

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 981**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 3/00 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 1/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2005 E 05809308 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 1809754**

54 Título: **Producción de hidrógeno mediante la expresión heteróloga de una NAD(P)H deshidrogenasa de tipo II en Chlamydomonas**

30 Prioridad:

11.10.2004 FR 0410715

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.05.2015

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BERNARD, LAETITIA;
MUS, FLORENCE;
SIMON-DESPLATS, CARINE;
CUINE, STÉPHAN;
COURNAC, LAURENT y
PELTIER, GILLES**

74 Agente/Representante:

CAPITAN GARCÍA, Nuria

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 535 981 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de hidrógeno mediante la expresión heteróloga de una NAD(P)H deshidrogenasa de tipo II en *Chlamydomonas*

5 La presente invención se refiere a la mejora de la producción de hidrógeno por *Chlamydomonas reinhardtii*.

10 El hidrógeno es una materia prima esencial de la industria química, y constituye igualmente un combustible llamado a desempeñar un papel importante en los años futuros. Las pilas de combustible alimentadas por hidrógeno permiten, mediante la reacción del hidrógeno con el oxígeno del aire, producir electricidad de manera no contaminante, y no expulsando más que vapor de agua. Los avances tecnológicos en el campo de las pilas de combustible vuelven su uso a gran escala cada vez más factible.

15 Sin embargo, la mayor parte del hidrógeno usado actualmente se produce a partir de fuentes de energía fósiles, tales como petróleo o carbón, mediante técnicas generadoras por sí mismas de contaminación, tales como la conversión catalítica de hidrocarburos del gas natural o el craqueo del petróleo o del carbón.

Parece por tanto deseable disponer de procedimientos rentables que permitan la producción de hidrógeno a partir de una fuente de energía primaria renovable y limpia (no liberadora de gas con efecto de invernadero).

20 Ciertas algas verdes unicelulares pertenecientes a los géneros *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Chlorella* (orden de las *Chlorococcales*), *Lobochlamys* y *Chlamydomonas* (orden de las *Volvocales*), tales como la especie *Chlamydomonas reinhardtii*, son capaces de producir hidrógeno a partir de energía solar, usando agua como donante de electrones y protones.

25 En estas algas, el hidrógeno se produce por una hidrogenasa con hierro, que tiene una alta actividad específica. Esta enzima está conectada a la cadena fotosintética de transferencia de electrones PSI a través de un transportador de electrones común, la ferredoxina. Los electrones necesarios para la producción de hidrógeno pueden proporcionarse al PSI por la actividad del PSII (ruta A) o por el uso de las reservas carbonadas a través de la reducción fotoquímica de plastoquinonas (ruta B). Estas dos rutas se esquematizan en la Figura 1.

Leyenda de la Figura 1: En línea continua, la ruta A dependiente del PSII; en línea de puntos, la ruta B apoyada en una reducción de plastoquinonas independiente del PSII.

30 PSI: fotosistema I; PSII: fotosistema II; RuBP: 1,5-bisfosfato de ribulosa; LHC: complejo colector de luz; FNR: ferredoxina NDAP reductasa; Fd: ferredoxina; Pc: plastocianina; cytb6: citocromo b6; cytf: citocromo f; NDH: NADH deshidrogenasa; PQ(H)₂: plastoquinol; Qa: quinona a; P680 y P700: centros reactivos de PSI y PSII, respectivamente.

35 En condiciones naturales, la producción de H₂ no es más que un fenómeno transitorio. Efectivamente, el hidrógeno es muy sensible al O₂. Ahora bien, la fotólisis del agua que interviene al nivel del fotosistema II, que proporciona electrones para la producción de H₂ a través de la ruta A, produce igualmente O₂ que induce una inhibición rápida de la hidrogenasa.

Se han propuesto diversas soluciones para remediar este problema. La primera solución se apoya en una producción en la oscuridad, las demás en una producción con luz usando en parte la ruta B que, al contrario que la ruta A, no conduce a la producción de oxígeno.

40 Por ejemplo, la patente U.S. 4.532.210 describe un procedimiento que alterna las fases de luz y oscuridad. En el transcurso de los periodos luminosos, las algas producen O₂ y acumulan reservas de hidrocarburos producidos por fotosíntesis. Estas reservas se usan a continuación de forma anaeróbica durante las fases oscuras para producir hidrógeno. Este procedimiento necesita una purga de nitrógeno para alcanzar la anaerobia. Está limitado también por la eficacia de la producción de H₂ en la oscuridad, que es inferior por un orden de magnitud a la producción con luz.

45 La solicitud U.S. 2001/0053543 describe un procedimiento basado en la inhibición reversible del fotosistema II por carencia de azufre. Este procedimiento comprende una etapa de cultivo de algas verdes con luz y en un medio con contenido normal de azufre, para permitir la acumulación de reservas de hidrocarburos, y una etapa de cultivo en recipientes sellados y con luz en un medio desprovisto de azufre. La inhibición del fotosistema II conlleva la suspensión de la producción de oxígeno por la fotosíntesis. Cuando las algas (cuya respiración no está inhibida por la carencia de azufre) han usado la totalidad del oxígeno presente en el medio, se vuelven anaeróbicas y usan las reservas de hidrocarburos constituidas gracias a la fotosíntesis para producir H₂. La alternancia de fases de cultivo en presencia y ausencia de azufre permite una separación temporal de las fases luminosas de producción de O₂ y H₂.

55 La solicitud U.S. 2003/0162273 propone un procedimiento alternativo para inducir una carencia de azufre que inhiba el fotosistema II; se trata del uso de un alga modificada genéticamente que subexpresa una sulfato permeasa cloroplástica.

- Los procedimientos descritos anteriormente permiten evitar la inhibición de hidrogenasa con hierro, al separar la producción de O₂ de la de H₂. Sin embargo, la producción de hidrógeno por los tres procedimientos descritos anteriormente presenta limitaciones. El primer procedimiento se apoya en la actividad fermentativa del alga en la oscuridad, fenómeno poco eficaz que no conduce más que a una producción de hidrógeno marginal. El segundo y tercer procedimientos se apoyan en el funcionamiento paralelo de las rutas A y B. Al estar acompañada la ruta A de un desprendimiento de oxígeno, debe mantenerse a un nivel inferior al consumo de O₂ respiratorio con el fin de mantener la anoxia. La ruta A está por tanto limitada por la capacidad respiratoria de las algas. La contribución de la ruta B es significativa pero limitada.
- La presente invención tiene como objetivo mejorar el rendimiento de esta segunda ruta (B). Con este objetivo, los inventores han tenido la idea de usar en el cloroplasto una NADH deshidrogenasa de tipo II para estimular la reacción de reducción de plastoquinonas.
- Las NADH deshidrogenasas de tipo I y II son enzimas capaces de reducir las quinonas de cadenas de transferencia de electrones. Están asociadas a las cadenas respiratorias mitocondriales y bacterianas (KERSCHER, *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 274-283, 2000).
- Las NADH deshidrogenasas de tipo I (NDH-I) son complejos multiméricos transmembrana que comprenden de 14 a aproximadamente 50 subunidades. Este tipo de complejo solo oxida la NADH y presenta una actividad asociada al bombeo de protones.
- Las NAD(P)H deshidrogenasas de tipo II (NDH-II) son enzimas monoméricas de tipo oxidorreductasa de peso molecular comprendido entre 30 y 60 kDa capaces de reducir las quinonas de las cadenas respiratorias bacterianas o de las cadenas mitocondriales de plantas y levaduras, oxidando NADH o NADPH. Su asociación con las cadenas fotosintéticas de plantas y algas se ha propuesto igualmente, pero no se ha demostrado hasta hoy. Este tipo de enzima no se ha puesto de manifiesto en el reino animal.
- En los cloroplastos de las plantas superiores, se ha demostrado la existencia de un complejo NDH-I funcional (BURROWS *et al.*, *EMBO J.* 17: 868-876, 1998; SAZANOV *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1319-1324, 1998; HORVATH *et al.*, *Plant Physiol.* 123: 1337-1349, 2000) y se ha propuesto igualmente la existencia de una actividad de tipo NDH-II (CORNEILLE *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1363: 59-69, 1998). En *Chlamydomonas reinhardtii*, los genes que codifican el complejo NDH-I cloroplástico están ausentes. Sin embargo, se ha sugerido la existencia de una actividad de tipo NDH-II (COURNAC *et al.*, *Int. J. Hydrog. Energy* 27: 1229-1237, 2002; PELTIER y COURNAC, *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 523-550, 2002).
- En particular, COURNAC *et al.* (*Int. J. Hydrog. Energy* 27: 1229-1237, 2002) se interesa en la producción de hidrógeno en *Chlamydomonas reinhardtii* y en la cianobacteria *Synechocystis*. Los autores han estudiado el sistema de transferencia de electrones y han puesto de manifiesto en *Chlamydomonas* que la reducción no fotoquímica de plastoquinonas necesita una NAD(P)H-PQ oxidorreductasa que deber ser una NADH de tipo II.
- La presente invención se define por las reivindicaciones 1 a 5 siguientes.
- Los inventores describen el uso de una NAD(P)H deshidrogenasa de tipo II (NDH-II), o de un polinucleótido que codifica dicha proteína, para aumentar la capacidad de un alga verde de producir hidrógeno.
- Según un modo de realización preferido, dicha alga verde es un alga verde unicelular, elegida con preferencia entre las *Chlorococcales*, especialmente los géneros *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Chlorella*, y las *Volvocales*, especialmente los géneros *Lobochlamys* y *Chlamydomonas*.
- Según una disposición preferida de este modo de realización, dicha alga pertenece al género *Chlamydomonas*. Ventajosamente, dicha alga pertenece a la especie *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Se define como "NDH-II" a cualquier flavoenzima que posea:
- características comunes al conjunto de las NAD(P)H deshidrogenasas, a saber i) la capacidad de catalizar la reducción de quinonas de las cadenas de transferencia de electrones mediante la oxidación de NADH o de NAD(P)H usando FAD o FMN como cofactor flavínico, y ii) la presencia en su secuencia de al menos un ejemplar del motivo de consenso GxGxxG en que "G" representa una glicina y "x" representa un aminoácido cualquiera, que corresponde al sitio de fijación del cofactor flavínico y del NAD(P)H;
 - características específicas de las NAD(P)H deshidrogenasas de tipo II, a saber a actividad en forma de un monómero de 30 a 60 kDa o de un homodímero, el hecho de no realizar una transferencia transmembrana de protones y de poseer una actividad insensible a la rotenona.
- Para una revisión detallada de las NDH-II, se pueden reseñar las revisiones de YAGI (*J. Bioenergetics Biomembranes* 23: 211-224, 1991), de KERSCHER (*Biochim. Biophys. Acta* 1459: 274-283, 2000) y de MELO *et al.* (*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 603-616, 2004).

Los inventores han usado así la NDH-II de *Agrobacterium tumefaciens* (nº de acceso a NCBI: A12824; nº de acceso a SWISSPROT: Q8UDU6), denominada igualmente de aquí en adelante Agtundh2. La secuencia nucleotídica que codifica esta enzima se representa en la lista de secuencias del anexo con el número SEQ ID NO: 1, y la secuencia polipeptídica deducida con el número SEQ ID NO: 2.

- 5 Son otras NDH-II que pueden usarse para el empleo de la presente invención, a modo de ejemplos no limitativos, las NDH-II de *Acidianus ambivalens* (AJ489504), de *Corynebacterium glutamicum* (CAB41413.1), de *Escherichia coli* (NP_415627), de *Synechocystis sp.* (HOWITT *et al.*, *J. Bacteriol.* 181(13): 3994-4003, 1999; ORF slr1743: BAA17783), de *Zymomonas mobilis* (AAD56918), de *Bacillus subtilis* (NP_389111), de *Azotobacter vinelandii* (AAK19737), de *Trypanosoma brucei* (AAM95239.1), de *Solanum tuberosum* (CAB52796.1, CAB52797.1), de *Saccharomyces cerevisiae* (YML120C (NP_013586), YMR145c (NP_013865.1), YDL085w (NP_010198.1)), de *Neurospora crassa* (CAB41986, EAA27430) y de *Yarrowia lipolytica* (XP_505856).

10 Ventajosamente, se puede usar igualmente una NDH-II endógena de *Chlamydomonas reinhardtii*. Se han identificado secuencias que codifican presuntas NDH-II en la secuencia completa del genoma de *Chlamydomonas reinhardtii* (versión 2) en el sitio "<http://genome.jgi-psf.org/chlre2/chlre2.home.html2>", con las identificaciones C_310108, C_1170009, C_5950001, C_1890016, C_1450028, C_1450029 y C_270109. A partir de estas secuencias, los inventores han identificado una secuencia que codifica eficazmente una NDH-II. Esta secuencia, denominada de aquí en adelante N2Cr2, se representa en la lista de secuencias del anexo con el número SEQ ID NO: 3, y la secuencia polipeptídica deducida, denominada N2Cr2, se representa por el número SEQ ID NO: 4.

20 Los inventores han clonado y expresado un fragmento de N2Cr2 correspondiente a los nucleótidos 199-1857 de la secuencia SEQ ID NO: 3 (y que codifica por tanto un polipéptido correspondiente a los aminoácidos 67-619 de la secuencia SEQ ID NO: 4) y han mostrado que el polipéptido codificado por este fragmento correspondía a una NDH-II de localización cloroplástica.

25 La NDH-II N2Cr2, así como cualquier fragmento de esta proteína que presente una actividad NAD(P)H deshidrogenasa, y los polinucleótidos que codifican dicha NDH-II o dicho fragmento forman parte igualmente del objeto de la presente invención.

30 Cierta número de las NDH-II mencionadas anteriormente presentan una afinidad preferencial por NADH. Ahora bien, aunque NADH y NADPH estén ambos presentes dentro del cloroplasto, es el NADPH el que representa la forma mayoritaria. Con el objetivo de aumentar la eficacia en un contexto cloroplástico, al usar las NDH-II preferiblemente NADH, los inventores han tenido la idea de modificar estas enzimas para aumentar su eficacia para NADPH.

35 Han efectuado una mutagénesis dirigida de Agtundh2, y han mostrado que la sustitución del residuo ácido (glutamato en el caso de Agtundh2) situado, en las enzimas que usan preferiblemente NADPH, al final de la segunda lámina β del motivo β - α - β de enlace de nucleótidos piridínicos (denominado igualmente "motivo de Rossmann"), por un residuo polar neutro tal como los encontrados en la misma posición en las enzimas que usan preferiblemente NADH, permitía aumentar su afinidad por NADPH.

40 Los inventores describen una NDH-II mutante obtenida a partir de una NDH-II que usa preferiblemente NADH, mediante sustitución del residuo de glutamato o aspartato al final de la segunda lámina β del motivo β - α - β de enlace de nucleótidos piridínicos por un residuo polar neutro, preferiblemente un residuo de glutamina o asparagina.

Este residuo corresponde, por ejemplo, a la posición 201 de la secuencia de Agtundh2 (SEQ ID NO: 2), y a la posición 285 de la secuencia de N2Cr2 (SEQ ID NO: 4).

45 La Figura 2 representa un alineamiento de secuencias de diferentes NDH-II, al nivel del sitio de enlace de los nucleótidos piridínicos. La secuencia de consenso del motivo β - α - β se representa debajo del alineamiento de secuencias; Φ representa un residuo hidrófilo; Δ representa un residuo hidrófobo y # representa el residuo situado al final de la segunda lámina β ; se trata de un residuo ácido en las NDH-II que usan preferiblemente NADH, y de un residuo polar neutro en las NDH-II que usan preferiblemente NADPH (por ejemplo, como se muestra en el alineamiento de la Figura 2, las NDH-II ST-NDB1 y NC-NDE1 tienen un residuo de glutamina en esta posición).

50 La presente invención tiene como objeto un procedimiento para incrementar la capacidad de un alga verde de producir hidrógeno, caracterizado porque comprende la transformación genética de dicha alga por un polinucleótido que codifica una NAD(P)H deshidrogenasa de tipo II (NDH-II) tal como se define anteriormente, y la expresión de dicha NDH-II en dicha alga, en el que dicha NDH-II:

- 55 – presenta al menos un ejemplar del motivo de consenso GxGxxG en que "G" representa una glicina y "x" representa un aminoácido cualquiera,

- tiene la capacidad de catalizar la reducción de quinonas de las cadenas de transferencia de electrones mediante la oxidación de NADH o NADPH usando un cofactor flavínico, y
- es, en su forma activa, un monómero de 30 a 60 kDa o un homodímero.

5 Para el empleo de la presente invención, se usarán las técnicas habituales de ingeniería genética. De forma clásica, se construye un módulo de expresión disponiendo un polinucleótido que codifica la NDH-II que se desea expresar bajo el control de secuencias de regulación de la expresión (especialmente promotoras y terminadoras de la transcripción) apropiadas. Ventajosamente, dicho polinucleótido que codifica la NDH-II está fusionado con una secuencia de orientación cloroplástica.

10 El módulo de expresión puede comprender igualmente, además, elementos de regulación de la transcripción y/o de la traducción, entre los cuales se citarán especialmente los activadores (potenciadores) o atenuadores (silenciadores) de la transcripción, las secuencias líder, las secuencias de poliadenilación, etc.

15 El módulo de expresión así obtenido se inserta a continuación en un vector apropiado, que se usa para transformar la célula o el organismo hospedador elegido. Las herramientas y procedimientos diferentes utilizables para la transformación de algas verdes son conocidos por sí mismos, y pueden usarse para el empleo de la presente invención (para una revisión, ROCHAIX *et al.*, "The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas", Kluwer Academic Publishers, Holanda, 1998).

