

el Dpto. Bioquímica Vegetal  
y Biología Molecular  
Facultad de Biología

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

11-Julio-1996  
07-09-1996

23 Septiembre de 1996

163

39

Dpto de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

**ESTUDIO DE LAS GLUTAMATO SINTASAS DE LA  
CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp. PCC 6803**

*Alena Raffi*

R. 13879

TD/288



Trabajo presentado para optar al grado de  
Doctor en Biología por el licenciado  
**Francisco N. Navarro Gómez**

Sevilla, Septiembre de 1996

Director:

**Dr. F. Javier Florencio**  
Prof. Titular de Bioquímica  
y Biología Molecular

Director:

Pedro Candau Chacón

**Dr. Pedro Candau**  
Prof. Titular de Bioquímica  
y Biología Molecular

TD  
350

TD. 350



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral ESTUDIO DE LAS  
GLUTAMATO SINTASAS DE LA CIANO-  
BACTERIA *Synechocystis* sp. PCC 6803  
sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos. SOLICITAR PERMISO  
DIRECTOR DE TESIS

Firmado: Fco Navarro Gómez

Sevilla, a 3 de octubre de 1996

*A Eva, por su apoyo constante*

*A mi familia*

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla, del cual es director el Dr. Miguel García Guerrero y con la concesión de una beca de la Fundación Cámara-Universidad de Sevilla.

Mi agradecimiento a los doctores Javier Florencio y Pedro Candau por la dirección de esta tesis. Su continua colaboración, la constante aportación de ideas y la discusión de los resultados ha sido esencial en la realización de este trabajo. Les agradezco sinceramente su amistad, su confianza y su continuo estímulo durante todo este tiempo.

A mis compañeros de trabajo: José Luis Crespo (gracias por soportar los últimos agobios y por tu impagable ayuda), Mario García y especialmente a Eugenio Martín que ha colaborado en la obtención de algunos de los resultados; a Maribel Muro y a José Carlos Reyes, por cuanto hemos compartido y me han ayudado durante estos años.

Mi sincero y cariñoso agradecimiento a Ana Peciña, Jesús de la Cruz y Mari Cruz Muñoz, por soportar los buenos y malos momentos, por su amistad y por regalarme tan buenos recuerdos.

A José Enrique, Federico, Mari Luz, Blanca, Rosario, Berta, María José y Alberto, así como a las ya doctoras Alicia Muro y Belén Floriano por aguantar mis discursos y por su amistad y al resto de los compañeros del departamento.

A los doctores Agustín Vioque, Manolo Hervás y Pepe Navarro, por su continua y desinteresada ayuda.

Al doctor Herbert Böhme, director del Instituto Botánico de Bonn, con cuyo grupo se ha realizado una colaboración de trabajo, algunos de cuyos resultados se presentan en esta tesis. Especialmente a Stefan Schmitz, por su amistad y por soportarme en el trabajo, tanto en Sevilla como en Bonn. A Carol Kutzki y al resto de compañeros del Instituto, que tan amigablemente me acogieron.

Al doctor Pierre Sétiff, del Departamento de Biología Celular y Molecular, C.E.A., Saclay, Francia, por la realización de los espectro de EPR que se muestran en este trabajo.

A Antonia, Pepa, Nela y Reyes por su magnífica labor siempre que las he necesitado y por su trato cordial.

A todos, gracias.

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	7
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	11
<b>ABREVIATURAS</b>	12
<b>SECUENCIAS DE GLUTAMATO SINTASAS USADAS EN ESTE TRABAJO Y NÚMEROS DE ACCESO.</b>	14
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	15
<b>1.1. LAS CIANOBACTERIAS</b>	17
1.1.1. Características generales de las cianobacterias.	17
1.1.2. Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias	18
<b>1.2. GLUTAMATO SINTASAS</b>	23
<b>1.3. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO</b>	27
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	31
<b>2.1.1. Cianobacterias</b>	31
2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas.	31
2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo de cianobacterias.	32
<b>2.1.2. <i>Escherichia coli</i></b>	34
2.1.2.1. Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.	34
2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo de <i>Escherichia coli</i> .	35
2.1.2.3. Obtención de células de partida para la purificación de proteínas.	36
<b>2.1.3. Métodos de recogida de células</b>	37
<b>2.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS</b>	37
<b>2.2.1. Determinación de la actividad glutamato sintasa</b>	37
2.2.1.1. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad glutamato sintasa.	37
2.2.1.2. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad glutamato sintasa usando piridín nucleótidos como donadores de electrones.	37
2.2.1.3. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad glutamato sintasa usando ferredoxina NADP <sup>+</sup> -óxidoreductasa (FNR).	38
2.2.1.4. Ensayo <i>in situ</i> de la actividad glutamato sintasa.	38
<b>2.2.2. Determinación de la actividad glutamina sintetasa</b>	38
2.2.2.1. Ensayo de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa.	38
<b>2.3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS</b>	39
<b>2.3.1. Preparación de extractos celulares</b>	39
2.3.1.1. Rotura por ultrasonidos.	39
2.3.1.2. Rotura con nitrógeno líquido.	40
2.3.1.3. Rotura con perlas de vidrio.	40
<b>2.3.10. Determinación de la secuencia NH<sub>2</sub>-terminal de GltS de <i>Synechocystis</i> expresada en <i>E. coli</i></b>	47
<b>2.3.11. Técnicas espectroscópicas</b>	48
2.3.11.1. Determinación de los espectros de absorción de GltS de <i>Synechocystis</i> 6803 expresada en <i>E. coli</i> .	48
2.3.11.2. Espectroscopía de resonancia paramagnética del electrón (EPR).	48
2.3.11.3. Medidas potenciométricas.	48
<b>2.3.12. Análisis de flavinas.</b>	49
2.3.12.1. Extracción de flavinas por incubación a 100 °C.	49
2.3.12.2. Extracción de flavinas por hidrólisis con TCA en frío.	49
2.3.12.3. Análisis de flavina por HPLC.	49
<b>2.3.2. Purificación de la ferredoxina de <i>Synechocystis</i> 6803 expresada en <i>Escherichia coli</i></b>	41

