y células enteras. Esto es algo que siempre ha llamado nuestra atención especialmente por que no solo se han tenido problemas para amplificar el gen *cynS* sino también otros genes como *glnA*, *melB* o *icd* (datos obtenidos por otros miembros de nuestro grupo). En este sentido se han planteado diversas hipótesis que explicaran esta dificultad, sin embargo ninguna de ellas ha resultado convincente.

Además del estudio de la utilización de cianato, nos planteamos también la detección y caracterización de la GDH en la estirpe MIT9313, lo que se cumplió tras diferentes dificultades especialmente para la optimización de las mezclas de reacción y de las condiciones de medición. La caracterización señaló el origen enzimático de la misma y a diferencia de otras GDH no mostró preferencia por la utilización de cationes divalentes de calcio. Los valores de pH para la actividad aminante y desaminante resultaron semejantes a los descritos previamente para otros organismos, haciendo énfasis en la diferencia de pH entre un sentido de la reacción y el otro. En cuanto a los valores de K_m obtenidos en cada uno de los sustratos, pudimos observar que la GDH de *Prochlorococcus* MIT9313 tiene una menor afinidad por el amonio comparada con la GS (El Alaoui *et al.* , 2003), indicando que ésta última constituye la principal vía de asimilación de amonio en este organismo. Comparando los valores obtenidos para amonio, glutamato y 2-oxoglutarato se observa una mayor afinidad de la enzima por este último y que la diferencia entre la afinidad por el amonio y el glutamato es mínima.

En cuanto a la regulación *in vivo*, las condiciones estudiadas: inhibición de GS, inhibición de GOGAT, ausencia de nutrientes, efecto de la edad de cultivo, inhibición del transporte de electrones fotosintético con DCMU y DBMIB, y utilización de glutamato como fuente de nitrógeno, se analizaron mediante la expresión del gen *gdhA*, determinando la actividad enzimática y cuando los cultivos lo permitieron se incluyó un análisis de la cantidad de enzima mediante *Western blotting*.

Inicialmente, los datos obtenidos tras la inhibición de GS con MSX sugieren que la GDH por si sola no tiene la capacidad de mantener los requerimiento nutricionales en la célula, en cuanto al amonio se refiere, tal y como ocurre en otros organismos. La respuesta de la enzima tras la inhibición de GOGAT con azaserina fue una sorpresa dado que la expresión del gen *gdhA* se vio reprimida lo que condujo a una disminución de la actividad enzimática y a una menor cantidad de GDH, algo que contradecía la idea de que el incremento de los niveles de 2-oxoglutarato sería la señal de baja concentración de amonio, lo que llevaría a la activación de todos los genes implicados en su asimilación incluido *gdhA*.

De la misma manera ocurrió con la ausencia de nitrógeno, que provocó la represión del gen *gdhA*. Al analizar la secuencia promotora de *gdhA*, encontramos un posible sitio de unión a NtcA. Partiendo de esto, surge la necesidad de comprobar si dicha secuencia está o no bajo el control del factor de transcripción.

En cuanto al estado energético de los cultivos, se observó que la presencia de DCMU ejerce un efecto de represión del gen *gdhA* y disminución de la actividad NADPH-GDH, debido al estado oxidado del *pool* de plastoquinonas. En contraste, la presencia de DBMIB no tuvo un efecto significativo sobre la expresión de *gdhA*, ni sobre la actividad enzimática. Esto indica el posible papel regulador del estado

rédox de las plastoquinonas sobre la GDH, sin embargo, es un aspecto que requiere mayor profundización.

Por otra parte, como ya se ha mencionado, el envejecimiento de los cultivos supone un incremento en la densidad celular y una disminución en la concentración de amonio en el medio, lo que lleva a la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno como los aminoácidos, disponibles en el medio a consecuencia de la excreción de organismos heterótrofos o de *Prochlorococcus*. En esta situación, se ha demostrado en otros organismos como *Chlamydomonas reinhartii*, que la célula cataboliza 2-oxoglutarato para mantener el metabolismo del carbono (Moyano *et al.*, 1995). El envejecimiento también supone una limitación de energía por lo que la célula sintetiza enzimas que no requieren ATP para su funcionamiento. Teniendo en cuenta el incremento en la expresión del gen *gdhA*, el aumento de la actividad y el aumento en la concentración de proteína, en función de la edad del cultivo, es posible que en *Prochlorococcus* MIT9313 se active la síntesis de GDH para utilizar aminoácidos como fuente de nitrógeno y carbono, esto con un menor gasto energético.

El incremento en la expresión de *gdhA* en presencia de glutamato sugiere que la enzima también podría tener una función catabólica permitiendo la degradación de aminoácidos.

Finalmente en cuanto a la GDH se refiere, logramos amplificar y clonar el gen *gdhA*, además de sobreexpresar y purificar la enzima. Desafortunadamente no obtuvimos la enzima en su forma activa lo que impidió la caracterización de la GDH pura, no obstante, es otro de los retos que plantea este trabajo. Sin embargo, la proteína obtenida se utilizó con éxito en la obtención de anticuerpos frente a GDH, los cuales

se utilizaron para la detección de la enzima mediante *Western blotting* en los experimentos fisiológicos.

Teniendo en cuenta que tanto la cianasa como la glutamato deshidrogenasa fueron funcionales en las dos estirpes estudiadas, MIT9313 habitante de profundidad, que posee el genoma de mayor tamaño descrito hasta el momento para el género *Prochlorococcus*, y PCC 9511, de superficie y con el genoma más reducido, la primera ha conservado en su genoma una mayor cantidad de genes que le permiten proliferar y mantenerse bajo las condiciones en las que habita a 145 metros de profundidad, mientras que PCC 9511 ha eliminado aquellos genes que en superficie, donde las condiciones de proliferación son diferentes, no le son estrictamente imprescindibles.

Según esto podemos decir que *Prochlorococcus* conserva en su genoma genes que le serán útiles según las condiciones en las que habita, apoyando la teoría de que este organismo se ha adaptado al medio que coloniza para lograr su éxito ecológico (García-Fernández & Diez, 2004).