A modo de ejemplos no limitantes de secuencias de regulación de la expresión (promotores, terminadores, etc.), y de secuencias de orientación cloroplástica utilizables en el marco de la presente invención, se citarán:

- para una expresión nuclear, los promotores, terminadores y péptidos de orientación de los genes *RbcS2* que codifica la subunidad pequeña de RUBISCO (ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa) (GOLDSCHMIDT-CLERMONT y RAHIRE, *J. Mol. Biol.* 191: 421-432, 1986); *AtpC* que codifica la subunidad γ de la ATP sintetasa cloroplástica (QUINN y MERCHANT, *Plant Cell* 7: 623-638, 1995; KINDLE y LAWRENCE. *Plant Physiol.* 116: 1779-1791, 1998) y *PetE* que codifica plastocianina (QUINN y MERCHANT, 1995, anteriormente citado; KINDLE, *Plant Mol. Biol.* 38 : 365-377, 1998), que pueden combinarse de forma diferente; y
- para una expresión cloroplástica, los promotores, terminadores y péptidos de orientación de los genes *Rbc* que codifica la subunidad grande de RUBISCO; *AtpB* que codifica la subunidad β de ATP sintetasa y *PsbA* que codifica la subunidad D1 del fotosistema II (BATEMAN y PURTON, *Mol. Gen. Genet.* 263: 404-410, 2000).

30 A modo de ejemplos no limitantes de marcadores de selección utilizables en el marco de la presente invención, se citarán:

- para una expresión nuclear, los genes *Arg7* que codifica arginosuccinato liasa de *Chlamydomonas*, que complementa un mutante deficiente y por tanto auxótrofo de arginina (DEBUCHY *et al.*, *EMBO J.* 8 : 2803-2809, 1989); *Nit 1* que codifica la nitrato reductasa de *Chlamydomonas*, que complementa un mutante deficiente y por tanto incapaz de crecer con nitratos como única fuente de nitrógeno (KINDLE *et al.*, *J. Cell Biol.* 109 : 2589-2601, 1989); *Nic7* que codifica una enzima que interviene en la biosíntesis de nicotinamida de *Chlamydomonas*, que complementa un mutante deficiente y por tanto auxótrofo de nicotinamida (FERRIS, *Genetics* 141: 543-549, 1995); *Oeel* que codifica una subunidad del fotosistema II de *Chlamydomonas* que complementa un mutante estrictamente heterótrofo (MAYFIELD y KINDLE, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2087-2091, 1990); *aadA* que codifica aminoglucósido adenina transferasa de *E. coli* que confiere resistencia a espectinomina y estreptomina a cualquier cepa de *Chlamydomonas* (CERUTTI *et al.*, *Genetics.* 145: 97-110, 1997); *ble* que codifica una proteína de fijación a bleomicina de *Streptoalloteichus hindustanus* que confiere resistencia a fleomicina a cualquier cepa de *Chlamydomonas* (STEVENS *et al.*, *Mol. Gen. Genet.* 251: 23-30, 1996); debiendo expresarse los genes que codifican resistencias a antibióticos bajo el control de secuencias reguladoras de *Chlamydomonas* como las de *RbcS2*; y
- para una expresión cloroplástica, la complementación de un mutante obtenido por delección o inserción en un gen que codifica una proteína de la cadena fotosintética por el gen nativo portado por el fragmento de ADN insertado, por ejemplo, el gen *psbH* que codifica una subunidad del PSII (BATEMAN y PURTON, *Mol. Gen. Genet.* 263: 404-410, 2000) y los genes *aadA* que codifica aminoglucósido adenina transferasa de *E. coli* que confiere resistencia a estreptomina y espectinomina y *aphA-6* que codifica aminoglucósido fosfotransferasa de *Acinetobacter baumannii* que confiere resistencia a kanamicina y amikacina.

55 La transformación de algas verdes puede realizarse por diversos procedimientos tales como, por ejemplo, la inserción de un ADN en el genoma nuclear por transformaciones por perlas de vidrio (KINDLE, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1228-1232, 1990), por biolística (DEBUCHY *et al.*, *EMBO J.* 8: 2803-2809, 1989) y por electroporación (SHIMOAWARA *et al.*, *Genetics.* 148: 1821-1828, 1998).

5 Para la transformación del ADN cloroplástico, y la expresión en cloroplastos, se usará ventajosamente la inserción por recombinación homóloga de un ADN flanqueado por secuencias homólogas a la del genoma cloroplástico y correspondientes a zonas neutras del genoma (no codificantes y no reguladoras), así como las técnicas de transformación citadas anteriormente para la inserción en el genoma nuclear, en particular la biolística que da los mejores rendimientos.

La invención se refiere igualmente a algas verdes transformadas por un polinucleótido que codifica una NDH-II tal como se define anteriormente.

10 Las algas verdes según la invención pueden usarse para la producción de hidrógeno en las mismas condiciones que las algas verdes no transformadas. Pueden usarse, por ejemplo, en el marco de procedimientos tales como los descritos en la patente U.S. 4.532.210 o la solicitud U.S. 2001/0053543 citados anteriormente.

15 La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda del complemento de descripción siguiente, que se refiere a ejemplos no limitantes que muestran la capacidad de una NDH-II de *Agrobacterium* de interactuar con la cadena fotosintética de transporte de electrones de *Chlamydomonas reinhardtii* y de reducir las plastoquinonas, e ilustra la transformación de *Chlamydomonas reinhardtii* por un polinucleótido que codifica dicha NDH-II.

EJEMPLO 1: CLONACIÓN Y EXPRESIÓN EN *E. COLI* DE LA NDH-II DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*.

I- Aislamiento del gen de NDH-II

20 Se amplificó el gen *Agtundh22* que codifica la NDH-II de *Agrobacterium tumefaciens* (nº de acceso a NCBI: AI2824; nº de acceso a SWISSPROT: Q8UDU6) a partir del ADN genómico de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58) usando el par de cebadores siguiente:

cod: N2Ag.mfe.F

CGCCAAT[~]TGATGCAAGAACATCATGTT (SEQ ID NO : 5)

anticod: N2Ag.6His.PstR

AAAACTGCAGTCAATGATGATGATGATGATGGCCTCGTCCTTCAGCG (SEQ ID NO : 6)

25 Se insertaron los sitios de restricción *mfeI* y *PstI* (en cursiva) en los cebadores de codificación y anticodificación, respectivamente en 5' y en 3' de los codones de inicio y terminación (en negrita). Se insertó un marcaje compuesto de 6 codones de histidina (subrayado) en 5' del codón de terminación. Se realizó la amplificación en las condiciones siguientes:

- Mezcla de reacción:

30 Tampón de reacción específico que contiene MgCl₂ 1,5 mM

Cebadores 0,5 µM final

Mezcla de dNTP 200 µM final

300 ng de ADN

1,5 unidades de polimerasa Taq Expand High Fidelity (Roche)

- Condiciones de amplificación:

35 3 min a 95 °C + 1 min a 80 °C: 1 ciclo

1 min a 95 °C + 1 min a 70 °C (-0,5 °C en cada ciclo) + 2 min a 72 °C: 20 ciclos

1 min a 95 °C + 1 min a 60 °C + 2 min a 72 °C: 10 ciclos

6 minutos a 72 °C: 1 ciclo.

40 El producto de amplificación comprende la secuencia que codifica la NDH-II y, en 3' de la misma, una secuencia que codifica un marcaje compuesto por 6 codones de histidina.

II- Expresión en *E. coli* y purificación

1- Clonación

Se digirió el producto de amplificación con *mfel* y *PstI* (New England Biolab, protocolo recomendado por el fabricante) y se introdujo por ligamiento (ligasa de New England Biolab, protocolo recomendado por el fabricante) en un vector de expresión digerido con *EcoRI* y *PstI*.

- 5 Este vector, pSD80, porta un módulo de resistencia a ampicilina, un promotor Taq fuerte y un gen represor Laq iQ (PATEL y DUNN, *J. Bacteriol.* 177: 3917-3922, 1995; SMITH *et al.*, *Biochem.* 35: 8805-8814, 1996).

Se introdujo a continuación el producto de ligamiento por electroporación en dh10 β de *E. coli*.

Se cribaron a continuación los transformantes resistentes a ampicilina por PCR usando los mismos cebadores y las mismas condiciones que se indican anteriormente, con el fin de verificar la presencia del gen *Agtundh2*.

- 10 Se verificó a continuación la construcción mediante secuenciación usando cebadores específicos del vector pSD80, así como cebadores internos del gen *Agtundh2*.

PSD80.F 5'-GAGCTGTTGACAATTAAT-3' (SEQ ID NO : 7)
 PSD80.R 5'-AGGACGGGTCACACGCGC-3' (SEQ ID NO: 8)
 N2Ag.307.F 5'-TGGCCACCGGCGCGCGT-3' (SEQ ID NO : 9)
 N2Ag.650.f 5'-TGCGAAGGAAGCGCTTGA-3' (SEQ ID NO : 10)
 N2Ag.901.R 5'-TTCCTGATTGACCGCGG-3' (SEQ ID NO : 11)

Después de verificar que la secuencia y la inserción eran correctas, se nombró este plásmido pSDN2Ag6H y sirvió para contra transformar por electroporación la cepa dh10 β de *E. coli* con un vector (pRare, Novagen) portador de los 6 ARNt más raros de *E. coli*.

- 15 Se eligió un de los cotransformantes resistentes a ampicilina y cloranfenicol para la expresión y purificación de la proteína NDH-II 6His.

2- Expresión

- 20 Se inoculó un cultivo de medio LB (Luria Berthani), en presencia de ampicilina y cloranfenicol, de un volumen de 1 l en un matraz Erlenmeyer de 2,5 l a 1/50 a partir de un precultivo de 15 h, y se incubó a 37 °C con agitación hasta una densidad óptica de 0,5.

Se indujo la expresión de NDH-II 6His durante 2 h con isopropilto- β -D-galactósido 0,5 mM (IPTG).

Se recogieron a continuación las células por centrifugación, se aclararon con medio de cultivo nuevo y se conservaron a -80 °C.

3- Purificación

- 25 Se publicó el protocolo de purificación por BJÖRKLÖF *et al.* (*FEBS Letts.*, 467: 105-110, 2000).

Se descongelaron las células y se resuspendieron en EDTA 2,5 mM, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0,2 mM, Tris-Cl 200 mM, pH 8 a una concentración de aproximadamente 1 g por 10 ml. Se añadieron 300 μ g/ml de lisozima y se incubó la mezcla durante 1 h en hielo.

- 30 Se centrifugó a continuación la suspensión durante 60 min a 120.000 x g. Se sometió el sedimento a un choque osmótico por resuspensión en un tampón de fosfato de potasio 10 mM, pH 8, que contenía EDTA 2 mM, PMSF 0,2 mM, se homogeneizó con la ayuda de un Potter y después se volvió a centrifugar (60 min, 120.000 x g).

- 35 Se retomó la fracción de membrana en el tampón precedente y se homogeneizó con un Potter. Se solubilizaron a continuación las membranas mediante la adición de dodecilmaltósido (DM) a una concentración final del 0,2 % (peso/vol) y una relación de detergente/proteína de 0,1 y de NaCl 500 mM de concentración final. Se agita la suspensión, se incubó en hielo durante 30 min y después se centrifuga (60 min, 120.000 x g).

- 40 Se realizó la purificación de la enzima por cromatografía de afinidad de presión media en columna de níquel (columna quelante HiTrap de 5 ml, Amersham Biosciences, Uppsala) a 4 °C mediante un sistema de cromatografía (Åktå FPLC, Amersham Biosciences, Uppsala). Se pre-equilibró en primer lugar la columna con tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 500 mM, 0,2 % de DM e imidazol 20 mM. Después de depositar la muestra, se aclaró la columna con la solución precedente sin imidazol (solución A) para eliminar todas las proteínas no fijadas. Se eluyó por último la columna con una concentración creciente de una solución que contenía imidazol 250 mM (solución B). Se recogieron fracciones de 5 ml a diferentes proporciones de solución concentrada de imidazol (10 %, 15 %, 50 %, 100 %).

5 Aparece un pico proteico detectado por fluorescencia en el cromatograma para una concentración de imidazol 125 mM (Figura 3A). Se analiza el contenido proteico de las fracciones recogidas (26-29) por electroforesis en gel de acrilamida al 13 % en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) (Figura 3B). Para comparación, se analizaron igualmente las muestras correspondientes a la fracción total (T) de partida así como a las fracciones solubles (S) y de membrana (M).

Se transfirieron a continuación las proteínas a membrana de nitrocelulosa y se marcaron por inmunotransferencia con un anticuerpo primario monoclonal (Sigma) dirigido contra una secuencia de polihistidina durante 1 h, y después un anticuerpo secundario dirigido contra IgG de ratón, acoplado con fosfatasa alcalina, durante 1 h igualmente.

10 Se observa en la Figura 3B (29) la presencia de una banda fuerte marcada por anticuerpo cuyo peso molecular es inferior a 50 kDa, lo que corresponde al tamaño de proteína esperado (44 kDa). Se encuentra esta proteína en la fracción de membrana (M) y no en la fracción soluble (S).

15 Se concentró la fracción 29 por ultrafiltración hasta un volumen de 900 μ l. Se añadió entonces un volumen de 220 μ l de glicerol puro y se conservó la enzima a -80 °C. Se evaluó la concentración de enzima en un gel PAGE-SDS por comparación con una escala patrón de BSA (seroalbúmina bovina)

III- Caracterización de la enzima

1- Análisis de la coenzima

Se determinó la naturaleza de la coenzima por fluorimetría como se describe por FANG y BEATTIE (Biochem. 41: 3065-3072, 2002). Se llevó a ebullición la enzima purificada durante 3 a 4 min y después se centrifugó.

20 Se analizó el sobrenadante por HPLC usando una columna Supelcosil LC-DP de 150 x 4,6 mm (Supelco). La fase móvil está compuesta por 80 % de 0,1 % de TFA en agua y 20 % de 0,1 % TFA en acetonitrilo al 40 %. El caudal en la columna a temperatura ambiente es de 1 ml/min. Se regularon las longitudes de onda de excitación y emisión del detector de fluorescencia respectivamente a 450 y 525 nm. Se analizaron en paralelo patrones de FAD (Sigma) y FMN (Sigma).

25 Se puede ver en la Figura 4 que el pico de emisión de la muestra de enzima (N2Ag) corresponde exactamente al pico del patrón de FAD.

Estos resultados muestran que el cofactor de NDH-II de *Agrobacterium tumefaciens* es FAD.

2- Medida de la actividad enzimática en membranas bacterianas

30 En el experimento siguiente, se determinó la capacidad de esta enzima de transferir electrones a la cadena respiratoria de *E. coli*.

Se dosificó la actividad de NDH-II de *Agrobacterium tumefaciens* con la ayuda de membranas de una cepa de *E. coli* deficiente en NDH-I y NDH-II (*ndh::tet; nuoB::nptI*).

35 Se cultivó la cepa ANN022 de *E. coli* (cepa madre AN398; WALLACE y YOUNG, Biochim. Biophys. Acta. 461: 84-100, 1977) en 50 ml de LB-tetraciclina hasta el final de la fase exponencial del crecimiento (DO= 1). Se recogieron a continuación las células por centrifugación (15 min, 3200 x g) y se lavaron dos veces con 10 ml de solución que contenía Tris-Cl 200 mM, pH 8, EDTA 2,5 mM y PMSF 0,2 mM. Se disgregaron a continuación con dos pasadas por prensa de French a una presión de 110 MPa.

Se recuperó la fracción de membrana por centrifugación (30 min, 48500 x g) y se resuspendió en 200 μ l de tampón de análisis (tampón fosfato 50 mM, pH 7,5 y NaCl 150 mM).

40 Se mide el consumo de O₂ de las membranas de ANN0222 de *E. coli* mediante un electrodo de Clark (DW2/2, Hansatech, King's Lynn, Inglaterra). Después de añadir la enzima purificada, este procedimiento ha permitido determinar su actividad específica.

45 Se preincubó durante 10 min en hielo la mezcla de reacción que contenía 10 μ l de membranas bacterianas, 1,5 μ l de enzima purificada (conservada a 1 mg/ml) antes de diluir en 990 μ l de tampón de análisis (tampón fosfato 50 mM, pH 7,5 y NaCl 150 mM) y se introdujo por pipeteo en la cámara de análisis del electrodo. Se siguió la reacción a 25 °C en presencia de concentraciones crecientes de NADH o NADPH como donantes de electrones.

Siguiendo la reacción en ausencia de membranas bacterianas, se observó que la enzima presenta una actividad de captación directa de O₂. Esta, fuertemente reducida en presencia de SOD y catalasa, está ligada a la formación de especies activas de oxígeno (Figura 5).

50 Con el fin de medir únicamente la actividad oxidasa respiratoria ligada a las membranas, se añadieron catalasa (1000 U/ml) y superóxido dismutasa (SOD) (500 U/ml) a la mezcla de reacción. Se cuantificó el efecto de la

inhibición del difenilnyodonio (DPI) después de 10 min de incubación en hielo en presencia de la mezcla de enzima-membranas. Se realizaron las cinéticas de inhibición en presencia de NADH 200 μM o NADPH 2 mM.

La actividad máxima de la NDH-II de *Agrobacterium* ($V_{\text{máx}} = 5 \mu\text{mol de O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$) está comprendida en el orden de magnitud de otras NDH-II descritas en la bibliografía. Al pH fisiológico, esta enzima tiene una fuerte afinidad por NADH ($K_m = 10 \mu\text{M}$) (Figura 6A), pero igualmente una afinidad no despreciable por NADPH ($K_m = 50 \mu\text{M}$) (Figura 6B), lo que es raro para una enzima bacteriana. Esta característica es interesante para hacer funcionar esta enzima en el cloroplasto, pues este compartimento celular contiene NADPH en abundancia. La enzima se ve muy afectada por los inhibidores clásicos de NDH-II, y especialmente por DPI con una I_{50} de 10 μM (Figura 6C).

10 EJEMPLO 2: PUESTA DE MANIFIESTO DE LA REDUCCIÓN DE PLASTOQUINONAS DE CHLAMYDOMONAS REINHARDTII POR LA NDH-II DE AGROBACTERIUM

Se analizó la actividad de reducción de plastoquinonas por la NDH-II de *Agrobacterium* midiendo la fluorescencia de la clorofila. En presencia de un destello débil no actínico, la medida de la fluorescencia de la clorofila proporciona una indicación del estado redox de las plastoquinonas.