2.3.2.1. Primera cromatografía de intercambio iónico.	41
2.3.2.2. Precipitación mediante sulfato amónico.	42
2.3.2.3. Segunda cromatografía de intercambio iónico	42
<b>2.3.3. Preparación de geles de ferredoxina Sefarosa</b>	42
<b>2.3.4. Técnicas cromatográficas usadas en la purificación de la ferredoxina glutamato sintasa, GltS.</b>	43
2.3.4.1. Cromatografía de intercambio iónico.	43
2.3.4.2. Cromatografía de filtración en gel Ultrogel AcA34.	43
2.3.4.3. Cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.	43
2.3.4.4. Cromatografía de filtración en gel NovaPacK S300.	43
<b>2.3.5. Electroforesis de proteínas</b>	44
2.3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.	44
<b>2.3.6. Técnicas inmunológicas</b>	45
2.3.6.1. Obtención de antisuero de conejo anti-Fd-GOGAT, GltS, de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	45
2.3.6.2. Inmunodetección de GOGAT en geles de poliacrilamida (Western blot).	45
<b>2.3.7. Concentración de proteínas por ultrafiltración</b>	46
<b>2.3.8. Cambio de tampón y eliminación de sales y moléculas pequeñas de preparaciones de proteínas y DNA</b>	46
<b>2.3.9. Formación de complejos entre la Fd-GOGAT, GltS, de <i>Synechocystis</i> expresada en <i>E. coli</i> y distintos transportadores de electrones</b>	47
<b>2.4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA Y RNA</b>	50
<b>2.4.1. Plásmidos utilizados</b>	50
<b>2.4.2. Aislamiento y análisis de DNA</b>	52
2.4.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .	52
2.4.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias.	52
2.4.2.3. Amplificación de fragmentos de DNA de <i>Synechocystis</i> 6803 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	53
2.4.2.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	53
2.4.2.5. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa.	54
2.4.2.6. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación con sondas radiactivas ( <i>Southern blot</i> ).	54
2.4.2.7. Manipulaciones enzimáticas del DNA.	55
<b>2.4.3. Aislamiento y análisis de RNA total de <i>Synechocystis</i> 6803</b>	56
2.4.3.1. Aislamiento de RNA total de <i>Synechocystis</i> 6803.	56
2.4.3.1.1. Extracción de RNA con fenol caliente.	56
2.4.3.1.2. Extracción de RNA con perlas de vidrio.	56
2.4.3.2. Detección de RNAm mediante hibridación con sondas de DNA radiactivas ( <i>Northern blot</i> ).	57
<b>2.4.4. Amplificación de DNA a partir de RNA total de <i>Synechocystis</i> 6803 (RT-PCR)</b>	58
2.4.4.1. Obtención de cDNA utilizando RNA total de <i>Synechocystis</i> 6803.	58
2.4.4.2. Amplificación de DNA, utilizando cDNA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
<b>2.4.5. Secuenciación de DNA</b>	59
2.4.5.1. Obtención de delecciones seriadas de fragmentos de DNA mediante digestión con exonucleasa III.	59
2.4.5.2. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea-poliacrilamida.	59

<b>2.5. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA</b>	60
2.5.1. Obtención de células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	60
2.5.2. Transformación de <i>Synechocystis</i> 6803	61
<b>2.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL GEN <i>gltS</i> DE <i>Synechocystis</i> 6803</b>	62
2.6.1. Hibridación de los oligonucleótidos al plásmido y síntesis de la cadena de DNA mutada.	62
2.6.2. Primera ronda de selección	63
2.6.3. Segunda ronda de selección	63
2.6.4. Obtención e identificación de mutantes.	63
<b>2.7. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	64
2.7.1. Determinación de la concentración interna de aspártico, glutámico y glutamina en células de <i>Synechocystis</i> 6803	64
2.7.2. Separación y determinación de aspártico glutámico y glutamina mediante HPLC	64
2.7.3. Determinación de clorofila	65
2.7.4. Determinación de la cantidad de proteína	65
2.7.5. Determinación de $\gamma$ -glutamihidroxamato	65
2.7.6. Determinación de amonio	66
2.7.7. Cuantificación de DNA y RNA	66
2.7.8. Determinaciones espectrofotométricas	66
<b>2.8. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEÍNAS</b>	66
<b>3. RESULTADOS</b>	69
<b>3.1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LAS Fd-GOGATs (<i>gltB</i> Y <i>gltS</i>) DE <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803</b>	71
3.1.1. Obtención por PCR de un fragmento de ADN interno a los genes de glutamato sintasas de <i>Synechocystis</i>	71
3.1.2. Detección de hibridación homóloga entre la sonda amplificada por PCR y el ADN genómico de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	73
3.1.3. Clonación de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> de <i>Synechocystis</i> 6803.	74
3.1.4. Secuenciación y análisis de los insertos de pFN5 y pFN7 que contienen los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> .	78
3.1.4.1. Secuencia del gen <i>gltB</i> .	79
<b>3.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS GENES <i>gltB</i> Y <i>gltS</i> DE <i>Synechocystis</i>. COMPARACIÓN CON OTRAS GLUTAMATO SINTASAS</b>	83
3.2.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de glutamato sintasas.	83
3.2.2. Dominio glutamina amido transferasa de las glutamato sintasas.	88
3.2.3. Sitio de maduración de las glutamato sintasas.	88
3.2.4. Sitio de unión de FMN de las glutamato sintasas.	89
3.2.5. Sitio de unión del centro sulfoférico de las glutamato sintasas.	90
3.2.6. Otros dominios de las glutamato sintasas.	91
3.2.7. Análisis de distancias evolutivas entre las glutamato sintasas	92
3.2.8. Análisis comparativo entre los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> de <i>Synechocystis</i> 6803.	94