CONCLUSIONES

1. La estirpe de *Prochlorococcus* PCC 9511 aunque no es capaz de sobrevivir en cianato como única fuente de nitrógeno, sintetiza cianasa para la utilización de dicho elemento.
2. La glutamato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* MIT9313 muestra unas características cinéticas similares a las descritas para otras GDH de diferentes organismos.
3. La glutamato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* MIT9313 no puede actuar como única vía de asimilación de amonio.
4. La glutamato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* MIT9313 podría actuar como ruta de utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad, I. y J. A. Hellebust. 1985. Transport and Assimilation of Nitrogen by *Stichococcus bacillaris* Grown in the Presence of Methionine Sulfoximine. *Plant Physiology*. **79**: 1125-1126.

Aldehni, M. F., J. Sauer, C. Spielhaupter, R. Schmid y K. Forchhammer. 2003. Signal transduction protein P_{II} is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*. **185**: 2582-2591.

Anderson, P. M. 1980. Purification and properties of the inducible enzyme cyanase. *Biochemistry*. **19**: 2882-2888.

Anderson, P. M. y R. M. Little. 1986. Kinetics properties of cyanase. *Biochemistry*. **25**: 1621-1626.

Arrigo, K. R. 2005. Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature*. **437**: 349-55.

Baker, P. J., K. L. Britton, P. C. Engel, G. W. Farrants, K. S. Lilley, D. W. Rice y T. J. Stillman. 1992. Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase. *Proteins*. **12**: 75-86.

Baturin, G. N. 2003. Phosphorus cycle in the ocean. *Lithology and Mineral Resources*. **38**: 126-146.

Bazzaz, M. B., C. V. Bradley y R. G. Brereton. 1982. 4-Vinyl-4-Desethyl Chlorophyll-a - Characterization of a New Naturally-Occurring Chlorophyll Using Fast Atom Bombardment, Field Desorption and in Beam Electron-Impact Mass-Spectroscopy. *Tetrahedron Letters*. **23**: 1211-1214.

Bechtold, U., E. Pahlich y P. J. Lea. 1998. Methionine sulphoximine does not inhibit pea and wheat glutamate dehydrogenase. *Phytochemistry*. **49**: 347-354.

Benz, R. y H. Böhme. 1985. Pore formation by an outer membrane protein in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **812**: 286 - 292.

Bertilsson, S., O. Berglund, D. M. Karl y S. W. Chisholm. 2003. Elemental composition of marine *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: Implications for the ecological stoichiometry of the sea. *Limnology and Oceanography*. **48**: 1721-1731.

Bhattacharya, D. y L. Medlin. 1998. Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiology*. **116**: 9-15.

Blain, S., B. Queguiner, L. Armand, S. Belviso, B. Bombléd, L. Bopp, A. Bowie, C. Brunet, C. Brussaard, F. Carlotti, U. Christaki, A. Corbiere, I. Durand, F. Ebersbach, J. L. Fuda, N. Garcia, L. Gerringa, B. Griffiths, C. Guigue, C. Guillermin, S. Jacquet, C. Jeandel, P. Laan, D. Lefevre, C. Lo Monaco, A. Malits, J. Mosseri, I. Obernosterer, Y. H. Park, M. Picheral, P. Pondaven, T. Remenyi, V. Sandroni, G. Sarthou, N. Savoye, L. Scouarnec, M. Souhaut, D. Thuiller, K. Timmermans, T. Trull, J. Uitz, P. van Beek, M. Veldhuis, D. Vincent, E. Viollier, L. Vong y T. Wagener. 2007. Effect of natural iron fertilization on carbon sequestration in the Southern Ocean. *Nature*. **446**: 1070-4.

Blanchot, J. y M. Rodier. 1996. Picophytoplankton abundance and biomass in the Western Tropical Pacific Ocean during the 1992 El-Nino Year - results from flow cytometry. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research*. **43**: 877-895.

Blumenthal, K. M. y E. L. Smith. 1975. Functional arginine residues involved in coenzyme binding by glutamate dehydrogenases. *Journal Biological Chemistry*. **250**: 6555-6559.

Booth, B. C. 1988. Size classes and major taxonomic groups of phytoplankton at two locations in the subarctic ocean in May and August. *Marine Biology*. **97**: 275-286.

Boyer, G. L., A. H. Gillam y C. Trick. 1987. Iron chelation and uptake. *The Cyanobacteria*. P. Fay y C. Van Baalen, Elsevier Biomedical: 415-436.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-54.

Braun, V., K. Hantke y W. Koster. 1998. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Metal Ions in Biological Systems*. **35**: 67-145.

Bruland, K. W. 1980. Oceanographic distributions of cadmium, zinc, nickel, and copper in the North Pacific. *Earth and Planetary Science Letters*. **47**: 176 - 198.

Calhoun, M. W., K. L. Oden, R. B. Gennis, M. J. De Mattos y O. M. Neijssel. 1993. Energetics efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *Journal of Bacteriology*. **175**: 3020-3025.

Campbell, L., M. R. Landry, J. Constantinou, H. A. Nolla, S. L. Brown, H. Liu y D. A. Caron. 1998. Response of microbial community structure to environmental forcing in the Arabian Sea. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. **45**: 2301-2325.

Campbell, L., H. B. Liu, H. A. Nolla y D. Vaultot. 1997. Annual variability of phytoplankton and bacteria in the Subtropical North Pacific Ocean at Station-Aloha during the 1991-1994 ENSO event. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research*. **44**: 167.

Capone, D. G. 2000. The marine microbial nitrogen cycle. *Microbial ecology of the oceans*. D. L. Kirchman. New York, Wiley-Liss, Inc.: 455-493.

Capone, D. G., J. P. Zehr, H. W. Paerl, B. Bergman y E. J. Carpenter. 1997. *Trichodesmium*: a globally significant marine cyanobacterium. *Science*. **276**: 1221-1229.