15 I- Preparación de membranas de tilacoides

Se extrajo un cultivo de 200 ml de *Chlamydomonas reinhardtii* (de tipo silvestre 137c) en fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 5×10^6 células $\cdot \text{ml}^{-1}$) y después se centrifugó (5 min, 1000 x g). Se lavaron las células con tampón HEPES-NaOH 35 mM (pH 7,2), se resuspendieron en 10 ml de tampón de lisis (tricina-NaOH 50 mM, pH 8, NaCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, 1 % de BSA, benzamidina 1 mM y PMSF 1 mM) y se conservaron en frío y en la oscuridad para las etapas siguientes.

Se pasó la suspensión dos veces a través de una prensa de French a 13,8 MPa. Se centrifugó en primer lugar el lisado (5 min, 4 °C, 500 x g) para eliminar las células no lisadas, se sedimentaron a continuación las membranas de tilacoides a 10.000 x g durante 10 min y se resuspendieron en 250 a 500 μl de tampón de análisis (tricina-NaOH 50 mM, pH 7,2, NaCl 10 mM y MgCl_2 5 mM).

25 II- Reducción de plastoquinonas

Se midió la fluorescencia del fotosistema II gracias a un fluorímetro de luz modulada (PAM 101-103, Walz, Effeltrich, Alemania).

Se usó una luz modulada no actínica (650 nm, 1,6 kHz) para determinar el nivel de fluorescencia clorofílica F_0 . Se midió el nivel máximo de fluorescencia clorofílica F_m bajo un destello saturante de 1 segundo (aproximadamente 1000 $\mu\text{mol de fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Con el fin de evitar la reoxidación de las plastoquinonas, se realizaron los experimentos en condiciones anaeróbicas mediante la adición a la mezcla de reacción de glucosa (20 mM), glucosa oxidasa (2 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y catalasa (1000 unidades $\cdot \text{ml}^{-1}$). Se incubaron las membranas de tilacoides con o sin NDH-II (1,5 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de concentración final) durante 10 min en hielo y se comparó la tasa de reducción de plastoquinonas antes y después de la adición de NADH 200 μM . Se presentan los resultados en la Figura 7 (NDH2Ag = presencia de la NDH-II de *Agrobacterium*; control = presencia de la enzima nativa sola; DPI = efecto de inhibición del DPI).

La Figura 7 muestra que la fluorescencia de la clorofila medida en membranas de tilacoides de *Chlamydomonas* aumenta después de la adición de NADH. Este aumento corresponde a la reducción no fotoquímica de las PQ por la enzima nativa del alga. Sin embargo, en presencia de la NDH-II de *Agrobacterium* purificada (NHD2Ag), el aumento de la fluorescencia es más rápido y más intenso. La reducción de plastoquinonas es por tanto superior a la efectuada por la enzima nativa sola (control). Esta es la demostración de la capacidad de la NDH-II de *Agrobacterium* de interaccionar con la cadena fotosintética de transporte de electrones.

Con el fin de cuantificar este efecto de la NDH-II de *Agrobacterium* sobre el flujo de electrones desde NAD(P)H hasta los aceptores del PSI, se realizaron medidas de consumo de oxígeno en presencia de metilviológeno (un aceptor del PSI) de DCMU (un inhibidor del PSI) o de un donante de electrones NADH (200 μM) o NADPH (2 mM).

Los tilacoides de *Chlamydomonas* (50 μl , correspondientes a 85 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de clorofila) se disponen en un electrodo de Clark que contiene 900 μl de tampón de análisis (tricina-NaOH 50 mM, pH 7,2, NaCl 10 mM y MgCl_2 5 mM, DCMU 25 μM , metilviológeno 50 μM , SOD (500 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$), catalasa (1000 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$), mixotiazol 4 μM , SHAM (ácido salicilhidroxámico) 800 μM . Estos dos últimos compuestos se añaden con el fin de inhibir la captación de O_2 respiratorio.

En estas condiciones, la fracción de captación de oxígeno fotoinducida sensible a DNP-INT (2-yodo-6-isopropil-3-metil-2',4,4'-trinitrodifeniléter; 10 μM), inhibidor del citocromo b_6/f , es proporcional a la transferencia de electrones entre NAD(P)H y la cadena fotosintética.

La adición de 1,5 µg de NDH-II de *Agrobacterium tumefaciens* purificada estimula esta transferencia de electrones de 20 a 45 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ de clorofila cuando se usa NADPH como donante, y de 21 a 67 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ de clorofila cuando se usa NADH como donante.

- 5 Este experimento permite por tanto cuantificar la estimulación de la transferencia de electrones entre NADPH (o NADH) y las plastoquinonas de tilacoides mediante la adición de la NDH-II de *Agrobacterium tumefaciens*. La estimulación es de un factor de aproximadamente 2 en el caso de NADPH y de un factor de aproximadamente 3 en el caso de NADH.

- 10 Estos resultados *in vitro* permiten suponer que una expresión heteróloga de una NDH-II en *Chlamydomonas reinhardtii* (y más genéricamente en cualquier alga susceptible de producir hidrógeno), sea cloroplástica o nuclear con orientación hacia el cloroplasto, puede aumentar la actividad plastoquinona reductasa intracloroplástica y la producción de H₂ asociada.

EJEMPLO 3: TRANSFORMACIÓN DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* POR LA SECUENCIA QUE CODIFICA LA NDH-II DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

I- Construcción del plásmido pSADN2Ag

- 15 Se amplificó el gen *Agtundh2* por PCR a partir del genoma de *A. tumefaciens* (cepa C58) usando los cebadores siguientes:

ndhAgTu.F

5'-TCCCCCGGGATGCAAGAACATCATGTT-3' (SEQ ID NO: 12)

(Tm 66,5 °C)

- 20 y

ndhAgTu.R

5'-CCGCAATTGTCAGGCCTCGTCCTTCAG-3' (SEQ ID NO : 13)

(Tm 69,5 °C)

y en las condiciones siguientes:

- 25 - Mezcla de reacción:

Tampón de reacción específico que contiene MgCl₂ 1,5 mM

Cebadores 0,5 µM final

Mezclas de dNTP 200 µM final

300 ng de ADN

- 30 1,5 unidades de polimerasa Taq Expand High Fidelity (Roche)

- Condiciones de amplificación:

3 min a 95 °C + 1 min a 80 °C: 1 ciclo

1 min a 95 °C + 1 min a 60 °C + 2 min a 72 °C: 30 ciclos

6 minutos a 72 °C: 1 ciclo.

- 35 El producto de amplificación se digirió con *SmaI/mfeI*.

Se digirió el plásmido pGEND2 (FISHER y ROCHAIX, *Mol. Genet. Genomics* 265: 888-894, 2001) con *NaeI/EcoRI*, para escindir la secuencia que codifica la proteína PsaD, con excepción del péptido de orientación cloroplástica. Se reemplazó el fragmento escindido por el fragmento *SmaI/mfeI* obtenido a partir del producto de amplificación del gen *N2Ag*.

- 40 El plásmido resultante, denominado pSADN2Ag, contiene por tanto la secuencia que codifica la NDH-II de *Agrobacterium tumefaciens* bajo el control del promotor del gen *psaD*, y en fusión traduccional con el péptido de orientación cloroplástica de la proteína PsaD.

II- Transformación de *Chlamydomonas reinhardtii*

Se usó un mutante de *Chlamydomonas reinhardtii* deficiente en arginosuccinato liasa (CC-2852 arg7 cwl5 mt+; Chlamydomonas Center, Duke University, Durham, EE.UU.), y por tanto auxótrofo de arginina. Se ponen en cultivo las algas en medio TAP, en un volumen de 200 ml (HARRIS, "The Chlamydomonas sourcebook", Academic Press, San Diego, 1989) suplementado con arginina 100 mg/l, con agitación, a una temperatura de 25 °C y luz continua de aproximadamente 35 $\mu\text{mol de fotones}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

Al final de la fase exponencial (concentración de aproximadamente 10^7 células/ml), se concentran las algas por centrifugación y se retoman en TAP para obtener una suspensión de $3\cdot 10^8$ células/ml.

Se usa el plásmido PSADN2Ag con el plásmido p389 (Chlamydomonas Center, Duke University, Durham, EE.UU.; <http://www.chlamy.org/strains/plasmids.html>) compuesto por un fragmento de ADN nuclear de *Chlamydomonas* de un tamaño de 7,1 kb, incluyendo el gen *Arg7*, y clonado en BamHI en el vector pBR329, para cotransformar las algas.

Se mezclan en un tubo 300 mg de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro (Sigma), 10 μl de plásmido PSADN2Ag (=1 μg), 2 μl de plásmido p389 (=0,2 μg) y 350 μl de suspensión de algas (= aproximadamente 10^8 células). Se agita durante 15 segundos mediante un vórtex regulado a la velocidad máxima. Se añaden a continuación 650 μl de TAP y, después de homogeneización, se usa la suspensión para inocular dos placas Petri (450 μl sobre cada placa) que contienen medio TAP (agar 15 g/l) sin arginina.

Al cabo de 10 días de incubación con luz continua ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) a 25 °C, se trasplantan las algas sobre el mismo medio. Después de 2 trasplantes, se recogen los transformantes que hayan crecido sin arginina.

Se seleccionan los transformantes que hayan integrado el gen *N2Ag* detectando la presencia de este gen por PCR.

Se lisan las colonias según el protocolo siguiente:

Se retoma cada colonia en 100 μl de agua estéril (filtración milliQ®). En un tubo de 1,5 ml, se mezclan 5 μl de tampón 10X de PCR, 1 μl de SDS al 0,01 %, 1 μl de DTT 200 mM, 3 μl de células y 39 μl de H₂O.

Se efectúan 5 ciclos de congelación/descongelación (entre nitrógeno líquido y baño de agua a 55 °C).

Se añaden 2 μl de proteinasa K 10 $\mu\text{g/ml}$ y se incuba durante 1 h a 55 °C.

Se inactiva la proteinasa K mediante un tratamiento de 5 minutos a 95 °C.

Se efectúa la PCR usando los cebadores ndhAgTu.F y ndhAgTu.R, y en las condiciones siguientes:

- Mezcla de reacción:

Para 25 μl de volumen final

2,5 μl de tampón 10X

2 μl de mezcla de dNTP

1,25 μl de cada cebador

2,5 μl de BSA 10X

3 μl de lisado de células

0,3 μl de polimerasa Taq (Qiagen)

12,2 μl de H₂O

- Condiciones de amplificación:

3 min a 95 °C + 1 min a 80 °C: 1 ciclo

1 min a 95 °C + 1 min a 60 °C + 2 min a 72 °C: 30 ciclos

6 minutos a 72 °C: 1 ciclo.

Se efectuó un control positivo reemplazando el ADN genómico de *Chlamydomonas* por el plásmido que ha servido para transformación.

Se analizaron los productos de amplificación por migración sobre un gel de agarosa al 1 % y se visualizaron después de marcar el gel con bromuro de etidio (Figura 8). Se depositó un marcador de peso molecular en paralelo en el gel con el fin de estimar el tamaño de los productos de amplificación obtenidos.

Los transformantes que han integrado el gen de la NDH-II presentan una banda de aproximadamente 1,2 kb observada igualmente en el control positivo. La proporción de cotransformantes (= que hayan integrado los dos plásmidos) es de aproximadamente un 50 %.

III- Expresión de la NDH-II:

- 5 Se verificó la expresión del gen de la NDH-II de *Agrobacterium* por PCR-TI en 6 cotransformantes. Se extraen los ARN totales a partir de 25 ml de cultivo en fase exponencial con el kit RNeasy®, según las indicaciones del fabricante (Qiagen). Se preparan los ADNc con la ayuda del kit Omniscript®, según el protocolo recomendado por el fabricante (Qiagen) ajustando el volumen de los diferentes ARN para obtener 2 µg en cada reacción.

Se efectúa la PCR usando los cebadores ndhAgTu.F y ndhAgTu.R, y en las condiciones siguientes:

- 10 - Mezcla de reacción:

Tampón de reacción específico que contiene MgCl₂ 1,5 mM

Cebadores 0,5 µM final

Mezclas de dNTP 200 µM final

300 ng de ADNc

- 15 1,5 unidades de polimerasa Taq Expand High Fidelity (Roche)

- Condiciones de amplificación:

3 min a 95 °C + 1 min a 80 °C: 1 ciclo

1 min a 95 °C + 1 min a 60 °C + 2 min a 72 °C: 30 ciclos

6 minutos a 72 °C: 1 ciclo.

- 20 Se realizó un control negativo para verificar que los amplicones observados no provienen de una amplificación del ADN nuclear persistente después de la etapa de digestión incluida en el protocolo de extracción de ARN. Para este control, se reemplazan los 300 ng de ADN obtenidos después de la etapa de transcriptasa inversa por 5 µl de solución del ARN precedente a esta etapa.

- 25 Para controlar la eficacia del protocolo de extracción, así como el nivel de expresión de la NDH-II, se amplificó en paralelo el ADNc de actina 1, que es una proteína expresada constitutivamente y en alta cantidad.

Se analizaron los productos de amplificación por migración en un gel de agarosa al 1 % y se visualizaron después de marcar el gel con bromuro de etidio (Figura 9). Se depositó en paralelo sobre el gel un marcador de peso molecular con el fin de estimar el tamaño de los productos de amplificación obtenidos.

- 30 Los cotransformantes que expresan el gen de la NDH-II presentan una banda de aproximadamente 1,2 kb correspondiente al tamaño del inserto. El control negativo no presenta ninguna banda, lo que significa que las preparaciones de ARN no estaban contaminadas con ADN genómico, mientras que sí presenta un producto de amplificación por actina. Todos los cotransformantes ensayados expresan el gen de la NDH-II a niveles diferentes, pero del mismo orden de magnitud que el de la actina.

EJEMPLO 4: COMPLEMENTACIÓN FUNCIONAL DE UNA CEPA DE *E. COLI* DEFICIENTE EN NDH

- 35 **I – Ensayo de complementación del crecimiento**

Se ensayó la funcionalidad de la proteína Agtundh2 *in vivo* en un hospedador heterólogo determinando su capacidad de restaurar el crecimiento de una cepa mutante de *E. coli*, ANN.0222, deficiente en NDH-1 y NDH-2. Esta cepa crece normalmente en medio LB, pero es incapaz de crecer en medio M9 mínimo suplementado con manitol como única fuente de carbono.

- 40 Se transformó químicamente la cepa ANN.0222 de *E. coli* (CaCl₂) con el plásmido pSDN2Ag6H. Se seleccionaron los transformantes en medio LB de agar (suplementado con 1 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura y 0,5 % de NaCl, pH 7) que contenía ampicilina (100 µg/ml). Se cultivaron los transformantes y la cepa de origen hasta el medio de fase exponencial a 37 °C en medio LB líquido que contenía ampicilina (100 µg/l). Se aclararon las células con medio M9 estéril suplementado con manitol como única fuente de carbono (1X sales M9, MgSO₄ 2x10⁻³ M, CaCl₂ 10⁻⁴ M, 0,4 % de manitol). Se diluyeron a continuación las células en medio M9/manitol y se inocularon sobre un medio sólido M9/manitol/agar que contenía ampicilina y diferentes concentraciones de IPTG. Se incubaron las placas Petri a 37 °C durante 2 días. Como control, se inocularon las mismas células en paralelo en placas que contenían medio LB de agar que contenía ampicilina y diversas concentraciones de IPTG, y se incubaron después a 37 °C durante una noche.

Se ilustran los resultados por la Figura 10A, que representa la formación de colonias sobre medio rico (LB) y sobre medio mínimo suplementado con manitol (M9+manitol) para la cepa ANN0222 y el transformante que expresa *Agtundh2* (señalado como *AtuNdh2* en la Figura). Se indican las concentraciones de IPTG por encima de cada carril correspondiente.

- 5 El crecimiento de las cepas mutantes no transformadas está considerablemente limitado sobre medio mínimo, en ausencia o en presencia de IPTG (0,1 mM). En contraposición, se restauró el crecimiento sobre medio mínimo de la cepa que expresa *Agtundh2* después de inducción por IPTG 0,1 mM. Se observó una complementación parcial del mutante incluso en ausencia de IPTG, lo que sugiere un cierto nivel de expresión de la proteína independiente de IPTG.

10 **II – Actividad de NADH deshidrogenasa de membrana**

Se prepararon dos lotes de fracciones de membrana de ANN.0222 de *E. coli* a partir de un cultivo de la cepa de muestra sobre medio LB y de un cultivo de la cepa que ha incorporado el plásmido pSDN2Ag6H cultivada sobre medio LB en presencia de IPTG 0,1 mM. Se llevaron los cultivos hasta una densidad óptica de 1 a 600 nm. Se recogieron las células por centrifugación (15 min, 3200 x g), se aclararon dos veces y se resuspendieron en 10 ml de tampón A (Tris-Cl 200 mM, pH 8, EDTA 2,5 mM y PMSF 0,2 mM; (30)). Se disgregaron a continuación las células mediante dos pasadas a través de una prensa de French a 110 MPa. Se retomó la fracción de membrana, recogida por centrifugación (30 min, 4 °C, 48500 x g), en 200 µl de tampón B (tampón fosfato 50 mM, pH 7,5 y NaCl 150 mM). Se midió la captación de O₂ con la ayuda de un electrodo de Clark (DW2/2, Hansatech, King's Lynn, Inglaterra) en dos alícuotas de 2 µl de estas fracciones de membrana, diluidas en 1 ml de tampón A a 25 °C y en presencia de NADH.

Se ilustran los resultados por la Figura 10B, que representa la captación de O₂ en presencia de NADH de membranas de ANN0222 de *E. coli* preparadas a partir de la cepa de referencia (control) y de la cepa que expresa *Agtundh2*.

- 25 Mientras que no se ha detectado ninguna actividad de captación de O₂ en las membranas de la cepa de control en respuesta a la adición de NADH, se ha detectado en cambio una captación de O₂ elevada en las mismas condiciones en membranas de la cepa transformada con pSDN2Ag6H. (Fig. 10B). Expresada en las membranas de *E. coli*, *Agtundh2* es capaz de oxidar NADH y NADPH con velocidades máximas del mismo orden, pero con una afinidad mucho más fuerte por NADH.

III – Expresión de proteína

- 30 Se confirmó por inmunodetección la expresión de proteína *Agtundh2* en la cepa ANN.0222 transformada.