3.2.9. Análisis de la existencia de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> en diferentes estirpes de cianobacterias.	94
3.3. GENERACIÓN DE MUTANTES SIMPLES DE LOS GENES <i>gltB</i> y <i>gltS</i> de <i>Synechocystis</i> 6803.	95
3.3.1. Construcción de plásmidos con versiones inactivadas de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> . Transferencia a <i>Synechocystis</i> por transformación.	95
3.3.2. Análisis de la estructura cromosómica de las estirpes mutantes obtenidas.	97
3.3.3. Análisis de la actividad GOGAT de las estirpes mutantes obtenidas.	97
3.3.4. Identificación de las GOGATs, GltB y GltS, en <i>Synechocystis</i> 6803.	98
3.4. GENERACIÓN DE MUTANTES DOBLES DE LOS GENES <i>gltB</i> Y <i>gltS</i> DE <i>Synechocystis</i> 6803.	99
3.5 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES Y DE LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD Fd-GOGAT DE <i>Synechocystis</i> 6803 Y DE LAS ESTIRPES MUTANTES.	102
3.5.1. Crecimiento de <i>Synechocystis</i> 6803 y de las estirpes mutantes de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> .	102
3.5.2. Niveles de actividad Fd-GOGAT y glutamina sintetasa de <i>Synechocystis</i> 6803 a lo largo del crecimiento en diferentes condiciones de cultivo.	103
3.5.3. Influencia de la ausencia de fuente nitrogenada sobre la actividad Fd-GOGAT y GS en las estirpes silvestre, SFN1+ y SFN2+ de <i>Synechocystis</i> 6803.	105
3.5.4. Niveles intracelulares de aminoácidos y de actividad GS transferasa tras la adición de amonio en <i>Synechocystis</i> 6803 y estirpes mutantes obtenidas en este trabajo.	106
3.5.5. Niveles de actividad GS transferasa en cultivos de <i>Synechocystis</i> 6803 y la estirpe mutante SFN3 a lo largo de la curva de crecimiento en distintas fuentes de nitrógeno.	109
3.5.6. Análisis transcripcional de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i>	110
3.6.1. Construcciones plasmídicas usadas para la expresión de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> en <i>E. coli</i> CLR207 <i>RecA</i> .	112
3.6.2. Transferencia de las distintas construcciones plasmídicas a <i>E. coli</i> CLR207 <i>RecA</i> y determinación de la actividad glutamato sintasa de las proteínas GltB y GltS recombinantes.	113
3.6.3. Identificación del producto de expresión de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> en <i>E. coli</i> .	115
3.6.4. Maduración de GltB y GltS en <i>E. coli</i> .	116
3.7. PURIFICACIÓN DE LA Fd-GOGAT, GltS, DE <i>Synechocystis</i> 6803 EXPRESADA EN <i>E. coli</i> CLR207 <i>RecA</i> .	116
3.7.1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.	117
3.7.2. Filtración en gel Ultrogel AcA 34.	118
3.7.3. Primera cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.	119
3.7.4. Segunda cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina Sefarosa.	120
3.8. PURIFICACIÓN DE LA Fd-GOGAT, GltS, DE <i>Synechocystis</i> 6803.	123



<b>3.9. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS Fd-GOGATs, GltS, DE <i>Synechocystis</i> 6803 NATIVA Y EXPRESADA EN <i>E. coli</i></b>	125
3.9.1. Tamaño y estructura molecular.	125
3.9.2. Constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).	125
3.9.3. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad Fd-GOGAT.	126
3.9.4. Velocidad máxima y número de recambio.	129
3.9.5. Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad Fd-GOGAT.	130
3.9.6. Determinación de la actividad Fd-GOGAT usando ferredoxina NADPH reductasa (FNR).	131
<b>3.10. ANÁLISIS DE GRUPOS PROSTÉTICOS Y ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS DE LA Fd-GOGAT, GLTS, DE <i>Synechocystis</i> 6803 expresada en <i>E. coli</i></b>	132
3.10.1. Espectros de absorción de GltS.	132
3.10.2. Reoxidación con 2-oxoglutarato de GltS reducida con ditionito.	133
3.10.3. Análisis de flavinas.	134
3.10.4. Titulación redox de la glutamato sintasa, GltS, de <i>Synechocystis</i> 6803 expresada en <i>E. coli</i> .	135
3.10.5. Determinación del centro sulfoférico de GltS, mediante espectroscopía de resonancia paramagnética del electrón (EPR).	136
<b>3.11. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE DISTINTOS DONADORES DE ELECTRONES CON GLTS</b>	139
3.11.1. Determinación de la actividad glutamato sintasa de GltS dependiente de ferredoxinas y flavodoxina.	139
3.11.2. Dependencia de la actividad Fd-GOGAT de GltS de la fuerza iónica.	140
3.11.3. Formación de complejos entre GltS de <i>Synechocystis</i> 6803 purificada a partir de <i>E. coli</i> y distintos donadores de electrones.	141
<b>3.12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL CENTRO SULFOFÉRICO DE GltS</b>	143
<b>4. DISCUSIÓN</b>	147
<b>4.1. EXISTENCIA DE DOS GENES PARA Fd-GOGATs (<i>gltB</i> Y <i>gltS</i>) EN <i>Synechocystis</i> 6803</b>	149
<b>4.2. ANÁLISIS DE LOS GENES <i>gltB</i> Y <i>gltS</i> Y DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS CORRESPONDIENTES, GltB Y GltS</b>	150
<b>4.3. GENERACIÓN DE MUTANTES DE LOS GENES <i>gltB</i> Y <i>gltS</i> Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS GLUTAMATO SINTASA DE <i>Synechocystis</i> 6803</b>	154
<b>4.5. EXPRESIÓN DE LAS Fd-GOGATs DE <i>Synechocystis</i> 6803, EN <i>E. coli</i></b>	157
<b>4.6. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS Fd-GOGATs, GltS, DE <i>Synechocystis</i> 6803 NATIVA Y RECOMBINANTE</b>	159
<b>4.7. INTERACCIÓN ENTRE LA Fd-GOGAT, GltS, DE <i>Synechocystis</i> 6803 Y PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRONES</b>	163
<b>4.8. OBTENCIÓN DE MUTANTES DEL CENTRO SULFOFÉRICO</b>	164