Carrigan, J. B., S. Coughlan y P. C. Engel. 2005. Properties of the thermostable glutamate dehydrogenase of the mesophilic anaerobe *Peptostreptococcus asaccharolyticus* purified by a novel method after over-expression in an *Escherichia coli* host. *FEMS Microbiology Letters*. **244**: 53-9.

Castenholz, R. W. 1978. The Biogeography of hot spring algae through enrichment cultures. *Mitteilung Internationale Vereinigung für Limnologie*. **21**: 296-315.

Chapman, J., J. Braven, M. I. Liddicoat y E. I. Butler. 1988. Optimisation of the reaction conditions for the direct determination of the dissolved combined amino acid level in sea water. *The Science of the Total Environment*. **71**: 215 - 224.

Chávez, S. y P. Candau. 1991. An NAD-specific glutamate dehydrogenase from cyanobacteria. Identification and properties. *FEBS Letters*. **285**: 35-38.

Chávez, S., J. M. Lucena, J. C. Reyes, F. J. Florencio y P. Candau. 1999. The Presence of glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC-6803 under nonexponential growth conditions. *Journal of Bacteriology*. **181**: 808-813.

Chávez, S., J. C. Reyes, F. Chauvat, F. J. Florencio y P. Candau. 1995. The NADP-glutamate dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 cloning, transcriptional analysis and disruption of the *gdhA* gene. *Plant Molecular Biology*. **28**: 173-188.

Chisholm, S. W., R. J. Olson, E. R. Zettler, R. Goericke, J. B. Waterbury y N. A. Welschmeyer. 1988. A novel free living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*. **334**: 340-343.

Choudhury, R. y N. S. Punekar. 2007. Competitive inhibition of glutamate dehydrogenase reaction. *FEBS Letters*. **581**: 2733-2736.

Coleman, M. L. y S. W. Chisholm. 2007. Code and context: *Prochlorococcus* as a model for cross-scale biology. *Trends in Microbiology*. **15**: 398-407.

Coleman, M. L., M. B. Sullivan, A. C. Martiny, C. Steglich, K. Barry, E. F. Delong y S. W. Chisholm. 2006. Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science*. **311**: 1768-70.

Coulton, J. W. y M. Kapoor. 1973. Studies on the kinetics and regulation of glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. *Canadian Journal of Microbiology*. **19**: 439-50.

Cullimore, J. V. y A. P. Sims. 1981. Glutamine-Synthetase of *Chlamydomonas* - Its Role in the Control of Nitrate Assimilation. *Planta*. **153**: 18-24.

DeLuna, A., A. Avendaño, L. Riego y A. González. 2001. NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *Journal of Biological Chemistry*. **276**: 43775-43783.

Dufresne, A., L. Garczarek y F. Partensky. 2005. Accelerated evolution associated to genome reduction in a free-living prokaryote. *Genome Biology*. **6**: R14.

Dufresne, A., M. Salanoubat, F. Partensky, F. Artiguenave, I. M. Axmann, V. Barbe, S. Duprat, M. Y. Galperin, E. V. Koonin, F. Le Gall, K. S. Makarova, M. Ostrowski, S. Oztas, C. Robert, I. B. Rogozin, D. J. Scanlan, N. Tandeau de Marsac, J. Weissenbach, P. Wincker, Y. I. Wolf y W. R. Hess. 2003. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**: 10020-10025.

El Alaoui, S., J. Diez, L. Humanes, F. Toribio, F. Partensky y J. M. García-Fernández. 2001. *In vivo* regulation of glutamine synthetase activity in the marine chlorophyll *b*-containing cyanobacterium *Prochlorococcus* sp. strain PCC 9511 (Oxyphotobacteria). *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 2202-2207.

El Alaoui, S., J. Díez, A. López-Ruiz, G. Gómez-Baena, F. Partensky y J. M. García-Fernández. 1999. Asimilación de nitrógeno en el procariota fotosintético marino *Prochlorococcus*. *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: Bioquímica, Fisiología y Biología Molecular*. F. Cánovas y F. J. Florencio, Servicio de Publicaciones. Universidad de Málaga.

El Alaoui, S., J. Díez, F. Toribio, G. Gómez-Baena, A. Dufresne y J. M. García-Fernández. 2003. Glutamine synthetase from the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* spp.: characterization, phylogeny and response to nutrient limitation. *Environmental Microbiology*. **5**: 412-423.

Espinosa, J., K. Forchhammer, S. Burillo y A. Contreras. 2006. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Molecular Microbiology*. **61**: 457-469.

Espinosa, J., K. Forchhammer y A. Contreras. 2007. Role of the *Synechococcus* PCC 7942 nitrogen regulator protein PipX in NtcA-controlled processes. *Microbiology-Sgm*. **153**: 711-718.

Falkowski, P. G., R. T. Barber y V. Smetacek. 1998. Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*. **281**: 200-206.

Florencio, F. J., S. Marques y P. Candau. 1987. Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Letters*. **223**: 37-41.

Flores, E. y A. Herrero. 1994. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. The molecular biology of cyanobacteria. D. A. Bryant. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 1: 487-517.

Flores, E. y A. Herrero. 2005. Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. Biochemical Society Transactions. **33**: 164-167.

Forchhammer, K. 2004. Global carbon/nitrogen control by P_{II} signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. FEMS Microbiology Reviews. **28**: 319-333.

Forchhammer, K. y N. Tandeau de Marsac. 1995. Functional analysis of the phosphoprotein P_{II} (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. Journal of Bacteriology. **177**: 2033-2040.

Forchhammer, K. y N. Tandeau de Marsac. 1995. Phosphorylation of the P_{II} protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity. Journal of Bacteriology. **177**: 5812-5817.

García-Domínguez, M. y F. J. Florencio. 1997. Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding P_{II} protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Molecular Biology. **35**: 723-734.