Se produjo un suero de conejo contra proteína *Agtundh2* purificada (Agro-Bio, Villeny, Francia). Se extrajeron las fracciones proteicas soluble y de membrana como se indica anteriormente. Se cargaron estas fracciones proteicas, así como las alícuotas de la proteína *Agtundh2* purificada, sobre gel PAGE-SDS al 10 %, se sometieron a una electroforesis y se transfirieron después a membranas de nitrocelulosa. Se incubaron a continuación las membranas de nitrocelulosa durante 30 minutos en leche (3 % de leche descremada en polvo en agua con adición de 0,1 % de TBST) y se aclararon después con TBST al 0,1 % de nuevo durante 1h y 30 min con el anticuerpo anti-*Agtundh2* diluido 1/10000. Se aclararon a continuación las membranas tres veces durante 10 minutos con TBST al 0,1% y se incubaron después durante 1 h con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1/10000. Se realizó la reacción de detección siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Sigma).

Se ilustran los resultados por la Figura 11: Panel de la izquierda: inmunodetección en las fracciones proteicas soluble (S) y de membrana (Mb) de la cepa ANN0222 de *E. coli*, transformada con el vector pSD80 "vacío" o con la construcción portadora de *Agtundh2*, y expuesta a IPTG 0, 0,1 o 0,5 mM. La carga del gel correspondía al final a una dilución de 1/400 de las fracciones soluble y de membrana de 50 ml de cultivo recogidos a DO₆₀₀= 1 (o sea 2,5 µg de proteínas sobre los carriles correspondientes a las fracciones de membrana y 30 µg de proteínas sobre los correspondientes a las fracciones solubles). Panel de la derecha: inmunodetección de *Agtundh2* purificada a 0,1, 0,2 y 0,3 µg/carril de izquierda a derecha.

Se encontró la mayor parte de la proteína en las fracciones de membrana, detectándose una proporción menor en las proteínas solubles. Se detectó una expresión significativa de *Agtundh2* incluso en ausencia de IPTG, lo que está de acuerdo con la complementación parcial observada en estas condiciones (véase la Fig. 10A).

Para determinar la eficacia catalítica de *Agtundh2* expresada en *E. coli*, se estimó la actividad específica a partir de las cantidades determinadas por transferencia Western.

Basándose en las intensidades relativas de las señales obtenidas para la proteína *Agtundh2* purificada y para las fracciones de membrana, se estimó la cantidad de proteína *Agtundh2* en los experimentos ilustrados por la Fig. 10B en 0,6 µg de proteína. Las captaciones de O₂ máximas en estas condiciones se estiman así en 13,2/0,6= 22 nmol de O₂·min⁻¹·µg de proteína⁻¹, o sea 44 nmol de NADH min⁻¹·µg de proteína⁻¹.

EJEMPLO 5: MODIFICACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD RELATIVA DE AGTUNDH2 POR NADH Y NADPH

I – Amplificación del gen *Agtundh2*

Se amplificó el gen *Agtundh2* a partir del plásmido pSDN2Ag6H usando el par de cebadores siguientes:

*cod : N2Ag .Ncol

5 ***ATGGAAGAACATCATGTTGTCGTC*** (SEQ ID NO : 14)

Se insertó el sitio de restricción Ncol (en cursiva) en el cebador de manera que se superpusiese con el codón de inicio del gen (en negrita) y modificando la cuarta base de la secuencia (C se vuelve G).

*anticod : N2Ag.Xbal

CCGTCTAGATCAGGCCTCGTCCTTCAGCGT (SEQ ID NO : 15)

10 Se insertó el sitio de restricción Xbal (en cursiva) en el cebador anticodificante en 3' del codón de terminación del gen (en negrita).

Se realizó la amplificación en las condiciones siguientes:

1-Mezcla de reacción:

Tampón de reacción específico 1X

15 MgSO₄ 1,5 µM final

Cebadores 0,5 µM final

Mezcla de dNTP 200 µM final

200 ng de ADN

1 unidad Pfx platinum (Invitrogen)

20 **2-Condiciónes de amplificación:**

2 min a 94 °C: 1 ciclo

30 s a 94 °C +1 min a 55 °C + 3 min a 68 °C: 25 ciclos

10 min a 68 °C: 1 ciclo.

II – Introducción de la mutación E201Q en la secuencia del gen *Agtundh2*:

25 Se introdujo la mutación E201Q del gen *Agtundh2* dentro de la secuencia del gen mediante la técnica de mutagénesis dirigida llamada "fusión de PCR". Se obtuvieron los fragmentos correspondientes a la primera etapa de amplificación usando el plásmido pSDN2Ag6H como matriz. Los pares de cebadores usados son los siguientes:

* Codificante: N2Ag .Ncol ;

30 *Anticodificante: N2Ag.E201Q.R

AGGGCCGGCCTGCACAAGCAA (SEQ ID NO : 16)

El cebador N2Ag.E201Q.R permite introducir la mutación E201Q (en negrita).

Estos dos cebadores permiten obtener el fragmento 5' que contiene la mutación E201Q.

* Anticodificante: N2Ag.Xbal;

35 * Codificante: N2Ag.E201 Q.F

TTGCTTGTGCAGGCCGGCCCT (SEQ ID NO : 17)

El cebador N2Ag.E201Q.F permite introducir la mutación E201Q (en negrita).

Estos dos cebadores permiten obtener el fragmento 3' que contiene la mutación E201Q.

- Mezcla de reacción:

Tampón de reacción específico 1X

MgSO₄ 1,5 µM final

Cebadores 0,5 µM final

5 Mezcla de dNTP 200 µM final

200 ng de ADN

1 unidad de Pfx platinum (Invitrogen)

- Condiciones de amplificación:

2 min a 94 °C: 1 ciclo

10 30 s a 94 °C + 1 min a 55 °C + 3 min a 68 °C: 25 ciclos

10 min a 68 °C: 1 ciclo.

Los dos fragmentos de amplificación encierran la mutación de interés introducida gracias a los cebadores N2Ag.E201 Q.F y N2Ag.E201 Q.R.

15 Se realiza la segunda etapa de amplificación mezclando los dos fragmentos de amplificación obtenidos en la etapa precedente. Estos dos fragmentos van a hibridar gracias a su secuencia común (TTGCTTGTGCAGGCCGCCCT) (SEQ ID NO: 17) y van a constituir así la matriz. Se realiza la amplificación usando los dos cebadores N2Ag.NcoI y N2Ag.XbaI, en las condiciones siguientes:

- Mezcla de reacción:

Tampón de reacción específico 1X

20 MgSO₄ 1,5 µM final

Cebadores 0,5 µM final

Mezcla de dNTP 200 µM final

200 ng de fragmento N2Ag.NcoI/N2Ag.E201Q.R

200 ng de fragmento N2Ag.XbaI/N2Ag.E201Q.F

25 1 unidad de Pfx platinum (Invitrogen)

- Condiciones de amplificación:

2 min a 94 °C: 1 ciclo

30 s a 94 °C + 1 min a 55 °C + 6 min a 68 °C: 30 ciclos

10 min a 68 °C: 1 ciclo.

30 **III – Clonación de las construcciones**

35 Se digirió el producto de amplificación con NcoI y XbaI (New England Biolabs, protocolo recomendado por el suministrador) y se introdujo por ligamiento (ADN ligasa T4 de New England Biolabs, protocolo recomendado por el suministrador) en el vector pBAD24 digerido con NcoI y XbaI. Este vector porta un módulo de resistencia a ampicilina, un promotor de tipo pBAD inducible por arabinosa. Se introdujeron a continuación los productos de amplificación por electroporación en dh10β de *E. coli*. Se seleccionaron los transformantes resistentes a ampicilina y se verificó la presencia del inserto mediante extracción del ADN plasmídico y digestión con NcoI e HindIII.

Se verificaron a continuación las dos construcciones por secuenciación usando cebadores internos del gen *Agtundh2* (N2Ag.E201Q.F; N2Ag.NcoI; N2Ag.E201 Q.R; N2Ag.XbaI).

40 La secuenciación mostró que se había introducido la mutación deseada (E201 Q). El plásmido se nombró E201Qc1.

IV – Actividad de la proteína modificada

Se determinó la afinidad de la proteína purificada por NADH y NADPH.

Se ilustran los resultados por la Figura 12. Mientras que la proteína de tipo silvestre (A) presenta una actividad netamente superior a NADH 2001 μM con relación a la registrada de NADPH 200 μM , la proteína modificada (B) presenta una afinidad comparable por los dos sustratos.

5 EJEMPLO 6: IDENTIFICACIÓN DE UNA NDH2 DE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* DE LOCALIZACIÓN CLOROPLÁSTICA

I – Amplificación del gen

10 Se aisló el ARN total de cultivos de *C. reinhardtii* sobre medio TAP (extraídas entre 1×10^6 y 1×10^7 células/ml), usando el kit QIAGEN RNeasy® Plant Mini, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó la síntesis de ADNc usando el sistema de transcriptasa inversa Omniscript™ (QIAGEN) con un cebador oligo-dT. Se amplificaron los productos de reacción por PCR con la polimerasa *turbo pfu* (Stratagene) en un termociclador OmniGene Hybrid.

- Condiciones de amplificación del ADNc:

Desnaturalización a 94 °C: 5 min

15 30 s a 94 °C, 40 s a 72 °C y 2 min a 72 °C: 5 ciclos

30 s a 94 °C, 40 s a 68 °C y 2 min a 72 °C: 5 ciclos

30 s a 94 °C, 40 s a 65 °C y 2 min a 72 °C: 5 ciclos

30 s a 94 °C, 40 s a 62 °C y 2 min a 72 °C: 15 ciclos

Extensión a 72 °C: 5 min.

20 Los cebadores utilizables para la amplificación de N2Cr2 son:

5'-ATGCATAGCCTTGATGGCCAAAAC-3' et (SEQ ID NO : 18)

5'-TCACACTCGCGAGATGTGCGG-3'. (SEQ ID NO : 19)

Estos dos cebadores han permitido amplificar un ADNc (1662 pb) por PCR-TI. La nueva secuencia así identificada se bautizó como *N2Cr2*. El ADNc correspondiente a *N2Cr2* codifica un polipéptido de 533 aminoácidos con una masa predicha de 60,5 kDa.

25 Comparando la secuencia de este ADNc con las secuencias genómicas disponibles de *C. reinhardtii*, se advirtió que corresponde de hecho a una proteína truncada de 65 aminoácidos en su extremo N-terminal.

30 Se representa la secuencia completa de ADNc de *N2Cr2* en la lista de secuencias del anexo con el número SEQ ID NO: 3, y la secuencia polipeptídica deducida con el número SEQ ID NO: 4. El ADNc clonado corresponde a los nucleótidos 196-1857 de la secuencia SEQ ID NO: 3, y codifica un polipéptido correspondiente a los aminoácidos 67-619 de la secuencia SEQ ID NO: 4.

La proteína codificada por la secuencia de ADNc de 1662 pb clonada, aunque truncada en su extremo N-terminal, codifica una proteína que presenta eficazmente una actividad de NADH deshidrogenasa y que ha permitido generar un anticuerpo que reconoce la proteína N2Cr2 en *Chlamydomonas*, como se ilustra a continuación.

35 II – Clonación del gen en pSD80

Se amplificó la región codificante de *N2Cr2* de la secuencia de ADNc de 1662 pb por PCR usando los cebadores correspondientes a las partes N- y C-terminales de la secuencia extendidas por bases adicionales que confieren los sitios de restricción *EcoRI*, *SmaI* y una secuencia codificante de 6-histidina. Se insertaron los sitios *EcoRI* y *SmaI* (subrayados) en los cebadores de codificación (F) e inverso (R), respectivamente en 5' y 3' de los codones de inicio y terminación. Se insertó la secuencia codificante de 6-histidina (en cursiva) en el cebador F en 3' del codón de inicio de la región codificante de *N2Cr2*. Las secuencias de los oligonucleótidos son por tanto:

*F-*EcoRI*:

5'-CGGAATTCATGCATCATCATCATCATCATAGCCTTGATGGCCAAAAC-3' (SEQ ID NO : 20)
y

45 *R-*SmaI*:

5'-TCCCCCGGGTCACACTCGCGAGATGTCGCG-3'(SEQ ID NO : 21).

Se digirió el ADNc amplificado con *EcoRI* y *SmaI* y se insertó en el vector de expresión pSD80 portador de la resistencia a carbenicilina (Patel y Dunn, 1995) previamente digerido con *EcoRI* y *SmaI*. Se verificó el plásmido resultante denominado pSD80-N2Cr2 mediante secuenciación y se usó después para transformar la cepa DH10 β de *E. coli* por electroporación. Las células portadoras de pSD80-N2Cr2 se denominan DH10 β (pSD80-N2Cr2). Se realizó la expresión de N2Cr2 marcado con 6-His en 2 l de medio LB inoculado con 10 ml de un cultivo durante una noche de DH10 β (pSD80-N2Cr2), y se dispuso después (a 140 rpm) a 37 °C en presencia de carbenicilina (50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Aproximadamente 4 h después de la inoculación, habiendo alcanzado las células una DO_{600 nm} de 0,5, se inició la expresión de N2Cr2 marcado con 6-His mediante la adición de isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) 100 μM . Se recogieron las células 5 h después de la inducción, se aclararon con 25 ml de medio LB (centrifugación a 4355 g, 1 min, 4 °C) y se almacenaron a -80 °C.

III – Purificación sobre columna de la proteína marcada

Se realizaron el aislamiento y purificación por afinidad mediante níquel de N2Cr2-6His según el protocolo de BJÖRKLÖF *et al.* (2000, anteriormente citado). Se descongelaron las células DH10 β (pSD80-N2Cr2) en hielo y se retomaron en tampón EDTA 2,5 mM, PMSF 0,2 mM, Tris-Cl 200 mM, pH 8,0, aproximadamente a 1 g por 10 ml. Se añadió lisozima y se agitó la mezcla durante 1 h sobre hielo. Después de esto, se disgregaron las células mediante dos pasadas sucesivas por prensa de French (110 MPa). Se centrifugó el lisado a 12.000 g durante 1 h, se recogió después del sobrenadante y se usó para la purificación de N2Cr2-6His por cromatografía de afinidad por níquel, usando una resina HisTrap HP (Amersham Bioscience). Se preequilibró la columna con un tampón que contenía trietanolamina 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 25 mM, pH=7,5 (tampón A). Después de cargar la muestra, se aclaró la columna dos veces con dos volúmenes de columna de tampón A, después se aclaró con un volumen similar de Tris-Cl 50 mM, 0,2 % (p/v) de dodecilmaltósido, pH=7,5 (tampón B) y finalmente con un volumen de columna de Tris-Cl 50 mM, 0,2 % (p/v) de dodecilmaltósido, CaCl₂ 10 mM, pH= 7,5 (tampón C). Después de este "lavado de calcio", se aclaró la columna de nuevo con tres volúmenes de tampón B y dos volúmenes de tampón A. Se eluyó a continuación N2Cr2-6His usando un gradiente de imidazol realizado a partir de trietanolamina 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 300 mM, pH 7,5. Se desprendió la N2Cr2-6His de la columna con imidazol aproximadamente 180 mM; se concentró la fracción correspondiente por ultrafiltración usando el sistema "Amicon Ultra 30 kDa" (Millipore). Se añadió glicerol para una concentración final de 50 % (v/v) y se almacenó la enzima a -80 °C.

IV – Producción de un anticuerpo contra la proteína recombinante:

Usando el protocolo de purificación anterior, se obtuvieron 2 mg de proteína. Se verificó la pureza de la proteína sobre gel coloreado con azul de Coomassie y se usó el material para producir un suero dirigido contra N2Cr2, mediante la inmunización de un conejo.

V – Fraccionamiento celular:**35 Obtención de las fracciones totales, mitocondriales y solubles:**

Con el fin de determinar la localización subcelular de la proteína dentro de las células de *Chlamydomonas reinhardtii*, se ha procedido a un fraccionamiento celular que permite separar la fracción de desechos, mitocondrias y proteínas solubles. Se ha usado para ello una cepa sin pared celular (CW15) que permite obtener un fraccionamiento celular "fácil" por lisis con prensa de Yeda.

40 Se centrifugan 400 ml de un cultivo de CW15 en fase exponencial de crecimiento de *Chlamydomonas reinhardtii* durante 5 min a 500 g a 4 °C; se retoma después el sedimento en 50 ml de HEPES 35 mM, pH 7,2 y se vuelve a centrifugar durante 5 min a 500 g a 4 °C. Se introduce el sedimento retomado en 12,5 ml de tampón de lisis (tricina-NaOH 50 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, pH= 8) en una prensa de Yeda para efectuar el fraccionamiento. Se incuban las células bajo N₂ en la prensa durante 6 min a 800 kPa y después se recuperan gota a gota.

45 Se centrifuga a continuación la muestra durante 5 min a 500 g a 4 °C. Se recoge el sedimento en 2 ml de SDS al 1 %. Se centrifuga el sobrenadante a 3220 g durante 8 min a 4 °C. El sedimento contiene tilacoides, que no se recuperan pues están contaminados por membranas mitocondriales. Se centrifuga el sobrenadante durante 1 hora a 100.000 g a 4 °C. El sedimento contiene mitocondrias y se retoma en 1 ml de SDS al 1 %. El sobrenadante constituye la fracción soluble. Se precipitan las tres fracciones con acetona (al 80 % para las proteínas totales y de membrana y al 60 % para la fracción soluble). Se dosifica una muestra de cada fracción usando la técnica del ácido bicinónico (kit de ensayo BC, Uptima UP40840A, INTERCHIM).

Extracción de tilacoides

55 Con el fin de obtener las fracciones cloroplásticas no contaminadas con membranas mitocondriales, se efectuó una purificación por gradiente de Percoll (COURNAC *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275, 23, 17256-17262, 2000).