<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>167</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>171</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Principales rutas metabólicas de asimilación de nitrógeno y carbono en cianobacterias y su interrelación con el proceso fotosintético.	21
FIGURA 2. Estructura de la agrupación sulfoférrica [3Fe-4S].	25
FIGURA 3. Identificación del DNA obtenido mediante amplificación por PCR.	72
FIGURA 4. Hibridación de DNA total de <i>Synechocystis</i> 6803 con la sonda de 1,2 kb amplificada por PCR.	73
FIGURA 5. Esquema del proceso de clonación de fragmentos de DNA cromosómico mediante construcción de una subgenotecas.	75
FIGURA 6. Mapas de restricción de los insertos de DNA de <i>Synechocystis</i> contenidos en los plásmidos pFN3 y pFN4.	76
FIGURA 7. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los insertos de DNA de <i>Synechocystis</i> contenidos en los plásmidos pFN3 y pFN4.	76
FIGURA 8. Análisis mediante hibridación homóloga de DNA total de <i>Synechocystis</i> , usando como sondas fragmentos internos a los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> .	77
FIGURA 9. Mapas de restricción de los insertos contenidos en los plásmidos pFN5/6 ( <i>gltB</i> ) y pFN7/8 ( <i>gltS</i> ).	78
FIGURA 10. Análisis de las posibles fases de lectura abierta existentes en el fragmento de DNA de <i>Synechocystis</i> 6803 que contiene el gen <i>gltB</i> .	79
FIGURA 11. Secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA de <i>Synechocystis</i> que contiene el gen <i>gltB</i> .	80
FIGURA 12. Análisis de las posibles fases de lectura abierta existentes en el fragmento de DNA de <i>Synechocystis</i> 6803 que contiene el gen <i>gltS</i> .	81
FIGURA 13. Secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA de <i>Synechocystis</i> que contiene el gen <i>gltS</i> .	82
FIGURA 14. Comparación de las secuencias de aminoácidos de glutamato sintasas.	84
FIGURA 15. Comparación de las secuencias de aminoácidos de glutamato sintasas.	87
FIGURA 16. Alineamiento de las secuencias correspondientes a los dominio glutamina amido transferasas de las glutamato sintasas de <i>Synechocystis</i> , GltB y GltS, con la región que	88

	incluye el dominio glutamina amidotransferasa de las glutamina amidotransferasas.	
FIGURA 17.	Alineamiento de las secuencias correspondientes al sitio de maduración de las glutamato sintasas de <i>Synechocystis</i> , GltB y GltS, con las GOGATs disponibles.	89
FIGURA 18.	Alineamiento de las secuencias correspondientes al dominio de unión a FMN de las glutamato sintasas de <i>Synechocystis</i> , GltB y GltS, con las de las GOGATs disponibles y con el flavocitocromo b <sub>2</sub> de <i>S. cerevisiae</i> .	90
FIGURA 19.	Alineamiento de las secuencias correspondientes al sitio de unión del centro 3Fe-4S de las glutamato sintasas de <i>Synechocystis</i> , GltB y GltS, con las secuencias de GOGATs disponibles y otras enzimas con centro [3Fe-4S].	91
FIGURA 20.	Árbol evolutivo de las glutamato sintasas.	93
FIGURA 21.	Detección por hibridación de secuencias homólogas a los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> de <i>Synechocystis</i> 6803 en diferentes cianobacterias.	95
FIGURA 22.	Construcciones de DNA usadas para la inactivación de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> y estructura cromosómica de las estirpes SFN1+/- y SFN2+/- de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	96
FIGURA 23.	Detección de los polipéptidos GOGATs de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, SFN1+ y SFN2+.	99
FIGURA 24.	Estructura cromosómica de los clones transformantes obtenidos a partir de la estirpe SFN1+ y Western blot de las distintas estirpes mutantes obtenidas en este trabajo.	101
FIGURA 25.	Crecimiento de las estirpes silvestre, SFN1+, SFN2+ y SFN3 de <i>Synechocystis</i> .	102
FIGURA 26.	Evolución de la actividad Fd-GOGAT y GS transferasa en células de <i>Synechocystis</i> 6803 cultivadas fotoautotróficamente con amonio o con nitrato como fuente de nitrógeno.	104
FIGURA 27.	Cuantificación mediante Western blot de los niveles de GltS, GSI, GSIII e IDH en células de las estirpes silvestre, SFN1+ y SFN2+ sometidas a hambre de nitrógeno.	106
FIGURA 28.	Efecto de la adición de amonio sobre las concentraciones internas de glutamato, glutamina y aspartato en las estirpes silvestre, SFN1+, SFN2+ y SFN3.	108
FIGURA 29.	Niveles de actividad GS transferasa, a lo largo de la curva de crecimiento, de las estirpes silvestre y SFN3 de <i>Synechocystis</i> 6803 en distintas fuentes de nitrógeno.	110