García-Fernández, J. M. y J. Diez. 2004. Adaptive mechanisms of the nitrogen and carbon assimilatory pathways in the marine cyanobacteria *Prochlorococcus*. Research in Microbiology. **155**: 795-802.

García-Fernández, J. M., N. Tandeau de Marsac y J. Diez. 2004. Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**: 630-638.

García-Pichel, F. 1998. Solar ultraviolet and the evolutionary history of cyanobacteria. *Origins of Life and Evolution of the biosphere*. **28**: 321-347.

Garczarek, L., W. Hess, J. Holtzendorff, G. van der Staay y F. Partensky. 2000. Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a marine prokaryote. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **97**: 4098-4101.

Garczarek, L., F. Partensky, H. Irlbacher, J. Holtzendorff, M. Babin, I. Mary, J. C. Thomas y W. R. Hess. 2001. Differential expression of antenna and core genes in *Prochlorococcus* PCC 9511 (Oxyphotobacteria) grown under a modulated light-dark cycle. *Environmental Microbiology*. **3**: 168-75.

Givan, C. V. 1979. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry*. **18**: 375-382.

Goericke, R. y D. J. Repeta. 1992. The pigments of *Prochlorococcus marinus* - The presence of divinyl chlorophyll-A and chlorophyll-B in a marine prokaryote. *Limnology Oceanography*. **37**: 425-433.

Goericke, R. y N. A. Welschmeyer. 1993. The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Research I*. **40**: 2283-2294.

Gomez-Baena, G., J. Manuel Garcia-Fernandez, A. Lopez-Lozano, F. Toribio y J. Diez. 2006. Glutamine synthetase degradation is controlled by oxidative proteolysis in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1760**: 930-40.

Guilloto.M y Hargreav.Ab. 1972. Hydrolysis of Cyanate by Bacterium of Genus *Flavobacterium*. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences Serie D*. 1827-&.

Guilloton, M. B., A. F. Lamblin, E. I. Kozliak, M. Gerami-Nejad, C. Tu, D. Silverman, P. M. Anderson y J. A. Fuchs. 1993. A physiological role for cyanate-induced carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **175**: 1443-1451.

Hagel, P., J. J. T. Gerding, W. Fieggen y H. Bloemendal. 1971. Cyanate formation in solution of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochimica et Biophysica Acta*. **243**: 366-373.

Harano, Y., I. Suzuki, S. I. Maeda, T. Kaneko, S. Tabata y T. Omata. 1997. Identification and nitrogen regulation of the cyanase gene from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*. **179**: 5744-5750.

Helling, R. B. 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate?. *Journal of Bacteriology*. **176**: 4664-4668.

Herrero, A., A. M. Muro-Pastor y E. Flores. 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*. **183**: 411-25.

Hess, W. R. y F. Partensky. 1999. Identification of a putative gamma linker polypeptide gene in the marine oxyphotobacterium *Prochlorococcus marinus*. Implications for the phylogeny of *Prochlorococcus* phycoerythrins. *The Phototrophic Prokaryotes*. P. e. al. New York, Plenum Publishers: 751-761.

Hess, W. R., F. Partensky, G. W. M. Van der Staay, J. M. García-Fernández, T. Börner y D. Vaultot. 1996. Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll *a/b* antenna in a marine prokaryote. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **93**: 11126-11130.

Hoffman, L. 1999. Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. *European Journal of Phycology*. **34**: 371-379.

Hornby, D. P. y P. C. Engel. 1984. A Kinetic-Study of the Oxidative Deamination of L-Glutamate by *Peptostreptococcus-Asaccharolyticus* Glutamate-Dehydrogenase Using a Variety of Coenzymes. *European Journal of Biochemistry*. **143**: 557-560.

Howarth, R. W. 1988. Nutrient Limitation of Net Primary Production in Marine Ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **19**: 89-110.

Hudson, R. C. y R. M. Daniel. 1993. L-Glutamate dehydrogenases: Distribution, Properties and Mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **106B**: 767 - 792.

Hudson, R. C., L. D. Ruttersmith y R. M. Daniel. 1993. Glutamate-Dehydrogenase from the Extremely Thermophilic Archaeobacterial Isolate An1. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1202**: 244-250.

Inokuchi, R., T. Itagaki, J. T. Wiskich, K. Nakayama y M. Okada. 1997. An NADP-glutamate dehydrogenase from the green alga *Bryopsis maxima*. Purification and properties. *Plant and Cell Physiology*. **38**: 327-335.

Itagaki, T., I. B. Dry y J. T. Wiskich. 1990. Effects of Calcium on NAD(H)-Glutamate Dehydrogenase from Turnip (*Brassica-Rapa L*) Mitochondria. *Plant and Cell Physiology*. **31**: 993-997.

Itturiaga, R. y B. G. Mitchell. 1986. Chroococoid cyanobacteria: a significant component in the food web dynamics of the open ocean. *Marine Ecology Progress Series*. **28**: 291-297.

Johnson, W. V. y P. M. Anderson. 1987. Bicarbonate is a recycling substrate for cyanase. *Journal of Biological Chemistry*. **262**: 9021-9025.

Kanamori, K. y B. D. Ross. 1995. Steady-State in-Vivo Glutamate-Dehydrogenase Activity in Rat-Brain Measured by N-15 Nmr. *Journal of Biological Chemistry*. **270**: 24805-24809.

Karl, D. M. 2002. Nutrient dynamics in the deep blue sea. *Trends in Microbiology*. **10**: 410-8.

Kettler, G. C., A. C. Martiny, K. Huang, J. Zucker, M. L. Coleman, S. Rodrigue, F. Chen, A. Lapidus, S. Ferriera, J. Johnson, C. Steglich, G. M. Church, P. Richardson y S. W. Chisholm. 2007. Patterns and implications of gene gain and loss in the evolution of *Prochlorococcus*. *PLoS Genetics*. **3**: e231.

Kim, Y.-J., M. Yoshizawa, s. Takenaka, S. Murakami y K. Aoki. 2002. Ammonia assimilation in *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously: purification and characterization of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **93**: 584-588.