Para ello, se centrifugan 600 ml de un cultivo de Cw15 en medio de fase exponencial de crecimiento a 500 g durante 5 min a 4 °C. Se lava el sedimento una vez con 50 ml de HEPES 35 mM a pH= 7,2 y se vuelve a centrifugar durante 5 min a 500 g a 4 °C. Se retoma el sedimento en 12,5 ml de tampón A (sorbitol 0,3 M, HEPES 50 mM, pH 8,2, EDTA 2 mM, MgCl₂ 5 mM) y se introduce en la prensa de Yeda durante 3 min a 450 kPa. Se deposita el material por encima de un gradiente de Percoll (40-60 %) y se centrifuga durante 20 min a 4000 g. Se recoge el anillo correspondiente a los cloroplastos intactos y se diluye a 10 veces su volumen con tampón A. Se centrifuga la muestra durante 15 min a 3220 g, se retoma el sedimento con 3,5 ml de SDS al 0,2 % y después se precipita con acetona al 80 %.

Se dosifica la muestra según el procedimiento de ácido bicinconínico.

10 **VI – Transferencia Western:**

Se preparan 100 µg de cada fracción centrifugando el volumen adecuado durante 10 min a 10.000 rpm y resuspendiendo el sedimento en tampón de carga 1X. Se cargan 5 µl (o sea 5 µg) de cada fracción sobre un gel de PAGE-SDS al 10 %. Como control, se cargan igualmente aproximadamente 0,1 µg de proteína purificada sobre el gel. Después de la migración, se transfieren las proteínas (transferencia semiseca) sobre una membrana de nitrocelulosa (Life sciences, BioTrace NT).

Se marcan a continuación las proteínas por inmunotransferencia usando como anticuerpo primario el anticuerpo obtenido contra la proteína recombinante (AGRO-BIO). La incubación dura 1 hora a temperatura ambiente. Se añade después el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) acoplado con un fluorocromo durante 1 hora. Se realiza la detección usando el escáner infrarrojo Odyssey de la compañía LICOR.

20 Se ilustran los resultados por la Figura 13.

Se localiza en la fracción tilacoide la banda que reacciona de manera más intensa. Es de tamaño ligeramente mayor que la N2Cr2 recombinante producida. Esta diferencia de tamaño es probablemente debida al hecho de que la proteína recombinante esta truncada en el extremo N con relación a la secuencia predicha de proteína madura en *Chlamydomonas*.

25 **EJEMPLO 7: CLONACIÓN DE AGTUNDH2 EN EL PLÁSMIDO PXX6 PARA TRANSFORMACIÓN EN CHLAMYDOMONAS REINHARDTII**

I – Construcción del fragmento para clonar:

Con el fin de poder expresar la proteína Agtundh2 en *Chlamydomonas reinhardtii*, se creó un producto de fusión entre el gen *rbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii* y el gen *Agtundh2* de *Agrobacterium tumefaciens*. Para ello, se dispuso la secuencia del péptido de tránsito de *rbcS2* en 5' del codón de inicio de *Agtundh2* y se dispuso la secuencia de la región 3' UTR de *rbcS2* en 3' del codón de terminación de *Agtundh2*, usando la técnica de PCR de fusión.

Amplificación del péptido de tránsito de rbcS2

En un primer momento, se amplificó el péptido de tránsito de *rbcS2* a partir de ADN genómico de *Chlamydomonas reinhardtii* usando el par de cebadores siguientes:

*N2Ag.XhoI :

CGGCTCGAGATGGCCGCGTCATTGCCAAG (SEQ ID NO : 22)

Se introdujo el sitio de restricción de la enzima XhoI (en cursiva) en 5' del codón de inicio (en negrita) del gen *rbcS2*.

40 *TP.ndh.R :

GACGACAACATGATGTTCTTGCATCTGGTTGGCCTGAGCCGGGGCAGC (SEQ ID NO : 23)

Se indica la región correspondiente a la secuencia del péptido de tránsito de *rbcS2* en cursiva, y aquella correspondiente a la extensión de *Agtundh2* en caracteres normales.

45 - **MEZCLA DE REACCIÓN:**

Tampón de reacción específico 1X

MgSO₄ 1,5 µM final

Cebadores 0,5 µM final

Mezcla de dNTP 200 µ final

200 ng de ADN

1 unidad de Pfx platinum (Invitrogen)

5 - CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN:

2 min a 94 °C: 1 ciclo

30 s a 94 °C +1 min a 60 °C + 3 min a 68 °C: 30 ciclos

10 min a 68 °C: 1 ciclo

Amplificación del gen *Agtundh2*

10 Se amplificó el gen *Agtundh2* a partir del plásmido pSDN2Ag6H usando el par de cebadores siguientes:

* TP.ndh.F:

GCTGCCCCGGCTCAGGCCAACAGATGCAAGAACATCATGTTGTCGTC (SEQ ID NO : 24)

Se introdujo una extensión correspondiente al final de la secuencia del péptido de tránsito de *rbcS2* (en cursiva) en 5' del codón de inicio (en negrita) de *Agtundh2*.

15 * rbcS2.3'.R:

GCTCAGATCAACGAGCGCCTCCATTGAGGCCTCGTCCTTCAGCGTCTC (SEQ ID NO : 25)

Se introdujo una extensión correspondiente al inicio de la secuencia de la región 3' UTR de *rbcS2* (en cursiva) en 3' del codón de terminación de *Agtundh2* (en negrita).

- Mezcla de reacción:

20 Tampón de reacción específico 1X

MgSO₄ 1,5 µM final

Cebadores 0,5 µM final

Mezcla de dNTP200 µM final

200 ng de ADN

25 1 unidad de Pfx platinum (Invitrogen)

- Condiciones de amplificación:

2 min a 94 °C: 1 ciclo

30 s a 94 °C +1 min a 55 °C + 3 min a 68 °C: 30 ciclos

10 min a 68 °C: 1 ciclo.

30 **Amplificación de la región 3' UTR de rbcS2:**

Se amplificó la región 3' UTR de *rbcS2* a partir de ADN genómico de *Chlamydomonas reinhardtii* usando el par de cebadores siguientes:

rbcS2.3'.F

GAGACGCTGAAGGACGAGGCCTGAATGGAGGCGCTCGTTGATCTGAGC (SEQ ID NO : 26)

35 N2Ag.Kpnl :

CGGGGTACCCTGCAAATGCTGTCTCCA (SEQ ID NO : 27)

Para el cebador rbcS2.3'.F, se introdujo una extensión correspondiente a la región C-terminal de *Agtundh2* (en cursiva) en 5' del inicio de la secuencia 3' UTR de *rbcS2* (en caracteres normales).

Para el cebador N2Ag.KpnI, se introdujo el sitio de restricción de la enzima KpnI (en cursiva) en 3' del final de la secuencia de la región 3' UTR de *rbcS2* (en caracteres normales).

5 - Mezcla de reacción:

Tampón de reacción específico 1X

MgSO₄ 1,5 µM final

Cebadores 0,5 µM final

Mezcla de dNTP 200 µM final

10 200 ng de ADN

1 unidad de Pfx platinum (Invitrogen)

- Condiciones de amplificación:

2 min a 94 °C: 1 ciclo

30 s a 94 °C + 1 min a 60 °C + 3 min a 68 °C: 30 ciclos

15 10 min a 68 °C: 1 ciclo.

Amplificación de un fragmento de fusión entre el péptido de tránsito de rbcS2 y el gen *Agtundh2*.

Se mezclan los fragmentos de amplificación correspondientes al péptido de tránsito de rbcS2 y al gen *Agtundh2* y sirven de matriz para la amplificación del fragmento de fusión que usa el par de cebadores siguientes (véase anteriormente):

20 N2Ag.XhoI

rbcS2.3'.R

- Mezcla de reacción:

Tampón de reacción específico 1X

MgSO₄ 1,5 µM final

25 Cebadores 0,5 µM final

Mezcla de dNTP 200 µM final

200 ng de fragmento del péptido de tránsito de rbcS2

200 ng de fragmento del gen *Agtundh2*

1 unidad de Pfx platinum (Invitrogen)

30 - Condiciones de amplificación:

2 min a 94 °C: 1 ciclo

30 s a 94 °C + 1 min a 55 °C + 6 min a 68 °C: 30 ciclos

10 min a 68 °C: 1 ciclo.

35 **Amplificación del fragmento de fusión entre el péptido de tránsito de rbcS2, el gen *Agtundh2* y la región 3' UTR de rbcS2:**

Se mezcla el fragmento de fusión obtenido anteriormente (péptido de tránsito de rbcS2 + gen *Agtundh2*) con el fragmento correspondiente a la región 3' UTR de rbcS2 para servir de matriz en la última etapa de amplificación usando el par de cebadores siguientes: N2Ag.XhoI ; N2Ag.KpnI.

- Mezcla de reacción:

40 Tampón de reacción específico 1X

MgSO₄ 1,5 µM final

Cebadores 0,5 µM final

Mezcla de dNTP 200 µM final

200 ng de fragmento de péptido de tránsito + gen *Agtundh2*

5 200 ng de fragmento 3' UTR de *rbcS2*

1 unidad de Pfx platinum (Invitrogen)

- Condiciones de amplificación:

2 min a 94 °C: 1 ciclo

30 s a 94 °C + 1 min a 55 °C + 6 min a 68 °C: 30 ciclos

10 10 min a 68 °C: 1 ciclo.

II – Clonación del fragmento de fusión en el plásmido pXX6:

Se digirió el producto de fusión con *XhoI* y *KpnI* (New England Biolabs, protocolo recomendado por el suministrador) y se introdujo por ligamiento (ADN ligasa T4 de New England Biolabs, protocolo recomendado por el suministrador) en el plásmido pXX6 previamente digerido con *XhoI* y *KpnI*.

15 El plásmido pXX6 se describe por (FUHRMANN M *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 55, 6, 869-881, 2004). Porta un módulo de resistencia a ampicilina, una región del promotor fuerte Hsp de *Chlamydomonas reinhardtii* que optimiza la transcripción, el gen dispuesto en 3', el promotor constitutivo del gen *rbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii* y el primer intrón del gen *rbcS2* de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Se introdujo a continuación el producto de ligamiento por electroporación en dh10β de *E. coli*.

20 Se seleccionaron los transformantes resistentes a ampicilina y se verificó la presencia del inserto por extracción del ADN plasmídico y digestión con las enzimas *XhoI* y *KpnI*.

Se verificó a continuación la construcción por secuenciación usando los cebadores siguientes: N2Ag.XhoI; N2Ag.KpnI; TP.ndh.R; TP.ndh.F; *rbcS2*.3'.F.

25 Después de verificar que la secuencia y la inserción eran correctas, se usa este plásmido, denominado pXX6N2Ag, para cotransformar mediante la técnica de perlas de vidrio la cepa CW15 de *Chlamydomonas* con el plásmido aphVIII portador de resistencia a paromomicina y la cepa 388 (auxótrofa de arginina) de *Chlamydomonas* con el plásmido pArg portador del gen Arg7 codificante de arginosuccinato liasa.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> COMISARIADO DE ENERGÍA ATÓMICA (CEA)
 BERNARD, Laetitia
 MUS, Florence
 5 CUINE, Stéphan
 COURNAC, Laurent
 PELTIER, Gilles
 SIMON-DESPLATS, Carine
- 10 <120> PRODUCCIÓN DE HIDRÓGENO MEDIANTE LA EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UNA NAD(P)H
 DESHIDROGENASA DE TIPO II EN CHLAMYDOMONAS
- <130> MJPbv263-117
 <150> FR 04 10715
 <151> 11-10-2004
 <160> 27
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 1266
 <212> ADN
 <213> *Agrobacterium tumefaciens*
- 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1266)
 <400> 1

ES 2 535 981 T3

atg	caa	gaa	cat	cat	gtt	gtc	gtc	gtg	ggg	gga	ggc	ttc	ggc	ggg	tta	48
Met	Gln	Glu	His	His	Val	Val	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Phe	Gly	Gly	Leu	
1				5					10					15		
caa	ctg	gtg	cat	ggg	ctg	gag	ggg	gcc	cct	gtc	cgc	att	aca	tta	atc	96
Gln	Leu	Val	His	Gly	Leu	Glu	Gly	Ala	Pro	Val	Arg	Ile	Thr	Leu	Ile	
			20					25						30		
gac	cgt	cgc	aat	cac	cac	ctg	ttt	cag	ccc	ctg	ctg	tat	cag	ggt	gcg	144
Asp	Arg	Arg	Asn	His	His	Leu	Phe	Gln	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gln	Val	Ala	
			35				40						45			
acg	acg	gcg	ctg	gcg	aca	tcc	gag	atc	gcc	tgg	cgc	atc	cgc	cat	ctt	192
Thr	Thr	Ala	Leu	Ala	Thr	Ser	Glu	Ile	Ala	Trp	Pro	Ile	Arg	His	Leu	
		50				55						60				
tac	cgc	gac	cgc	aag	gaa	gtg	acg	acc	ctg	ctt	gcg	gag	gtg	acc	ggc	240
Tyr	Arg	Asp	Arg	Lys	Glu	Val	Thr	Thr	Leu	Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Gly	
65					70					75					80	
gtg	gac	cgg	gcg	gcg	cgg	acc	gtg	cag	ctg	aat	tcg	ggc	cag	gtg	atc	288
Val	Asp	Arg	Ala	Ala	Arg	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Ser	Gly	Gln	Val	Ile	
				85					90					95		
ggc	ttc	gat	acg	ctg	gtg	ctg	gcc	acc	ggc	gcg	cgt	cac	gcc	tat	ttc	336
Gly	Phe	Asp	Thr	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Ala	Arg	His	Ala	Tyr	Phe	
			100					105						110		

ES 2 535 981 T3

ggt cac gac gaa tgg gag cgt tcc gcc ccc ggc ctc aag acg ctg gaa	384
Gly His Asp Glu Trp Glu Arg Ser Ala Pro Gly Leu Lys Thr Leu Glu	
115 120 125	
gat gca acg aca atc cgc cgc cgc ctg ctt ctg gcc ttc gaa agg gcc	432
Asp Ala Thr Thr Ile Arg Arg Arg Leu Leu Leu Ala Phe Glu Arg Ala	
130 135 140	
gaa ctt gcc acc agt gaa gag gag cgg cag gcg ctg ctg acc ttc gtc	480
Glu Leu Ala Thr Ser Glu Glu Glu Arg Gln Ala Leu Leu Thr Phe Val	
145 150 155 160	
atc atc ggg gcc ggc ccg acc ggc gtg gaa atg gcg ggc atg atc gcc	528
Ile Ile Gly Ala Gly Pro Thr Gly Val Glu Met Ala Gly Met Ile Ala	
165 170 175	
gag ctc gcc cac agg gcg ctg ccg gcg gaa ttc cgc aat gtc gat acc	576
Glu Leu Ala His Arg Ala Leu Pro Ala Glu Phe Arg Asn Val Asp Thr	
180 185 190	
aga aag acc cgc gta ttg ctt gtg gag gcc ggc cct cgc gtc ctg ccg	624
Arg Lys Thr Arg Val Leu Leu Val Glu Ala Gly Pro Arg Val Leu Pro	
195 200 205	
gtc ttc acg gag gat ctt tgc acc tat gcg aag gaa gcg ctt gag aag	672
Val Phe Thr Glu Asp Leu Ser Thr Tyr Ala Lys Glu Ala Leu Glu Lys	
210 215 220	
ctc gcc gtc gag gtt ctg ctc gga acg ccg gtg acg gcc tgc acg gat	720
Leu Gly Val Glu Val Leu Leu Gly Thr Pro Val Thr Ala Cys Thr Asp	
225 230 235 240	
gag gcc gtg acg gtg gcc gag acc tat tat ccc tgc cgc acc gtc gtc	768
Glu Gly Val Thr Val Gly Glu Thr Tyr Tyr Pro Cys Arg Thr Val Val	
245 250 255	
tgg gcc gcc ggt gtg cag gcc tct ccg gca gcg aag tgg ctg aat gcg	816
Trp Ala Ala Gly Val Gln Ala Ser Pro Ala Ala Lys Trp Leu Asn Ala	
260 265 270	
gcc gcc gac agg gca ggg cgt gtc atc gtc ggg ccg cag ctt cat ctc	864
Ala Gly Asp Arg Ala Gly Arg Val Ile Val Gly Pro Gln Leu His Leu	
275 280 285	
gaa gac gat gct gat atc ttc gtc atc gcc gat acc gcc gcg gtc aat	912
Glu Asp Asp Ala Asp Ile Phe Val Ile Gly Asp Thr Ala Ala Val Asn	
290 295 300	
cag gaa aac gcc aag ccg gtg ccg gcc atc gcg ccc gcg gca aag cag	960
Gln Glu Asn Gly Lys Pro Val Pro Gly Ile Ala Pro Ala Ala Lys Gln	
305 310 315 320	
cag gcc gct tat gtg gca aag gtc atc aag gcg cga ctg gag gcc aag	1008
Gln Gly Ala Tyr Val Ala Lys Val Ile Lys Ala Arg Leu Glu Gly Lys	
325 330 335	
ccg ata ccg gca ccc ttc cgc tac agc cat cag gcc aat ctc gcc acc	1056

ES 2 535 981 T3

Pro	Ile	Pro	Ala	Pro	Phe	Arg	Tyr	Ser	His	Gln	Gly	Asn	Leu	Ala	Thr		
			340					345					350				
atc	ggc	aaa	cgc	gcg	gcg	gtg	atc	gat	ttc	ggc	cgg	ttc	aag	ctg	aag		1104
Ile	Gly	Lys	Arg	Ala	Ala	Val	Ile	Asp	Phe	Gly	Arg	Phe	Lys	Leu	Lys		
		355					360					365					
ggc	gtg	ctg	gca	tgg	tgg	ata	tgg	ggg	ctt	gcc	cat	atc	tac	ttc	ctg		1152
Gly	Val	Leu	Ala	Trp	Trp	Ile	Trp	Gly	Leu	Ala	His	Ile	Tyr	Phe	Leu		
	370					375					380						
atc	gga	acg	cgg	tcg	cgg	ctg	gcc	gtg	gcg	tgg	agc	tgg	ctg	tgg	att		1200
Ile	Gly	Thr	Arg	Ser	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Trp	Leu	Trp	Ile		
385					390					395					400		
tat	ctg	agc	ggc	cag	cac	agt	gcg	cgc	ctg	att	acc	cag	aaa	gag	acg		1248
Tyr	Leu	Ser	Gly	Gln	His	Ser	Ala	Arg	Leu	Ile	Thr	Gln	Lys	Glu	Thr		
				405					410						415		
ctg	aag	gac	gag	gcc	tga												1266
Leu	Lys	Asp	Glu	Ala													
			420														