FIGURA 30. Detección por hibridación de los fragmentos amplificados mediante RT-PCR, usando RNA de las estirpes silvestre, SFN1+ y SFN2+ de <i>Synechocystis</i> 6803.	111
FIGURA 31. Construcciones plasmídicas usadas para la expresión de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> de <i>Synechocystis</i> 6803 en <i>E. coli</i> .	113
FIGURA 32. Identificación de los productos de expresión de los genes <i>gltB</i> y <i>gltS</i> de <i>Synechocystis</i> 6803 en <i>E. coli</i> .	115
FIGURA 33. Secuencia amino terminal de GltS expresada en <i>E. coli</i> .	116
FIGURA 34. Perfil de elución de GltS recombinante en la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.	117
FIGURA 35. Perfil de elución de GltS recombinante en la cromatografía de filtración en gel Ultrogel AcA34.	118
FIGURA 36. Perfil de elución de GltS recombinante en cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.	120
FIGURA 37. Perfil de elución de GltS recombinante en segunda cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.	121
FIGURA 38. Patrones electroforéticos de proteínas de las etapas de la purificación de la GltS recombinante.	122
FIGURA 39. Inactivación térmica de la Fd-GOGAT, GltS recombinante.	127
FIGURA 40. Determinación de la temperatura óptima de ensayo de GltS recombinante.	128
FIGURA 41. Determinación de la energía de activación ( $E_a$ ) de la GltS recombinante.	129
FIGURA 42. Determinación de la actividad Fd-GOGAT de GltS utilizando FNR.	131
FIGURA 43. Espectros de absorción de GltS recombinante.	132
FIGURA 44. Reoxidación de la GltS recombinante, con 2-oxoglutarato.	133
FIGURA 45. Identificación de los componentes flavínicos de GltS recombinante.	135
FIGURA 46. Determinación del potencial redox de la GltS recombinante.	136
FIGURA 47. Espectro de EPR de GltS recombinante, oxidado y reducido.	137
FIGURA 48. Dependencia de la temperatura del espectro de EPR de la GltS recombinante.	138
FIGURA 49. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad Fd-GOGAT de la proteína GltS recombinante.	141
FIGURA 50. Formación de complejos entre GltS y ferredoxinas o flavodoxina.	142
FIGURA 51. Cinética de entrecruzamiento entre GltS y los distintos donadores de electrones.	143

<b>FIGURA 52. Proceso de construcción del plásmido pFN21 utilizado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida.</b>	<b>144</b>
<b>FIGURA 53. Secuenciación de la zona correspondiente a los nucleótidos que codifican la Cys 1173 de GltS.</b>	<b>145</b>
<b>FIGURA 54. Detección de la proteína GltS obtenida por mutagénesis dirigida del centro sulfoférrico.</b>	<b>146</b>
<b>FIGURA 55. Posición relativa de las regiones conservadas entre las glutamato sintasas.</b>	<b>152</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Estirpes silvestres de cianobacterias utilizadas en este trabajo.	31
Tabla 2.- Estirpes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 obtenidas en este trabajo.	32
Tabla 3.- Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	34
Tabla 4.- Estirpes de <i>E. coli</i> generadas en este trabajo.	35
Tabla 5.- Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.	50
Tabla 6.- Plásmidos construidos en este trabajo	51
Tabla 7.- Identidades entre las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas.	92
Tabla 8.- Parámetros deducidos de las secuencias de <i>gltB</i> y <i>gltS</i> .	94
Tabla 9.- Actividad Fd-GOGAT de las estirpes silvestre y mutantes de los genes <i>gltB</i> (SFN1+) y <i>gltS</i> (SFN2+) de <i>Synechocystis</i> 6803.	98
Tabla 10.- Actividad Fd-GOGAT de las estirpes mutantes de los genes <i>gltB</i> (SFN1+) y <i>gltB</i> y <i>gltS</i> (1 y 2) de <i>Synechocystis</i> 6803.	101
Tabla 11.- Influencia de la ausencia de fuente nitrogenada sobre la actividad GS transferasa de las estirpes silvestre y mutantes, SFN1+ y SFN2+ de <i>Synechocystis</i> 6803.	105
Tabla 12.- Actividad glutamato sintasa usando distintos donadores de electrones.	114
Tabla 13.- Purificación de la Fd-GOGAT, GltS, de <i>Synechocystis</i> 6803 expresada en <i>E. coli</i> .	123
Tabla 14.- Purificación parcial de la Fd-GOGAT, GltS, de <i>Synechocystis</i> 6803.	124
Tabla 15.- Constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de las Fd-GOGATs, GltS, nativa y recombinante de <i>Synechocystis</i> 6803.	126
Tabla 16.- Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad Fd-GOGAT de la enzima GltS.	130
Tabla 17.- Actividad GOGAT dependiente de ferredoxinas o flavodoxina.	139