Kindt, R., E. Pahlich y L. Rasched. 1980. Glutamate deshydrogenase from peas: isolation, quaternary structure and influence of cations on activity. *European Journal of Biochemistry*. **112**: 533 - 540.

Klausmeier, C. A., E. Litchman, T. Daufresne y S. A. Levin. 2004. Optimal nitrogen-to-phosphorus stoichiometry of phytoplankton. *Nature*. **429**: 171-174.

Knoll, A. H. 2008. Cyanobacteria and Earth History. *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics, and Evolution*. A. Herrero y E. Flores. Norfolk, UK, Caister Academic Press.

Kraus, L. M. y A. P. Kraus. 1998. The search for the uremic toxin: the case for the carbamoylation of aminoacids and proteins. *Wiener Klinische Wochenschrift*. **110**: 521-530.

Kunz, D. A. y O. Nagappan. 1989. Cyanase-Mediated Utilization of Cyanate in *Pseudomonas-Fluorescens* Ncib-11764. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 256-258.

Landing, W. M. y K. W. Bruland. 1987. The contrasting biogeochemistry of iron and manganese in the Pacific Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. **51**: 29-43.

LEA, P. J. y B. J. Mifflin. 1974. Alternative Route for Nitrogen Assimilation in Higher-Plants. *Nature*. **251**: 614-616.

Lee, H. M., M. F. Vázquez-Bermúdez y N. Tandeau de Marsac. 1999. The global nitrogen regulator NtcA regulates transcription of the signal transducer P_{II} (GlnB) and influences its phosphorylation level in response to nitrogen and carbon supplies in the cyanobacterium *Synechococcus* sp strain PCC 7942. *Journal of Bacteriology*. **181**: 2697-2702.

Lindell, D., D. Erdner, D. Marie, O. Prasil, M. Koblizek, F. Le Gall, R. Rippka, F. Partensky, D. J. Scanlan y A. F. Post. 2002. Nitrogen stress response of *Prochlorococcus* strain PCC 9511 (Oxyphotobacteria) involves contrasting regulation of *ntcA* and *amt1*. *Journal of Phycology*. **38**: 1113-1124.

Lindell, D. y A. F. Post. 1995. Ultraphytoplankton succession is triggered by deep winter mixing in the gulf of Aqaba (Eilat), Red-Sea. *Limnology and Oceanography*. **40**: 1130-1141.

Livak, K. J. y T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. **25**: 402-8.

López-Lozano, A., J. Diez, S. El Alaoui, C. Moreno-Vivián y J. M. García-Fernández. 2002. Nitrate is reduced by heterotrophic bacteria but not transferred to *Prochlorococcus* in non axenic cultures. *FEMS Microbiology Ecology*. **41**: 151-160.

López-Lozano, A., J. Diez y J. M. García-Fernández. 2005. Estudio de la isocitrato deshidrogenasa en las estirpes PCC 9511 y SS120 de *Prochlorococcus*. Avances en el metabolismo del nitrógeno. Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: de los Microorganismos a las Plantas. J. M. Vega, A. J. Márquez, A. J. Vígara, C. Vílchez y I. Garbayo, Academia de Ciencias, Artes y Letras de Huelva y Centro Asociado de la UNED en Huelva.

López-Lozano, F. A. 2007. Caracterización y regulación fisiológica de la isocitrato deshidrogenasa de *Prochlorococcus* sp. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Córdoba. Universidad de Córdoba. Tesis Doctoral. 154.

Loulakakis, K. A., K. A. Roubelakis-Angelakis y A. K. Kanellis. 1994. Regulation of Glutamate Dehydrogenase and Glutamine Synthetase in Avocado Fruit during Development and Ripening. *Plant Physiology*. **106**: 217-222.

Lucena-Soto, J. M. 2003. La descarboxilación del glutamato en *Synechocystis* sp. PCC 6803: enzimas implicadas y función fisiológica. Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. Sevilla. Universidad de Sevilla. 138.

Luque, I., E. Flores y A. Herrero. 1994. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO Journal*. **13**: 2862-2869.

Luque, I., E. Flores y A. Herrero. 1994. Nitrate and nitrite transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 are mediated by the same permease. *Biochimica et Biophysica Acta*. **118**: 296-298.

Luque, I., M. F. Vazquez-Bermudez, J. Paz-Yepes, E. Flores y A. Herrero. 2004. In vivo activity of the nitrogen control transcription factor NtcA is subjected to metabolic regulation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. FEMS Microbiology Letters. **236**: 47-52.

Luque-Almagro, V. M., R. Blasco, J. M. Fernandez-Romero y M. D. L. de Castro. 2003. Flow-injection spectrophotometric determination of cyanate in bioremediation processes by use of immobilised inducible cyanase. Analytical and Bioanalytical Chemistry. **377**: 1071-1078.

Lytle, C. R. y E. M. Perdue. 1981. Free, proteinaceous, and humic-bound amino acids in river water containing high concentrations of aquatic humus. Environmental Sciences and Technology. **15**: 224 - 228.

Martinez-Bilbao, M., A. Martinez, I. Urkijo, M. J. Llama y J. L. Serra. 1988. Induction, Isolation, and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum*. Journal of Bacteriology. **170**: 4897 - 4902.

Mary, I., L. Garczarek, G. A. Tarran, C. Kolowrat, M. J. Terry, D. J. Scanlan, P. H. Burkill y M. V. Zubkov. 2008. Diel rhythmicity in amino acid uptake by *Prochlorococcus*. Environmental Microbiology.

Mary, I., G. A. Tarran, P. E. Warwick, M. J. Terry, D. J. Scanlan, P. H. Burkill y M. V. Zubkov. 2008. Light enhanced amino acid uptake by dominant bacterioplankton groups in surface waters of the Atlantic Ocean. FEMS Microbiology and Ecology. **63**: 36-45.