<210> 2

<211> 421

<212> PRT

5 <213> *Agrobacterium tumefaciens*

<400> 2

ES 2 535 981 T3

Met Gln Glu His His Val Val Val Val Gly Gly Gly Phe Gly Gly Leu
1 5 10 15
Gln Leu Val His Gly Leu Glu Gly Ala Pro Val Arg Ile Thr Leu Ile
20 25 30
Asp Arg Arg Asn His His Leu Phe Gln Pro Leu Leu Tyr Gln Val Ala
35 40 45
Thr Thr Ala Leu Ala Thr Ser Glu Ile Ala Trp Pro Ile Arg His Leu
50 55 60
Tyr Arg Asp Arg Lys Glu Val Thr Thr Leu Leu Ala Glu Val Thr Gly
65 70 75 80
Val Asp Arg Ala Ala Arg Thr Val Gln Leu Asn Ser Gly Gln Val Ile
85 90 95
Gly Phe Asp Thr Leu Val Leu Ala Thr Gly Ala Arg His Ala Tyr Phe
100 105 110
Gly His Asp Glu Trp Glu Arg Ser Ala Pro Gly Leu Lys Thr Leu Glu
115 120 125
Asp Ala Thr Thr Ile Arg Arg Arg Leu Leu Leu Ala Phe Glu Arg Ala
130 135 140
Glu Leu Ala Thr Ser Glu Glu Glu Arg Gln Ala Leu Leu Thr Phe Val
145 150 155 160
Ile Ile Gly Ala Gly Pro Thr Gly Val Glu Met Ala Gly Met Ile Ala
165 170 175
Glu Leu Ala His Arg Ala Leu Pro Ala Glu Phe Arg Asn Val Asp Thr
180 185 190
Arg Lys Thr Arg Val Leu Leu Val Glu Ala Gly Pro Arg Val Leu Pro
195 200 205
Val Phe Thr Glu Asp Leu Ser Thr Tyr Ala Lys Glu Ala Leu Glu Lys
210 215 220

Leu Gly Val Glu Val Leu Leu Gly Thr Pro Val Thr Ala Cys Thr Asp
225 230 235 240
Glu Gly Val Thr Val Gly Glu Thr Tyr Tyr Pro Cys Arg Thr Val Val
245 250 255
Trp Ala Ala Gly Val Gln Ala Ser Pro Ala Ala Lys Trp Leu Asn Ala
260 265 270
Ala Gly Asp Arg Ala Gly Arg Val Ile Val Gly Pro Gln Leu His Leu
275 280 285
Glu Asp Asp Ala Asp Ile Phe Val Ile Gly Asp Thr Ala Ala Val Asn
290 295 300
Gln Glu Asn Gly Lys Pro Val Pro Gly Ile Ala Pro Ala Ala Lys Gln
305 310 315 320
Gln Gly Ala Tyr Val Ala Lys Val Ile Lys Ala Arg Leu Glu Gly Lys
325 330 335
Pro Ile Pro Ala Pro Phe Arg Tyr Ser His Gln Gly Asn Leu Ala Thr
340 345 350
Ile Gly Lys Arg Ala Ala Val Ile Asp Phe Gly Arg Phe Lys Leu Lys
355 360 365
Gly Val Leu Ala Trp Trp Ile Trp Gly Leu Ala His Ile Tyr Phe Leu
370 375 380
Ile Gly Thr Arg Ser Arg Leu Ala Val Ala Trp Ser Trp Leu Trp Ile
385 390 395 400
Tyr Leu Ser Gly Gln His Ser Ala Arg Leu Ile Thr Gln Lys Glu Thr
405 410 415
Leu Lys Asp Glu Ala
420

ES 2 535 981 T3

<211> 1857

<212> ADN

<213> *Chlamydomonas reinhardtii*

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1857)

<400> 3

```

atg aac atg ttg ctt caa caa cag aag ctc gct gcg ggc tgc aag cag      48
Met Asn Met Leu Leu Gln Gln Gln Lys Leu Ala Ala Gly Cys Lys Gln
1          5          10          15

cgc agc gtt gcg cag ccc tcg cgc gga tgc gtc gct gcc cac acc ggc      96
Arg Ser Val Ala Gln Pro Ser Arg Gly Cys Val Ala Ala His Thr Gly
          20          25          30

ctg cgc tct ggg cgc gtt gct tcc cgt caa cga tca gtg acg act gcg      144
Leu Arg Ser Gly Arg Val Ala Ser Arg Gln Arg Ser Val Thr Thr Ala
          35          40          45

gtc atg aca ccg ccg gcg aag tcg gag tct tcg agc ccg gta tat acc      192
Val Met Thr Pro Pro Ala Lys Ser Glu Ser Ser Ser Pro Val Tyr Thr
          50          55          60

acc atg agc ctt gat ggc caa aac ctc aag act gct aag cct cgc ctg      240
Thr Met Ser Leu Asp Gly Gln Asn Leu Lys Thr Ala Lys Pro Arg Leu
65          70          75          80

gtt gtg ctg ggt tcc ggc tgg ggc gcc atg tcg ttc ctg aag gcg ctg      288
Val Val Leu Gly Ser Gly Trp Gly Ala Met Ser Phe Leu Lys Ala Leu

```

ES 2 535 981 T3

85					90					95						
ccg	acc	agc	atc	agc	tcg	acc	tat	gag	ctc	atc	gtc	gtc	tcg	cct	cgc	336
Pro	Thr	Ser	Ile	Ser	Ser	Thr	Tyr	Glu	Leu	Ile	Val	Val	Ser	Pro	Arg	
			100					105					110			
aac	tac	ttc	ctg	tac	acg	ccg	ctg	ctg	ccg	gct	gtg	gcg	acc	gga	acc	384
Asn	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Pro	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Thr	
		115					120					125				
atg	gag	gag	cgt	tcc	att	gtg	gag	ccc	gtg	cgc	aac	ttc	atc	gtg	ggc	432
Met	Glu	Glu	Arg	Ser	Ile	Val	Glu	Pro	Val	Arg	Asn	Phe	Ile	Val	Gly	
	130					135					140					
aag	ggc	gag	ttc	tac	gag	gct	ctg	tgc	aag	gac	att	gac	ccg	gtc	gcc	480
Lys	Gly	Glu	Phe	Tyr	Glu	Ala	Leu	Cys	Lys	Asp	Ile	Asp	Pro	Val	Ala	
145					150					155					160	
aag	gag	ctg	gtg	tgc	tgc	ttc	ccg	gag	gac	gcg	ggg	ctg	gac	agc	gcc	528
Lys	Glu	Leu	Val	Cys	Cys	Phe	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Leu	Asp	Ser	Ala	
				165						170				175		
tgc	ttc	aag	atg	agc	tac	gac	gtg	ctg	gtc	atg	gcg	gtc	ggt	tca	gtg	576
Cys	Phe	Lys	Met	Ser	Tyr	Asp	Val	Leu	Val	Met	Ala	Val	Gly	Ser	Val	
			180					185					190			
aac	aac	acg	ttt	ggc	atc	aag	gga	gtg	gac	cag	tac	tgc	ttc	tac	ttc	624
Asn	Asn	Thr	Phe	Gly	Ile	Lys	Gly	Val	Asp	Gln	Tyr	Cys	Phe	Tyr	Phe	
		195					200					205				
aag	tcc	att	gag	gac	gcc	aac	agg	ctg	cgc	tcg	cgc	gtg	tcg	gag	tgc	672
Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Ala	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Arg	Val	Ser	Glu	Cys	
	210					215					220					
ttt	gag	cgc	gcc	gcc	ctg	cct	gcc	aca	ccc	gag	gag	gag	cgc	aag	aag	720
Phe	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	Arg	Lys	Lys	
225					230					235					240	
ctg	ctg	acg	ttt	gtg	gtg	gtg	ggc	ggc	ggc	ccc	acg	ggc	gtg	gag	gtg	768
Leu	Leu	Thr	Phe	Val	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Thr	Gly	Val	Glu	Val	
				245					250					255		
gcg	gcg	gag	ctg	tac	gac	atg	atc	gag	gag	gac	ctc	tcc	aag	ctc	tac	816
Ala	Ala	Glu	Leu	Tyr	Asp	Met	Ile	Glu	Glu	Asp	Leu	Ser	Lys	Leu	Tyr	
			260					265					270			
ccc	aac	ctg	gtc	aag	gac	gtg	tcc	atc	cag	gtg	gtg	gag	ctg	atg	gac	864
Pro	Asn	Leu	Val	Lys	Asp	Val	Ser	Ile	Gln	Val	Val	Glu	Leu	Met	Asp	
		275					280						285			
cac	gtg	ctg	tcc	acc	tac	gac	cgc	gcc	att	agc	ctg	tac	acc	gcc	gag	912
His	Val	Leu	Ser	Thr	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ala	Glu	
	290					295					300					
cag	ttc	aag	cgc	gcg	ggc	atc	aag	ctg	gtc	ctc	aac	agt	cgt	gtg	gcg	960
Gln	Phe	Lys	Arg	Ala	Gly	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Arg	Val	Ala	
305					310					315					320	

ES 2 535 981 T3

tcc gtc gag gac ggc gtc gtc cgc gtc gtc aac aag gcc aac gag agc	1008
Ser Val Glu Asp Gly Val Val Arg Val Val Asn Lys Ala Asn Glu Ser	
325 330 335	
gtc gac atc aag ttt ggc gcg tgt gtc tgg gcc act ggc atc gcc atg	1056
Val Asp Ile Lys Phe Gly Ala Cys Val Trp Ala Thr Gly Ile Ala Met	
340 345 350	
aac ccg ctg gtc cgc cag ctg cag gag aag ctg ccg ggg cag agc cac	1104
Asn Pro Leu Val Arg Gln Leu Gln Glu Lys Leu Pro Gly Gln Ser His	
355 360 365	
ttc agg tct gtc ctg aca gat gac tgc atg cgc gtc aag ggc agc gac	1152
Phe Arg Ser Val Leu Thr Asp Asp Cys Met Arg Val Lys Gly Ser Asp	
370 375 380	
ggc tcc atc tgg gcg ctg ggc gac gcc gcc acc att gac cag ccc aag	1200
Gly Ser Ile Trp Ala Leu Gly Asp Ala Ala Thr Ile Asp Gln Pro Lys	
385 390 395 400	
gcg ctg gac tat gcc gag cag ctg ttt gag cag gcc gac acc aac cgc	1248
Ala Leu Asp Tyr Ala Glu Gln Leu Phe Glu Gln Ala Asp Thr Asn Arg	
405 410 415	
gat ggc cgc cta agc ttg gag gag ctg cgc gtc ctg ctc aac acc gca	1296
Asp Gly Arg Leu Ser Leu Glu Glu Leu Arg Val Leu Leu Asn Thr Ala	
420 425 430	
tcc aag gag ttc agc cac ctg gag gag cac gcg cgc ttc ctg gac agc	1344
Ser Lys Glu Phe Ser His Leu Glu Glu His Ala Arg Phe Leu Asp Ser	
435 440 445	
caa acc ggc gtc aag cgc ttc ggc gcc ctg gtc gcc aag tcg ctc agt	1392
Gln Thr Gly Val Lys Arg Phe Gly Gly Leu Val Ala Lys Ser Leu Ser	
450 455 460	
ccg gcg gat gcg gcg gcg gcg gcc agc aac agc agc cag ccc ttt	1440
Pro Ala Asp Ala Ala Ala Ala Ala Ser Asn Ser Ser Gln Pro Phe	
465 470 475 480	
gcg gtc ctg ctg gac ggc aat acg gag atc tcc aag gag cag ttc aag	1488
Ala Val Leu Leu Asp Gly Asn Thr Glu Ile Ser Lys Glu Gln Phe Lys	
485 490 495	
gac att ctt ggc aag gtc gac aag ggc ctt cgc gcg ctg cct gcc acg	1536
Asp Ile Leu Gly Lys Val Asp Lys Gly Leu Arg Ala Leu Pro Ala Thr	
500 505 510	
gcg cag gtc gcc aac cag cag ggc aag tac ctg gcg gcg gtc ttt gcg	1584
Ala Gln Val Ala Asn Gln Gln Gly Lys Tyr Leu Ala Ala Val Phe Ala	
515 520 525	
ggc aac cgc gtc acg ggg gcc ccg gag ctg gac gca gcg ctg gcg gac	1632
Gly Asn Arg Val Thr Gly Ala Pro Glu Leu Asp Ala Ala Leu Ala Asp	
530 535 540	
aag atc aag ccc ttc agg tac ttc cac aag ggc tcg gcc gcc tac gtc	1680
Lys Ile Lys Pro Phe Arg Tyr Phe His Lys Gly Ser Ala Ala Tyr Val	

ES 2 535 981 T3

545	550	555	560	
ggc agc gac aag gcc gtg ttc gac ctg ccc aag ttc ggg ccg ctc acg				1728
Gly Ser Asp Lys Ala Val Phe Asp Leu Pro Lys Phe Gly Pro Leu Thr				
	565	570	575	
ggc acg ggc gcg gcc ttt gtg tgg aag agc tac gag acg atg tcg cag				1776
Gly Thr Gly Ala Gly Phe Val Trp Lys Ser Tyr Glu Thr Met Ser Gln				
	580	585	590	
ttc tcc ttc cgc aac cag tgt ctg gtc gcc gcc gac tgg ctg cgc acc				1824
Phe Ser Phe Arg Asn Gln Cys Leu Val Ala Ala Asp Trp Leu Arg Thr				
	595	600	605	
aag atc ttt ggc cgc gac atc tcg cga gtg tga				1857
Lys Ile Phe Gly Arg Asp Ile Ser Arg Val				
	610	615		
<210>	4			
<211>	618			
<212>	PRT			
5 <213>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			
<400>	4			

ES 2 535 981 T3

Met	Asn	Met	Leu	Leu	Gln	Gln	Gln	Lys	Leu	Ala	Ala	Gly	Cys	Lys	Gln
1				5					10					15	
Arg	Ser	Val	Ala	Gln	Pro	Ser	Arg	Gly	Cys	Val	Ala	Ala	His	Thr	Gly
			20					25					30		
Leu	Arg	Ser	Gly	Arg	Val	Ala	Ser	Arg	Gln	Arg	Ser	Val	Thr	Thr	Ala
		35					40					45			
Val	Met	Thr	Pro	Pro	Ala	Lys	Ser	Glu	Ser	Ser	Ser	Pro	Val	Tyr	Thr
	50					55					60				
Thr	Met	Ser	Leu	Asp	Gly	Gln	Asn	Leu	Lys	Thr	Ala	Lys	Pro	Arg	Leu
65					70					75					80
Val	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Trp	Gly	Ala	Met	Ser	Phe	Leu	Lys	Ala	Leu
				85					90					95	
Pro	Thr	Ser	Ile	Ser	Ser	Thr	Tyr	Glu	Leu	Ile	Val	Val	Ser	Pro	Arg
			100					105					110		
Asn	Tyr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Pro	Leu	Leu	Pro	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Thr
		115					120					125			
Met	Glu	Glu	Arg	Ser	Ile	Val	Glu	Pro	Val	Arg	Asn	Phe	Ile	Val	Gly
	130					135					140				
Lys	Gly	Glu	Phe	Tyr	Glu	Ala	Leu	Cys	Lys	Asp	Ile	Asp	Pro	Val	Ala
145					150					155					160
Lys	Glu	Leu	Val	Cys	Cys	Phe	Pro	Glu	Asp	Ala	Gly	Leu	Asp	Ser	Ala
				165					170					175	
Cys	Phe	Lys	Met	Ser	Tyr	Asp	Val	Leu	Val	Met	Ala	Val	Gly	Ser	Val
			180					185					190		
Asn	Asn	Thr	Phe	Gly	Ile	Lys	Gly	Val	Asp	Gln	Tyr	Cys	Phe	Tyr	Phe
		195					200					205			
Lys	Ser	Ile	Glu	Asp	Ala	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Arg	Val	Ser	Glu	Cys
	210					215					220				
Phe	Glu	Arg	Ala	Ala	Leu	Pro	Ala	Thr	Pro	Glu	Glu	Glu	Arg	Lys	Lys
225					230					235					240
Leu	Leu	Thr	Phe	Val	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Thr	Gly	Val	Glu	Val
				245					250					255	
Ala	Ala	Glu	Leu	Tyr	Asp	Met	Ile	Glu	Glu	Asp	Leu	Ser	Lys	Leu	Tyr

ES 2 535 981 T3

			260					265				270			
Pro	Asn	Leu	Val	Lys	Asp	Val	Ser	Ile	Gln	Val	Val	Glu	Leu	Met	Asp
			275					280				285			
His	Val	Leu	Ser	Thr	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ile	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ala	Glu
			290					295				300			
Gln	Phe	Lys	Arg	Ala	Gly	Ile	Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Arg	Val	Ala
305					310						315				320
Ser	Val	Glu	Asp	Gly	Val	Val	Arg	Val	Val	Asn	Lys	Ala	Asn	Glu	Ser
				325							330				335
Val	Asp	Ile	Lys	Phe	Gly	Ala	Cys	Val	Trp	Ala	Thr	Gly	Ile	Ala	Met
			340						345						350
Asn	Pro	Leu	Val	Arg	Gln	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Pro	Gly	Gln	Ser	His
			355					360					365		
Phe	Arg	Ser	Val	Leu	Thr	Asp	Asp	Cys	Met	Arg	Val	Lys	Gly	Ser	Asp
			370			375						380			
Gly	Ser	Ile	Trp	Ala	Leu	Gly	Asp	Ala	Ala	Thr	Ile	Asp	Gln	Pro	Lys
385					390						395				400
Ala	Leu	Asp	Tyr	Ala	Glu	Gln	Leu	Phe	Glu	Gln	Ala	Asp	Thr	Asn	Arg
				405						410					415
Asp	Gly	Arg	Leu	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Ala
			420						425						430
Ser	Lys	Glu	Phe	Ser	His	Leu	Glu	Glu	His	Ala	Arg	Phe	Leu	Asp	Ser
			435				440					445			
Gln	Thr	Gly	Val	Lys	Arg	Phe	Gly	Gly	Leu	Val	Ala	Lys	Ser	Leu	Ser
			450			455						460			
Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser	Gln	Pro	Phe
465					470						475				480
Ala	Val	Leu	Leu	Asp	Gly	Asn	Thr	Glu	Ile	Ser	Lys	Glu	Gln	Phe	Lys
				485							490				495
Asp	Ile	Leu	Gly	Lys	Val	Asp	Lys	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Pro	Ala	Thr
			500					505							510
Ala	Gln	Val	Ala	Asn	Gln	Gln	Gly	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Val	Phe	Ala
			515				520						525		
Gly	Asn	Arg	Val	Thr	Gly	Ala	Pro	Glu	Leu	Asp	Ala	Ala	Leu	Ala	Asp
			530			535					540				
Lys	Ile	Lys	Pro	Phe	Arg	Tyr	Phe	His	Lys	Gly	Ser	Ala	Ala	Tyr	Val
545					550					555					560
Gly	Ser	Asp	Lys	Ala	Val	Phe	Asp	Leu	Pro	Lys	Phe	Gly	Pro	Leu	Thr
				565						570					575
Gly	Thr	Gly	Ala	Gly	Phe	Val	Trp	Lys	Ser	Tyr	Glu	Thr	Met	Ser	Gln
			580					585							590
Phe	Ser	Phe	Arg	Asn	Gln	Cys	Leu	Val	Ala	Ala	Asp	Trp	Leu	Arg	Thr
			595				600						605		
Lys	Ile	Phe	Gly	Arg	Asp	Ile	Ser	Arg	Val						
			610			615									