## ABREVIATURAS

Ap	Ampicilina
Ap <sup>r</sup>	Resistencia a la ampicilina
ATCC	Colección Norteamericana de cultivos tipo
ATP	Trifosfato de adenosina
Cm	Cloranfenicol
Cm <sup>r</sup>	Resistencia al cloranfenicol
CoA	Coenzima A
D.O.	Densidad óptica
dCTP	Trifosfato de desoxicitosina
DEAE	Dietilaminoetil
DEPC	dietil pirocarbonato
DON	6-diazo-5-oxo-L-norleucina
DTT	Ditiotreitol
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
etidio	3, 8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
Fd	Ferredoxina
FNR	Ferredoxina NAPH-óxidorreductasa
FPLC	Cromatografía líquida de baja presión
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad terrestre
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	Miles de pares de bases
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
Km	Kanamicina
Km <sup>r</sup>	Resistencia a la kanamicina
min	Minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MSX	L-Metionina-D, L-sulfoximina
MTA	Mezcla de bromuros de alquil-trimetilamonio
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
Nar	Nitrato reductasa
Nir	Nitrito reductasa
OPA	<i>o</i> -Ftaldialdehido
p/p	Relación peso/peso
pb	Pares de bases
pBS	Plásmido pBluescript II SK(+)
PCC	Colección de cultivos del Instituto Pasteur (París)
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo



prot.	Proteína
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
psi	Libra por pulgada cuadrada
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Laurilsulfato sódico
Tc	Tetraciclina
Tc <sup>r</sup>	Resistencia a la tetraciclina
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamina
TES	Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
	Unidad de actividad enzimática
UTEX	Colección de cultivos de la Universidad de Texas.
v/v	Relación volumen/volumen
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

### Bases nitrogenadas

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timina

### Aminoácidos

A	Ala	alanina	L	Leu	leucina
R	Arg	arginina	K	Lys	lisina
N	Asn	asparagina	M	Met	metionina
D	Asp	ácido aspártico	F	Phe	fenilalanina
C	Cys	cisteína	P	Pro	prolina
E	Glu	ácido glutámico	S	Ser	serina
Q	Gln	glutamina	T	Thr	treonina
G	Gly	glicina	W	Trp	triptófano
H	His	histidina	Y	Tyr	tirosina
I	Ile	isoleucina	V	Val	valina

**SECUENCIAS DE GLUTAMATO SINTASAS USADAS EN ESTE TRABAJO Y NÚMEROS DE ACCESO.**

•

<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 ( <i>gltB</i> )	X80485
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 ( <i>gltS</i> )	X92480
<i>Plectonema boryanum</i> ( <i>gltB</i> )	D85230
<i>Plectonema boryanum</i> ( <i>gltS</i> )	D85735
<i>Antithamnion</i> sp.	Z21705
<i>Porphyra purpurea</i>	U38804
Espinaca	U03006
Maíz	J05739
Alfalfa	L01660
<i>S. cerevisiae</i>	X89221
<i>Azospirillum brasilense</i>	L04300
<i>Escherichia coli</i>	M18747

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. LAS CIANOBACTERIAS

### 1.1.1. Características generales de las cianobacterias.

Este grupo de bacterias se caracteriza por llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica similar a la de proclorofitas y plantas superiores (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), siendo su aparato fotosintético muy similar al de cloroplastos, tanto en su aspecto funcional como estructural. Sin embargo, aunque las proclorofitas, consideradas cianobacterias, poseen clorofila b, al igual que los cloroplastos (Burger-Wiersman y Post, 1989; Morden y Golden, 1991), el resto de las cianobacterias carece de ésta, presentando pigmentos antenas alternativos denominados ficobilinas (Sherman *et al.*, 1987), los cuales aparecen también en los cloroplastos de algas rojas (Wolfe *et al.*, 1994).

Desde el punto de vista morfológico, se sitúa a las cianobacterias dentro de las bacterias Gram (-), debido a la existencia en su pared de una membrana externa y una capa de peptidoglicano (Woese, 1987) y se dividen fundamentalmente en 2 grupos, según la clasificación más aceptada (Rippka *et al.*, 1979). Éstos son: unicelulares, secciones I y II, según presenten división por fisión binaria o múltiple, y filamentosas, secciones III, IV y V, según no formen heterocistos (III) o sí, con división en uno (IV) o más planos (V).

En cuanto a su crecimiento, la mayoría de las cianobacterias son autótrofas estrictas, si bien algunas especies son capaces de vivir mixotróficamente (utilizan azúcares como fuente de carbono y energía a la vez que realizan la fotosíntesis), fotoheterotróficamente (utilizan sustratos orgánicos, manteniéndose inhibido el flujo no cíclico electrones), o heterotróficamente (en oscuridad y usando sustratos orgánicos) (Rippka *et al.*, 1979). Como fuente de nitrógeno utilizan nitrato, nitrito y amonio, aunque algunas tienen además, la capacidad de fijar dinitrógeno (Rippka *et al.*, 1979). La nitrogenasa, enzima encargada de esta fijación, es extremadamente sensible al oxígeno, por lo que en algunas cianobacterias existen células especializadas, denominadas heterocistos, donde no se realiza la fotosíntesis oxigénica, al carecer de fotosistema II (Wolk, 1982) y en otras, se produce una separación temporal entre los procesos de fijación de dinitrógeno y de fotosíntesis (Mitsui *et al.*, 1986). La asimilación de estas fuentes nitrogenadas está directamente relacionada con la síntesis de esqueletos carbonados, lo que implica la fijación de CO<sub>2</sub>, fundamentalmente a través del ciclo reductivo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), si bien existe una segunda vía a través de la fosfoenol piruvato carboxilasa (Weathers y Allen, 1978) y posteriormente a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos, el cual es incompleto debido a la carencia de las actividades 2-oxoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa (Pearce *et al.*, 1969;