- Mary, I. y D. Vulot.** 2003. Two-component systems in *Prochlorococcus* MED4: Genomic analysis and differential expression under stress. FEMS Microbiology Letters. **226**: 135-144.
- McCarthy, M., T. Pratum, J. Hedges y R. Benner.** 1997. Major bacterial contribution to marine organic nitrogen. Science. **281**: 231-234.
- Meeks, J. C., C. P. Wolk, W. Lockau, N. Schilling, P. W. Shaffer y W.-S. Chien.** 1978. Pathways of assimilation of [^{13}N]N₂ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocyst. Journal of Bacteriology. **134**: 125-130.
- Meeks, J. C., C. P. Wolk, J. Thomas, W. Lockau, P. W. Shaffer, S. M. Austin, W. S. Chien y A. Galonsky.** 1977. The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. Journal of Biological Chemistry. **252**: 7894-900.
- Mifflin, B. J. y P. J. Lea.** 1976. The path of ammonia assimilation in the plant kingdom. Trends in Biochemical Sciences. **1**.
- Miller, A. G. y G. S. Espie.** 1994. Photosynthetic Metabolism of Cyanate by the Cyanobacterium *Synechococcus* UTEX-625. Archives of Microbiology. **162**: 151-157.
- Miller, S. M. y B. Magasanik.** 1990. Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. **172**: 4927 - 4935.
- Mills, M. M., C. Ridame, M. Davey, J. La Roche y R. J. Geider.** 2004. Iron and phosphorus co-limit nitrogen fixation in the eastern tropical North Atlantic. Nature. **429**: 292-4.

Montoya, J. P., C. M. Holl, J. P. Zehr, A. Hansen, T. A. Villareal y D. G. Capone.

2004. High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature*. **430**: 1027-1031.

Moore, L. R., A. Coe, E. R. Zinser, M. A. Saito, M. B. Sullivan, D. Lindell, K.

Moniz-Frois, J. Waterbury y S. W. Chisholm. 2007. Culturing the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Limnology and Oceanography: Methods*. **5**: 353 - 362.

Moore, L. R., R. Goericke y S. W. Chisholm. 1995. Comparative physiology of

Synechococcus and *Prochlorococcus* - Influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Marine Ecology Progress Series*. **116**: 259-275.

Moore, L. R., G. Rocap y S. W. Chisholm. 1998. Physiology and molecular

phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*. **393**: 464-467.

Morel, F. M. M. y N. M. Price. 2004. The biogeochemical cycles of trace metals in

the oceans. *Science*. **300**: 944-947.

Morrison, G. R. 1971. Microchemical determination of organic nitrogen with Nessler

reagent. *Analytical Biochemistry*. **43**: 527-32.

Moyano, E., J. Cardenas y J. Munozblanco. 1992. Purification and Properties of 3

NAD(P)⁺ Isozymes of L-Glutamate Dehydrogenase of *Chlamydomonas reinhardtii*.

Biochimica et Biophysica Acta. **1119**: 63-68.

- Moyano, E., J. Cárdenas y J. Muñoz-Blanco.** 1995. Involment of NAD(P)-glutamate dehydrogenase isoenzymes in carbon and nitrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiologia Plantarum*. **94**: 553 - 559.
- Muro-Pastor, M. I. y F. J. Florencio.** 2003. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*. **41**: 595-603.
- Muro-Pastor, M. I., J. C. Reyes y F. J. Florencio.** 2005. Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*. **83**: 135-150.
- Neilson, A. H. y Doudorof.M.** 1973. Ammonia Assimilation in Blue-Green-Algae. *Archiv Fur Mikrobiologie*. **89**: 15-22.
- Olson, R. J., E. R. Zettler, M. A. Altabet, J. A. Dusenberry y S. W. Chisholm.** 1990. Spatial and temporal distributions of prochlorophyte picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Research I*. **37**: 1033-1051.
- Otwinowski, Z., P. M. Anderson, J. A. Fuchs, P. B. Sigler y A. Joachimiak.** 1991. *E.coli* cyanase is a decamer with 5/2 symetry. Proceedings of the IV International Meeting on Crystalization of Biological Macromolecules, Freiburg, Germany.
- Pace, J. y D. E. Mc.** 1952. Methionine sulphoximine and some enzyme systems in volving glutamine. *Nature*. **169**: 415-6.
- Paerl, H. W.** 2000. Marine plankton. The ecology of cyanobacteria. B. A. Whitton y M. Potts. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 121-148.
- Palinska, K. A., T. Jahns, R. Rippka y N. Tandeau de Marsac.** 2000. *Prochlorococcus marinus* strain PCC 9511, a picoplanktonic cyanobacterium, synthesizes the smallest urease. *Microbiology*. **146**: 3099-3107.

- Palinska, K. A., W. Laloui, S. Bedu, S. Loiseaux-De Goer, A. M. Castets, R. Rippka y N. Tandeau De Marsac.** 2002. The signal transducer P_{II} and bicarbonate acquisition in *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, a marine cyanobacterium naturally deficient in nitrate and nitrite assimilation. *Microbiology*. **148**: 2405-2412.
- Pamula, F. y J. F. Wheldrake.** 1991. Purification and Properties of the NADP-Dependent Glutamate-Dehydrogenase from *Dictyostelium discoideum*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **105**: 85-92.
- Papen, H., G. Neuer, M. Refaian y H. Bothe.** 1983. The isocitrate dehydrogenase from cyanobacteria. *Archives of Microbiology*. **134**: 73-79.
- Partensky, F., J. Blanchot, F. Lantoine, J. Neveux y D. Marie.** 1996. Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical Northeastern Atlantic ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research*. **43**: 1191-1213.
- Partensky, F., J. Blanchot y D. Vaultot.** 1999. Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review. *Marine cyanobacteria*. L. Charpy y A. W. D. Larkum. Monaco, Bulletin de l'Institut Océanographique, Numéro spécial. **19**: 457-476.
- Partensky, F., W. R. Hess y D. Vaultot.** 1999. *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **63**: 106-127.
- Partensky, F., N. Hoepffner, W. K. W. Li, O. Ulloa y D. Vaultot.** 1993. Photoacclimation of *Prochlorococcus* sp (Prochlorophyta) strains isolated from the North Atlantic and the Mediterranean sea. *Plant Physiology*. **101**: 285-296.