- <210> 5
- <211> 27
- <212> ADN
- 5 <213> Artificial
- <220>
- <223> N2Ag.mfe.F
- <400> 5

cgccaattga tgcaagaaca tcatgtt 27

<210> 6

<211> 48

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> N2Ag.6His.PstR

<400> 6

aaaactgcag tcaatgatga tgatgatgat gggcctcgtc cttcagcg 48

10 <210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> PSD80.F

<400> 7

gagctgttga caattaat 18

<210> 8

<211> 18

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> PSD80.R

<400> 8

25 **aggacgggtc acacgcgc 18**

<210> 9

<211> 17

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> N2Ag.307.F

<400> 9

tggccaccgg cgcgct 17

<210> 10

35 <211> 18

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> N2Ag.650.f
 5 <400> 10
 tgccaaggaa gcgcttga **18**
 <210> 11
 <211> 17
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> N2Ag.901.R
 <400> 11
 ttcctgattg accgcgg **17**
 15 <210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> ndhAgTu.F
 <400> 12
 tccccggga tgcaagaaca tcatgtt **27**
 <210> 13
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ndhAgTu.R
 <400> 13
 30 **ccgcaattgt caggcctcgt ccttcag** **27**
 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> N2Ag.Ncol

<400> 14
atggaagaac atcatgttg cgtc 24
 <210> 15
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> N2Ag.Xbal
 <400> 15
 10 **ccgtctagat caggcctcgt ccttcagcgt** 30
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> N2Ag.E203Q.R
 <400> 16
agggccggcc tgcacaagca a 21
 <210> 17
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> N2Ag.E203Q.F
 25 <400> 17
ttgcttgtc aggccggccc t 21
 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> N2Cr2.F
 <400> 18
atgcatagcc ttgatggcca aaac 24
 35 <210> 19

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> N2Cr2.R
 <400> 19
tcacactcgc gagatgctgc g 21
 <210> 20
 <211> 50
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> F-EcoRI
 <400> 20
 15 **cggaattcat gcatcatcat catcatcatc atagccttga tggccaaaac 50**
 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> R-SmaI
 <400> 21
tccccgggt cacactcgcg agatgctgcg 30
 <210> 22
 25 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> N2Ag.XhoI
 30 <400> 22
cggtcgcgaga tggccgccgt cattgccaag 30
 <210> 23
 <211> 48
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> TP.ndh.R
 <400> 23
gacgacaaca tgatgttctt gcatctgggt ggctgagcc ggggcagc 48
 <210> 24
 5 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> TP.ndh.F
 10 <400> 24
gctgccccgg ctcaggccaa ccagatgcaa gaacatcatg ttgtcgtc 48
 <210> 25
 <211> 48
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> rbcS2.3'.R
 <400> 25
gctcagatca acgagcgctt ccattcaggc ctgctccttc agcgtctc 48
 20 <210> 26
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> rbcS2.3'.F
 <400> 26
gagacgctga aggacgaggc ctgaatggag gcgctcgttg atctgagc 48
 <210> 27
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> N2Ag.Kpnl
 <400> 27
 35 **cggggatcccc tgcaaagtct gtctcca 27**

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para incrementar la capacidad de un alga verde de producir hidrógeno, **caracterizado porque** comprende la transformación de dicha alga por un polinucleótido que codifica una NAD(P)H deshidrogenasa de tipo II (NDH-II), y la expresión de dicha NDH-II en dicha alga, en el que dicha NDH-II:
- presenta al menos un ejemplar del motivo de consenso GxGxxG en que "G" representa una glicina y "x" representa un aminoácido cualquiera,
 - tiene la capacidad de catalizar la reducción de quinonas de las cadenas de transferencia de electrones mediante la oxidación de NADH o NDPH usando un cofactor flavínico, y
 - 10 - es, en su forma activa, un monómero de 30 a 60 kDa o un homodímero.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicha NDH-II es una NDH-II mutante obtenida a partir de una NDH-II que usa preferiblemente NADH, mediante sustitución del residuo glutamato o aspartato situado al final de la segunda lámina β del motivo β - α - β de enlace de nucleótidos piridínicos por un residuo polar neutro.
- 20 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** dicha NDH-II se elige entre:
- la NDH-II Agtundh2 de *Agrobacterium tumefaciens*, definida por la secuencia SEQ ID NO : 2, o una NDH-II mutante obtenida a partir de Agtundh2 por sustitución del residuo de glutamato en posición 201 de la secuencia SEQ ID NO: 2 por un residuo de glutamina;
 - la NDH-II N2Cr2 de *Chlamydomonas reinhardtii*, definida por la secuencia SEQ ID NO: 4, o por un fragmento de la misma que comprende los aminoácidos 67-619 de la secuencia SEQ ID NO: 4, o una NDH-II mutante obtenida a partir de N2Cr2 por sustitución del residuo de glutamato en posición 285 de la secuencia SEQ ID NO: 4 por un residuo de glutamina.
- 25 4. Alga verde transformada por un nucleótido que codifica una NDH-II tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Uso de un alga verde según la reivindicación 4 para la producción de hidrógeno.

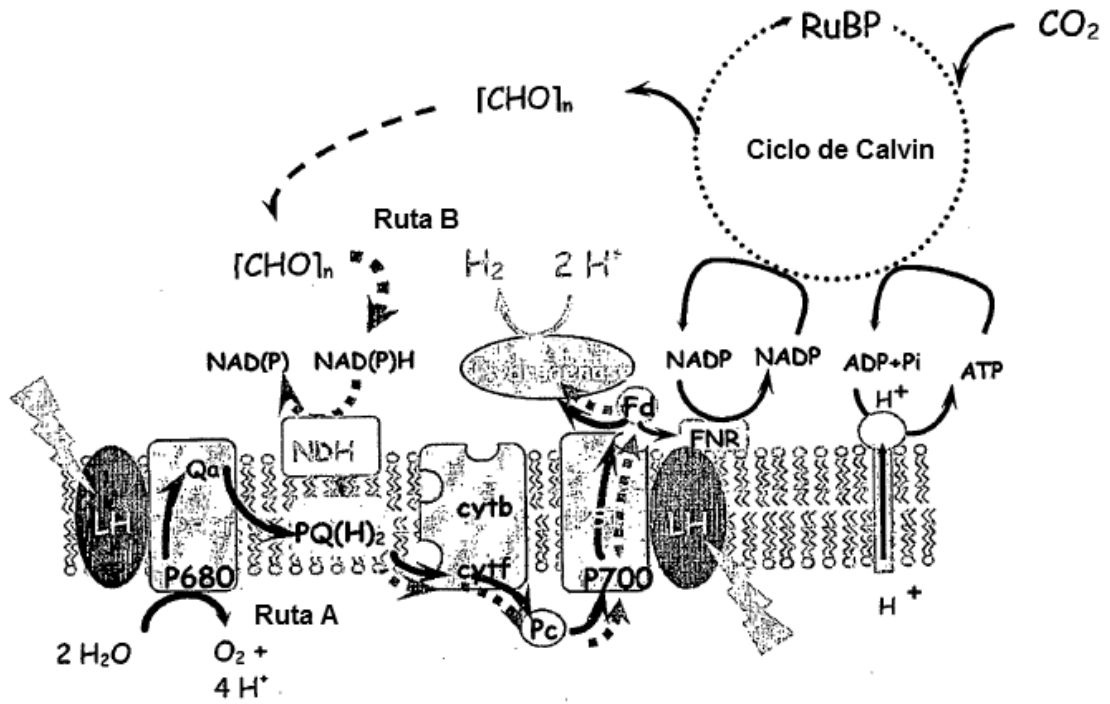


FIG. 1

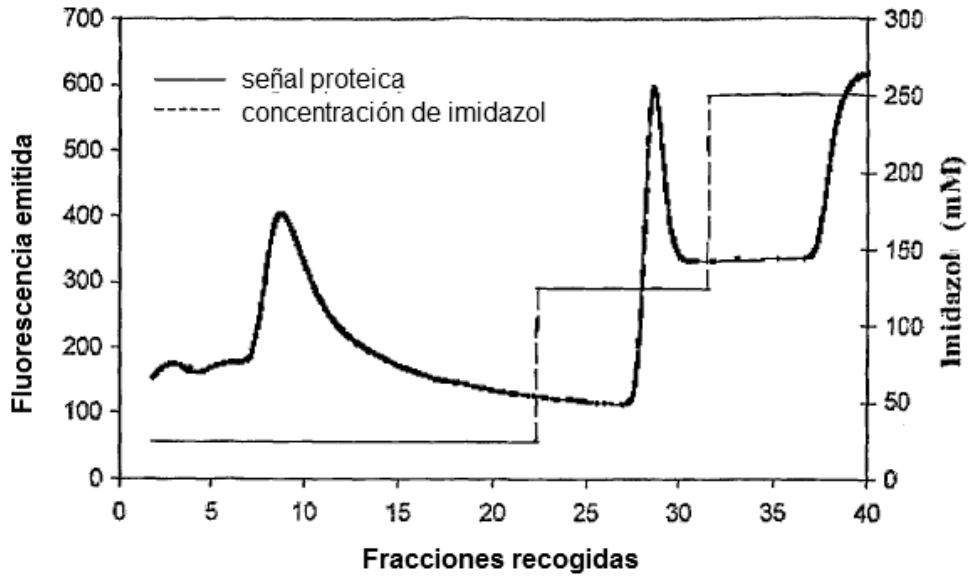
NC-NDI1	(EAA27430)	ANLLHFAIVGGGPTGIEYASELHDLIHDDLSKMYP-DLLKFVRITVYDVSPKVL
N2Cr2		KKLLTFVVVGGGPTGVEVAEELYDMIEEDLSKLYP-NLVKDVSIQVMSLMDHVLS
ST-NDB1	(CAB52797)	RTNLHFVIVGGGPTGVEFAAELHDVYVEDLVKIYP-SVKDFVKITVIQSGDHILN
SC-NDE1	(NP_013865)	ARLLSFVVVGGGPTGVEFAAELRDYVDQLRKKWMP-ELSKKEIKVTLVEALPNILN
SC-NDE2	(NP_010198)	KRLLTFVVVGGGPTGVEFAAELQDYINQDLRKKWMP-DLSKEMKVILLALPNILN
YL-NDH2	(XP_505856)	KRLLHTVVVGGGPTGVEFAAELQDFEEDDLRKKWIP-DIRDDFKVTLVEALPNVLP
SC-NDI1	(NP_013586)	RRLLSIVVVGGGPTGVEAAGELQDYVHQDLRKFLLP-ALAEVQIHLVEALPIVLN
NC-NDE1	(CAB41986)	KRLLSFVCCGGGPTGVEFAAELFDLLNEDLTLHFPRLLRNEISVHLIQSRDHILN
ATUNDH2	(AI2824)	QALLTFVVIIGAGPTGVEMAGMIAELAHRALPAEFRNVDTRKTRVLLVEAGPRVLP
EC-NDH	(NP_415627)	NGKVNIAIVGGGATGVELSAELHNAVQLHSYGYKGLTNEALNVTLVEAGERILP
Slr1743	(BAÅ17783)	AEKIRIAIVGGGYSGVELAAKLGDRL-----GERG-----RIRIIEGKEILLAM