Stanier y Cohen-Bazire, 1977), teniendo un papel biosintético en la formación de aminoácidos (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Las cianobacterias utilizan la ferredoxina como donador de electrones en múltiples reacciones, tal como la fotoreducción del NADP<sup>+</sup>, reducción de nitrato y nitrito, síntesis de glutamato y otros procesos redox. Esta proteína presenta una masa molecular de aproximadamente 11 kDa y un centro [2Fe-2S] y puede ser sustituida en algunas de sus funciones por flavodoxina (flavoproteína de aproximadamente 22 kDa que contiene FMN), cuya síntesis se induce en condiciones de deficiencia de hierro, como ocurre en la transferencia de electrones desde las membranas fotosintéticas hasta la FNR (Bottin y Lagoutte, 1992; Pueyo y Gómez-Moreno, 1993; Razquín *et al.*, 1994).

Los estudios evolutivos, basados en el análisis de secuencias génicas nucleares y cloroplastídicas de plantas, evidencian un origen cianobacteriano del cloroplasto (Giovannoni *et al.*, 1988; Douglas y Turner, 1991), lo que apoya la teoría endosimbionte (Gray, 1989), aunque el estudio de las distancias evolutivas a partir de secuencias de RNA 16S, ha permitido establecer que de las cinco secciones las II, IV y V son las más homogéneas desde un punto de vista filogenético (Giovannoni *et al.*, 1988).

El organismo utilizado para realizar este trabajo, *Synechocystis* sp. PCC 6803, es una cianobacteria unicelular perteneciente a la sección taxonómica I, que puede crecer en condiciones de fotoautotrofia, mixotrofia, fotoheterotrofia y heterotrofia (Rippka *et al.*, 1979; Anderson y McIntosh, 1991). Esta cianobacteria, al igual que el resto, es poliploide y posee en torno a 12 copias cromosómicas por célula (Labarre *et al.*, 1989), presentando una capacidad natural para ser transformada con DNA foráneo (Gregorieva y Shestakov, 1982), lo que la hace un organismo idóneo para llevar a cabo estudios genéticos y de biología molecular. El genomio de esta cianobacteria está siendo secuenciado en su totalidad (Kotani *et al.*, 1995), lo que permitirá disponer del mapa genético completo y de la secuencia de todos sus genes, herramienta idónea para llevar a cabo estudios encaminados a la clonación y mutagénesis de los mismos y a un análisis completo de la organización génica de un organismo fotosintético.

### **1.1.2. Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias.**

Las cianobacterias utilizan como fuente de nitrógeno nitrato y amonio y algunas especies, urea y determinados aminoácidos (Guerrero y Lara, 1987; Flores y Herrero, 1994; Montesinos *et al.*, 1995), así como dinitrógeno las especies de cianobacterias fijadoras.

La asimilación de las distintas fuentes inorgánicas nitrogenadas ocurre a partir de la forma más reducida, el amonio, el cual es incorporado a los

esqueletos carbonados mediante la acción secuencial de la glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), en la ruta que se conoce abreviadamente como ciclo GS-GOGAT (Meeks *et al.*, 1977; 1978). Este proceso requiere la utilización de 2-oxoglutarato, sintetizado por la acción de la isocitrato deshidrogenasa (IDH), así como ATP y dos equivalentes de poder reductor aportados por la ferredoxina reducida. Este reductor es necesario también para las actividades nitrato (2 electrones) y nitrito reductasa (6 electrones), lo que hace de la asimilación de nitrato un proceso típicamente fotosintético (Candau *et al.*, 1976; Marqués *et al.*, 1992). El amonio provoca, además, la represión de otros sistemas de asimilación de nitrógeno, tales como el de nitrato o el de dinitrógeno, en el caso de las especies fijadoras (Flores y Herrero, 1994).

La utilización de 2-oxoglutarato, por la ruta GS-GOGAT o por la acción de la glutamato deshidrogenasa (GDH), relaciona directamente la asimilación del nitrógeno con el metabolismo del carbono. En algunas cianobacterias existen enzimas con actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) (Neilson y Doudoroff, 1973), habiéndose encontrado en *Synechocystis* sp. PCC 6803 una dependiente de NAD, NAD-GDH y otra de NADP, NADP-GDH (Florencio *et al.*, 1987; Chávez y Candau, 1991), codificada esta última por el gen *gdhA* (Chávez *et al.*, 1995). Las enzimas IDHs han sido caracterizadas en las cianobacterias *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120, habiéndose clonado los genes correspondientes, *icd* (Muro-Pastor y Florencio, 1992; 1994; Muro-Pastor *et al.*, 1996).