Paz-Yepes, J., E. Flores y A. Herrero. 2003. Transcriptional effects of the signal transduction protein PII (glnB gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp PCC 7942. *FEBS Letters*. **543**: 42-46.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. **29**: E45-5.

Pinkus, L. M. 1977. Glutamine binding sites. *Methods in Enzymology*. **46**: 414-27.

Plaitakis, A., M. Metaxari y P. Shashidharan. 2000. Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: Implications for biologic function. *Journal of Neurochemistry*. **75**: 1862-1869.

Post, A. F. 2005. Nutrient limitation of marine cyanobacteria. *Harmful cyanobacteria*. J. Huisman, H. Matthijs y Visser, Kluwer Academic Publisher.

Purnell, M. P. y J. R. Botella. 2007. Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo. *Plant Physiology*. **143**: 530-9.

Redfield, A. C. 1934. On the proportions of organic derivations in sea water and their relation to the composition of plankton. *James Johnson Memorial Volume*. R. J. Daniel, University Press of Liverpool: 177 -192.

Rhodes, D., P. J. Rich y D. G. Brunk. 1989. Amino-Acid Metabolism of Lemna-Minor-L .4. N-15-Labeling Kinetics of the Amide and Amino-Groups of Glutamine and Asparagine. *Plant Physiology*. **89**: 1161-1171.

Rich, P., M. SA y M. DA. 1991. The interactions of duroquinol, DBMIB and NQNO with the chloroplast cytochrome b_f complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. **108**: 1188-1195.

Rippka, R., T. Coursin, W. Hess, C. Lichtlé, D. J. Scanlan, K. A. Palinska, I. Iteman, F. Partensky, J. Houmard y M. Herdman. 2000. *Prochlorococcus marinus* Chisholm et al. 1992 subsp. *pastoris* subsp. nov. strain PCC 9511, the first axenic chlorophyll a_2/b_2 -containing cyanobacterium (Oxyphotobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**: 1833-1847.

Robinson, S. A., G. R. Stewart y R. Phillips. 1992. Regulation of Glutamate-Dehydrogenase Activity in Relation to Carbon Limitation and Protein Catabolism in Carrot Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiology*. **98**: 1190-1195.

Rocap, G., F. Larimer, J. E. Lamerdin, S. Stilwagon y S. W. Chisholm. 2001. From base pairs to niche differentiation: ecological insights from two complete genomes of *Prochlorococcus*. ASLO Aquatic Sciences Meeting 2001. J. D. Ackerman y S. Twombly. Albuquerque, New Mexico. SS04: 36.

Rocap, G., F. W. Larimer, J. Lamerdin, S. Malfatti, P. Chain, N. A. Ahlgren, A. Arellano, M. Coleman, L. Hauser, W. R. Hess, Z. I. Johnson, M. Land, d. Lindell, A. F. Post, W. Regala, M. Shah, S. L. Shaw, C. Steglich, M. B. Sullivan, C. S. Ting, A. Tolonen, E. A. Webb, E. R. Zinser y S. W. Chisholm. 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*. **424**: 1042-1047.

Rothen, S. A., M. Sauer, B. Sonnleitner y B. Witholt. 1997. Biotransformation of Octane by *E. coli* HB101[pGEc47] on Defined Medium: Octanoate Production and Product Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*. **58**: 356 - 365.

Sallala, A.-K. J. y N. A. Nimera. 1990. The presence of glutamate dehydrogenase in *Chlorogloeopsis fritschii*. *FEMS Microbiology Letters*. **67**: 215-220.

Scanlan, D. J., W. R. Hess, F. Partensky, J. Newman y D. Vaultot. 1996. High degree of genetic variation in *Prochlorococcus* (Prochlorophyta) revealed by RFLP analysis. *European Journal of Phycology*. **31**: 1-9.

Scanlan, D. J. y N. J. West. 2002. Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*. **40**: 1-12.

Schaffer, A. A., L. Aravind, T. L. Madden, S. Shavirin, J. L. Spouge, Y. I. Wolf, E. V. Koonin y S. F. Altschul. 2001. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. *Nucleic Acids Research*. **29**: 2994-3005.

Scheid, H. W., A. Ehmke y T. Hartmann. 1980. Plant NAD-dependent glutamate dehydrogenase. Purification, molecular properties and metal ion activation of the enzymes from *Lemna minor* and *Pisum sativum*. *Z Naturforsch [C]*. **35**: 213-21.

Segel, I. H. 1975. Effects of pH and temperature. Wiley-Intersciences.

Sharp, J. H. 1983. The distributions of inorganic nitrogen and dissolved and particulate organic nitrogen in the sea. *Nitrogen in the marine environment*. E. J. Carpenter y D. G. Capone. New York, Academic Press: 1-35.

Skokut, T. A., C. P. Wolk, J. Thomas, J. C. Meeks, P. W. Shaffer y W. S. Chien. 1978. Initial Organic Products of Assimilation of [Ammonium-N-13 and [Nitrate-N-13 by Tobacco Cells Cultured on Different Sources of Nitrogen. *Plant Physiology*. **62**: 299-304.

Smith, E. L., B. M. Austen, K. M. Blumenthal y J. F. Nyc. 1975. Glutamate dehydrogenase. New York, Academic Press.

Sommerville, K. y T. Preston. 2001. Characterization of dissolved combined amino acids in marine waters. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **15**: 1287 - 1290.

Srinivasan, R., T. S. Viswanathan y F. H. Fisher. 1988. Mechanism of formation of bound 2-iminoglutarate from 2-ketoglutarate in the glutamate dehydrogenase reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. **263**: 2304-2308.

Stanier, R. Y. y G. Cohen-Bazire. 1977. Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Annual Review of Microbiology*. **31**: 225-274.