-----ΦΔ-Δ-G-G--G---Δ--Δ-----Δ-Δ-#
beta alfa beta

consenso

FIG. 2

A



B

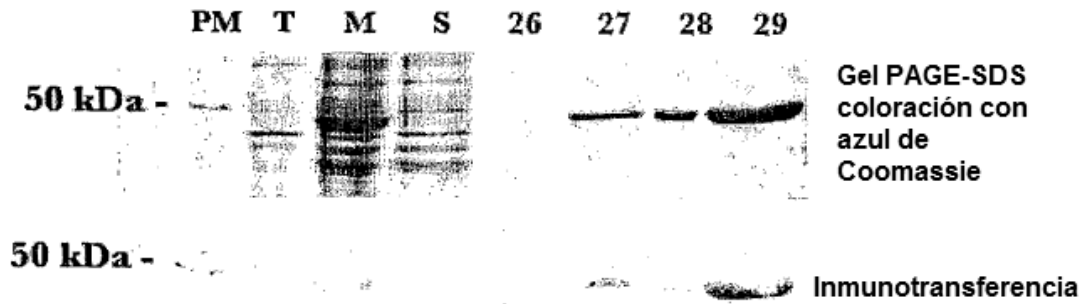


FIG. 3

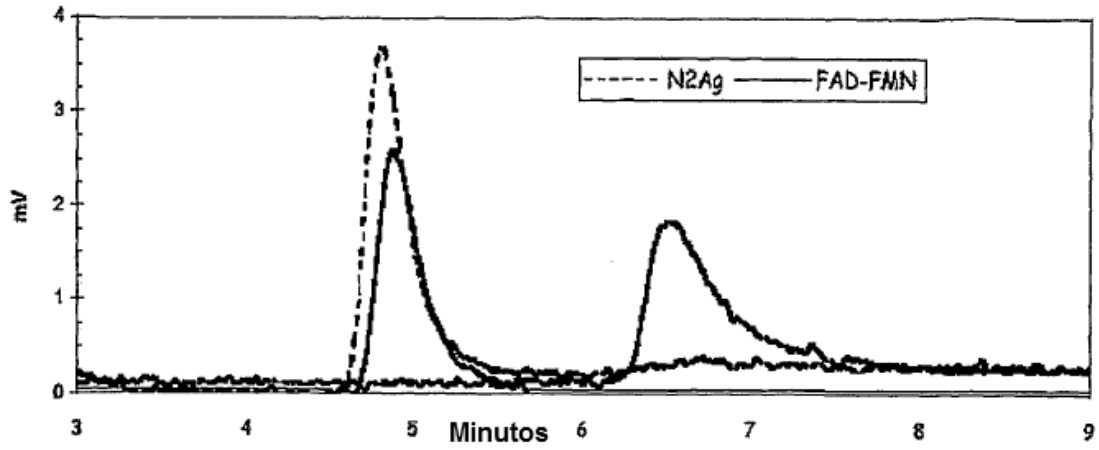


FIG. 4

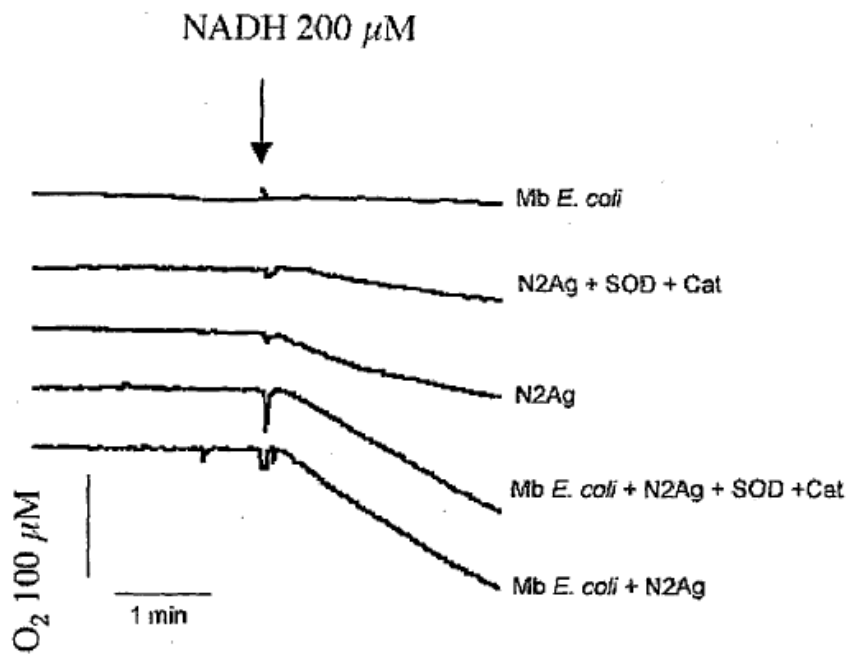


FIG. 5

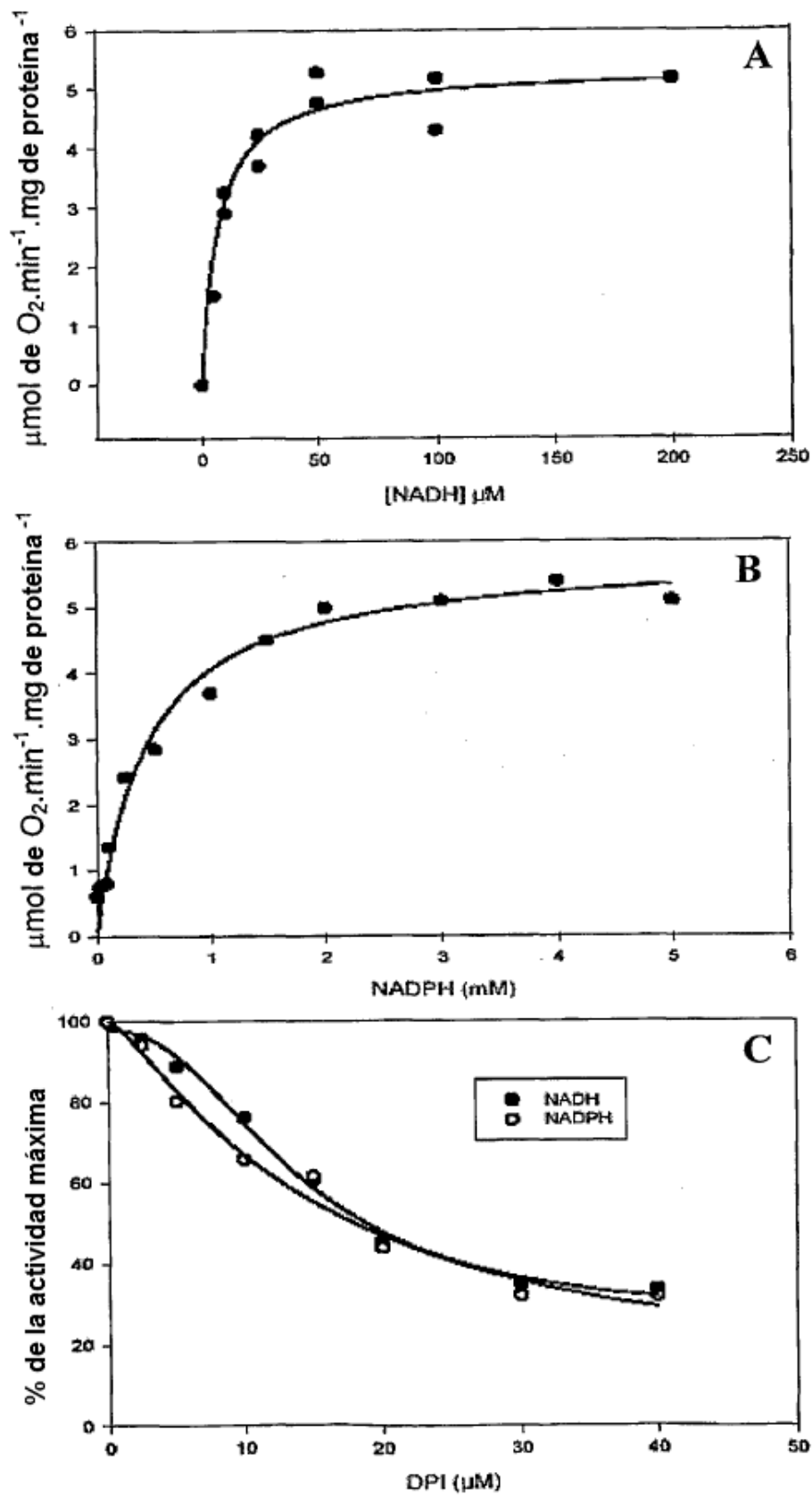


FIG. 6

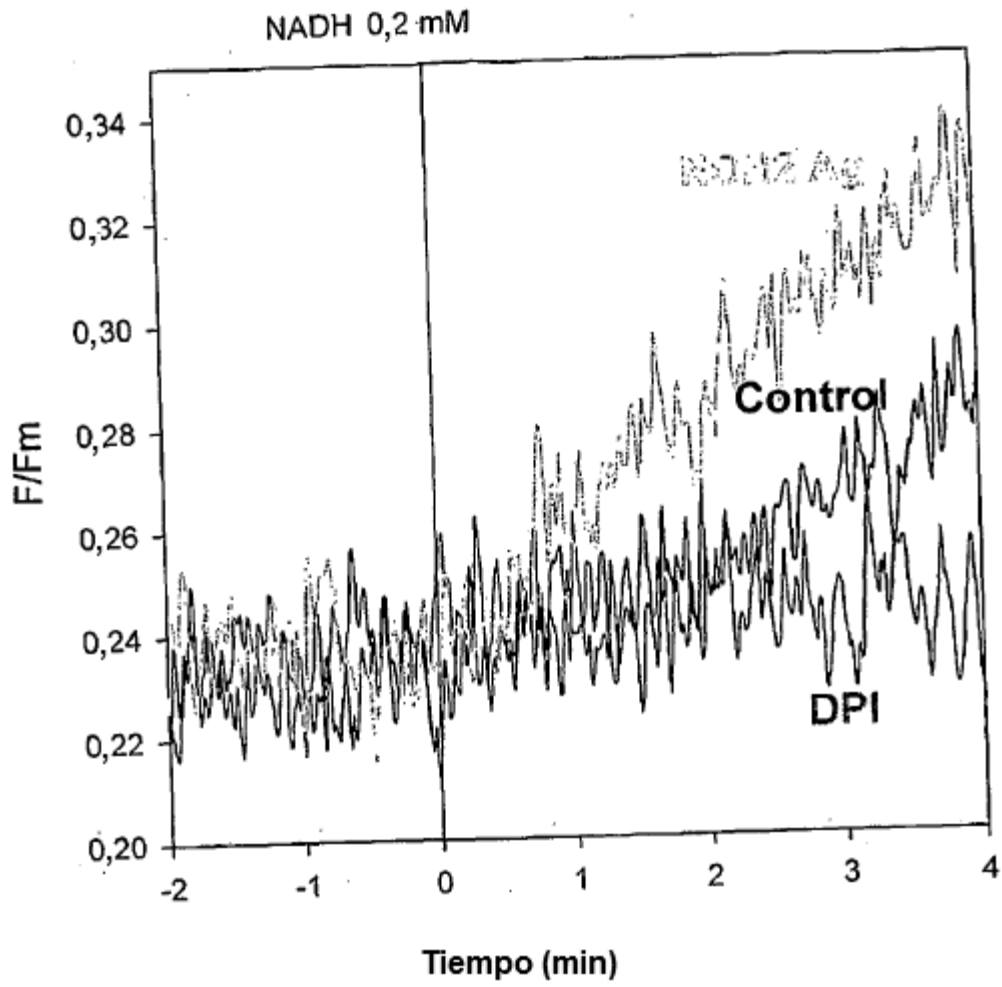


FIG. 7

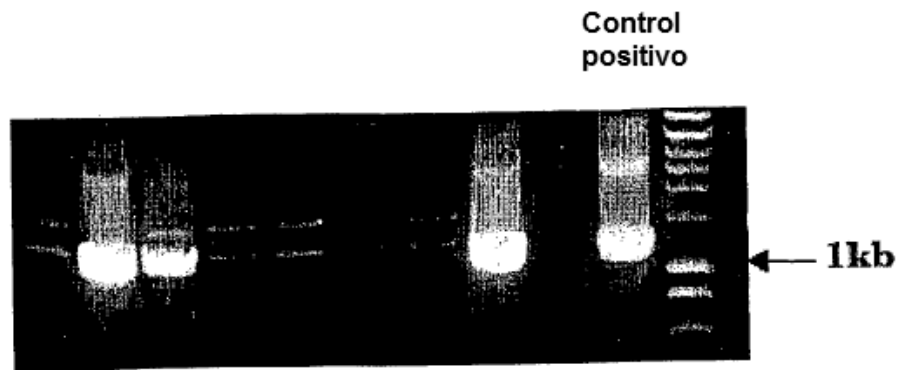


FIG. 8

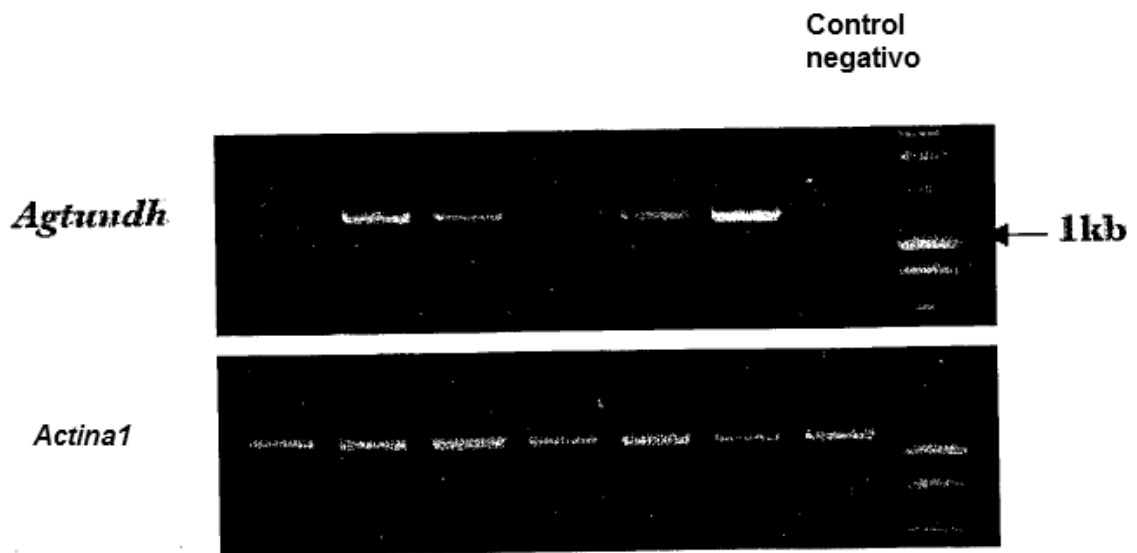
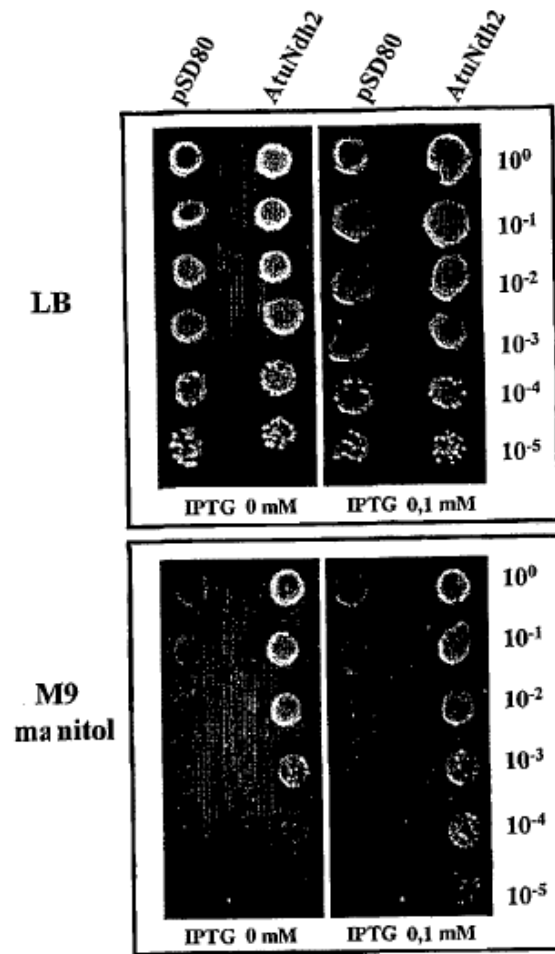


FIG. 9

A



B

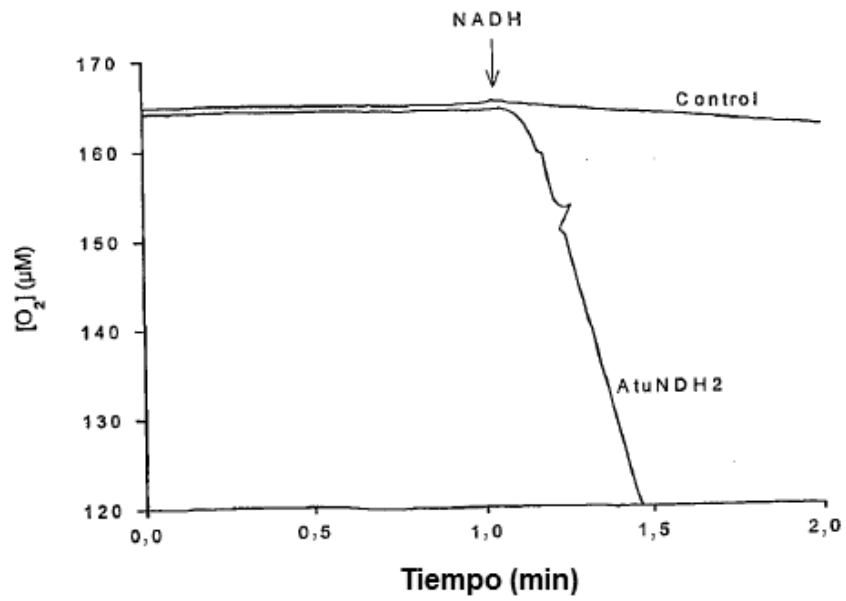


FIG 10

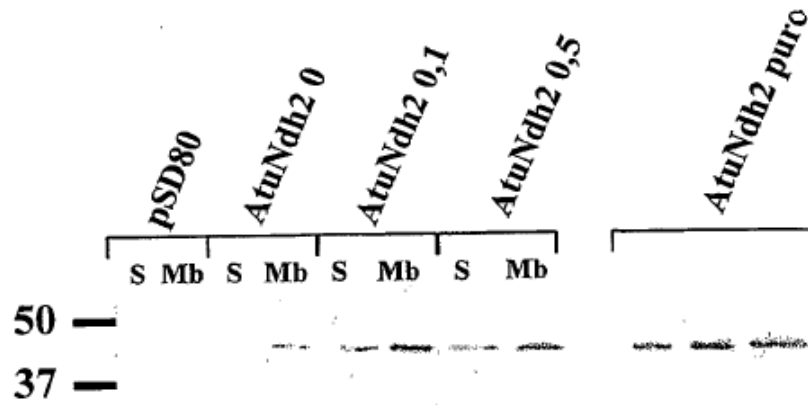


FIG 11

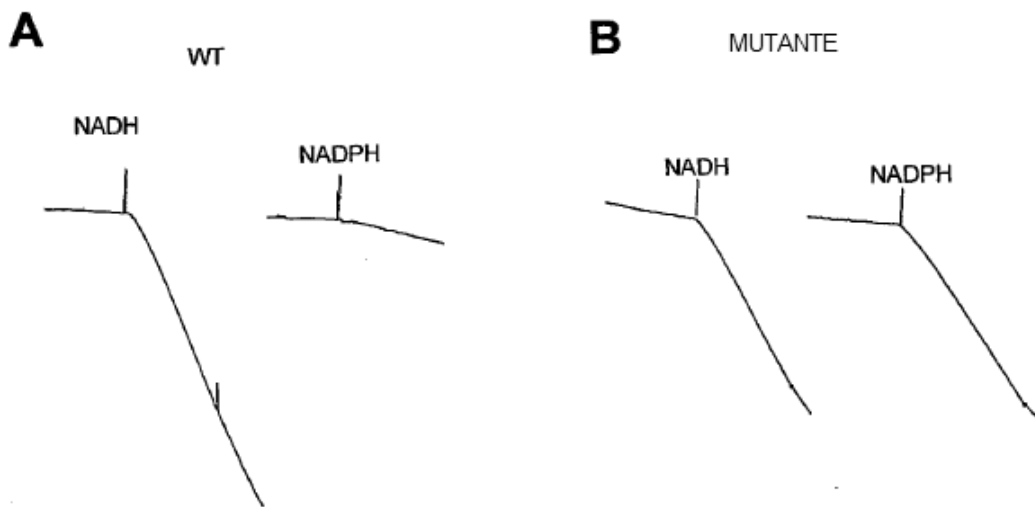


FIG 12

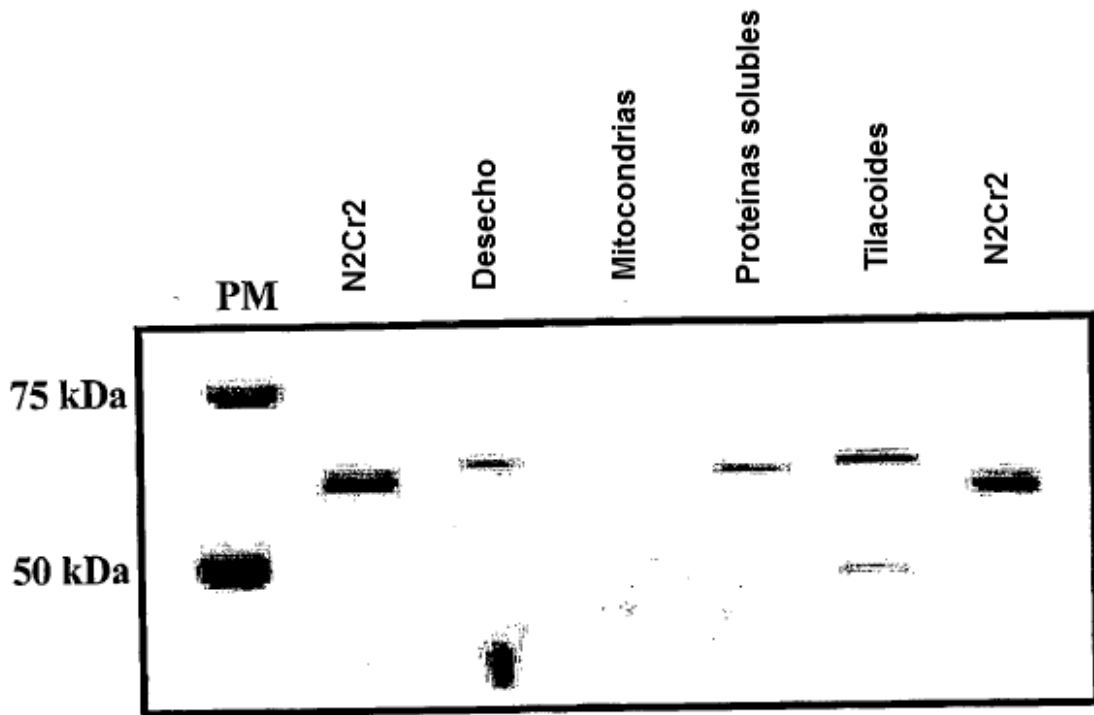


FIG 13