Stewart, G. R., A. F. Mann y P. A. Fentem. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and glutamate synthase. New York, Academic Press.

Stewart, G. R., V. R. Shatilov, M. H. Turnbull, S. A. Robinson y R. Goodall. 1995. Evidence tha glutamate dehydrogenase plays a role in the oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea mays*. *Australian Journal of Plant Physiology*. **22**: 805-809.

- Strehl, B., J. Holtzendorff, F. Partensky y W. R. Hess.** 1999. A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA(Leu)UAA and a single copy of the rRNA operon. FEMS Microbiology Letters. **181**: 261-266.
- Studier, F. W. y B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. Journal of Molecular Biology. **189**: 113-30.
- Sung, Y. C. y J. A. Fuchs.** 1988. Characterization of the Cyn Operon in *Escherichia coli*-K12. Journal of Biological Chemistry. **263**: 14769-14775.
- Suzuki, I., T. Sugiyami y T. Omata.** 1996. Regulation by cyanate of the genes involved in carbon and nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. Journal of Bacteriology. **178**: 2688-2694.
- Suzuki, S., A. Ferjani, I. Suzuki y N. Murata.** 2004. The SphS-SphR two component system is the exclusive sensor for the induction of gene expression in response to phosphate limitation in synechocystis. Journal of Biological Chemistry. **279**: 13234-40.
- Ting, C. S., C. Hsieh, S. Sundararaman, C. Mannella y M. Marko.** 2007. Cryo-electron tomography reveals the comparative three-dimensional architecture of *Prochlorococcus*, a globally important marine cyanobacterium. Journal of Bacteriology. **189**: 4485 - 4493.
- Trebst, A.** 1980. Inhibitors in the electron flow. Methods in Enzymology. **69**: 675-715.

Turmel, M., C. Otis y C. Lemieux. 1999. The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proceedings of the National Academic of Sciences U S A.* **96**: 10248-53.

Urbach, E. y S. W. Chisholm. 1998. Genetic diversity in *Prochlorococcus* populations flow cytometrically sorted from the Sargasso Sea and Gulf Stream. *Limnology and Oceanography.* **43**: 1615-1630.

Vázquez-Bermúdez, M. F., E. Flores y A. Herrero. 2002. Analysis of binding sites for the nitrogen-control transcription factor NtcA in the promoters of *Synechococcus* nitrogen-regulated genes. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1578**: 95-98.

Vázquez-Bermúdez, M. F., J. Paz-Yepes, A. Herrero y E. Flores. 2002. The NtcA-activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Microbiology.* **148**: 861 - 869.

Vega-Palas, M. A., E. Flores y A. Herrero. 1992. *NtcA*, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Molecular Microbiology.* **6**: 1853-1859.

Walsh, M. A., Z. Otwinowski, A. Perrakis, P. M. Anderson y A. Joachimiak. 2000. Structure of cyanase reveals that a novel dimeric and decameric arrangement of subunits is required for formation of the enzyme active site. *Structure.* **8**: 505-514.

Waterbury, J. B., S. W. Watson, R. R. Guillard y L. E. Brand. 1979. Widespread occurrence of a unicellular, marine planktonic, cyanobacterium. *Nature*. **277**: 293-294.

Waterbury, J. B., S. W. Watson, F. W. Valois y D. G. Franks. 1986. Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. Photosynthetic picoplankton. T. Platt y W. K. W. Li, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 214: 71-120.

Wen, Z. T., L. Peng y M. Morrison. 2003. The glutamine synthetase of *Prevotella bryantii* B14 is a family III enzyme (GlnN) and glutamine supports growths of mutants lacking glutamate dehydrogenase activity. *FEMS Microbiology Letters*. **229**: 15-21.

Whitman, W. B., D. C. Coleman y W. J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*. **95**: 6578-83.

Whitton, B. A. y M. Potts. 2000. The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Woese, C. R., O. Kandler y M. L. Wheelis. 1990. Towards a Natural System of Organisms - Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **87**: 4576-4579.

Wolk, P. 1973. Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. *Bacteriological Reviews*. **37**: 32-101.

- Wood, A. P., D. P. Kelly, I. R. McDonald, S. L. Jordan, T. D. Morgan, S. Kahn, J. C. Murrell y E. Borodina.** 1998. A novel pink-pigmented facultative methylotroph, *Methylobacterium thiocyanatum* sp. nov., capable of growth on thiocyanate or cyanate as sole nitrogen sources. *Archives of Microbiology*. **169**: 148-158.
- Yamaya, T. y Y. Suzuki.** 1984. Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiology*. **76**: 1009 - 1013.
- Yoneyama, T. y K. Kumazawa.** 1974. Kinetic Study of Assimilation of N-15-Labeled Ammonium in Rice Seedling Roots. *Plant and Cell Physiology*. **15**: 655-661.
- Young-Ju, K., M. Yoshizawa, S. Takenaka, S. Murakami y K. Aoki.** 2002. Ammonia assimilation in *Klebsiella pneumoniae* F-5-2 that can utilize ammonium and nitrate ions simultaneously: Purification and characterization of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **93**: 584-588.
- Zubkov, M. V., B. M. Fuchs, G. A. Tarran, P. H. Burkill y R. Amann.** 2003. High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 1299-304.
- Zubkov, M. V., M. A. Sleight, G. A. Tarran, P. H. Burkill y R. J. G. Leakey.** 1998. Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 50-Degrees-N to 50-degrees-S. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research*. **45**: 1339-1355.
- Zubkov, M. V. y G. A. Tarran.** 2005. Amino acid uptake of *Prochlorococcus* spp. in surface waters across the South Atlantic Subtropical Front. *Aquatic Microbial Ecology*. **40**: 241-249.

Zubkov, M. V., G. A. Tarran y B. M. Fuchs. 2004. Depth related amino acid uptake by *Prochlorococcus* cyanobacteria in the Southern Atlantic tropical gyre. *FEMS Microbiology Ecology*. **50**: 153-161.