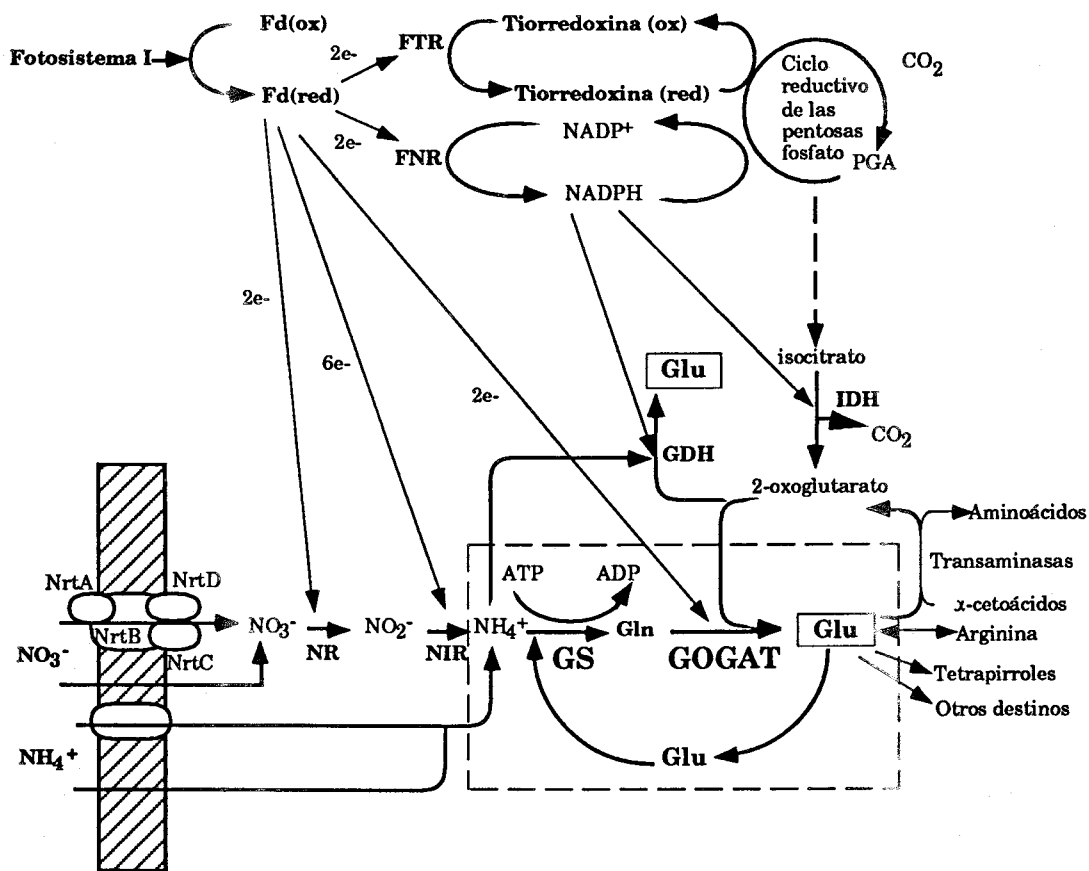
La asimilación de nitrato ocurre mediante un proceso que requiere el transporte activo del mismo al interior celular (Flores *et al.*, 1983; Lara *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1992) y su posterior reducción hasta amonio, mediante la acción de las enzimas nitrato y nitrito reductasas (Manzano *et al.*, 1976; Candau, 1979; Guerrero *et al.*, 1981). El nitrato y el nitrito se transportan de forma activa a través de un sistema multicomponente de 4 polipéptidos, productos de los genes *nrtA*, *nrtB*, *nrtCy* y *nrtD* (Omata *et al.*, 1993), los cuales forman una unidad transcripcional con los genes estructurales para la nitrato (*narB*) y nitrito reductasas (*nirA*) en *Synechococcus* 7942 (Luque *et al.* (1992; Omata *et al.*, 1993) y *Anabaena* 7120 (Frias *et al.*, en preparación). En el caso de *Synechocystis* 6803, éstos genes no forman una unidad transcripcional similar a la comentada anteriormente, pues el gen para la nitrato reductasa se encuentra alejado del resto (datos obtenidos de la secuencia del genoma de *Synechocystis*). En *Synechococcus* 7942 se han encontrado dos genes, *nirB* y *ntcB*, delante del operón *nirA*, los cuales forman una unidad transcripcional, habiéndose sugerido que *nirB* se requiere para la máxima expresión de la actividad de la nitrito reductasa y que *ntcB* regula la utilización de fuentes de nitrógeno, controlando la expresión de genes implicados en el metabolismo del mismo (Suzuki *et al.*, 1995).

En todas las cianobacterias estudiadas, el amonio inhibe el transporte de nitrato (Ohmori *et al.*, 1977; Flores *et al.*, 1989; Lara *et al.*, 1987) y reprime la transcripción del operón *nirAnrtABCDnarB* (Suzuki *et al.*, 1993; Luque *et al.*, 1994) y *nirBntcB* (Suzuki *et al.*, 1995). Cuando la ruta GS-GOGAT es inhibida por MSX (GS) o azaserina (GOGAT) se suprimen, ambos efectos del amonio, sugiriendo que son productos de metabolización del mismo, a través de esta ruta, los responsables de esta represión (Flores y Herrero, 1994).

Las cianobacterias presentan una glutamina sintetasa típicamente procariótica, GSI, que ha sido bien caracterizada, presentando estructura dodecamérica y requerimiento de cationes divalentes para su actividad (Sampaio *et al.*, 1979; Florencio y Ramos, 1985; Mérida *et al.*, 1990). El gen estructural de esta enzima, *glnA*, ha sido clonado en varias cianobacterias tanto unicelulares como filamentosas. Recientemente, en la cianobacteria *Synechocystis* 6803 se ha localizado una segunda enzima con actividad glutamina sintetasa, GSIII, cuyo gen estructural, *glnN* ha sido clonado y secuenciado (Reyes y Florencio, 1994). El análisis de la existencia de este gen en las otras especies de cianobacterias, muestra que éste se halla presente sólo en cianobacterias no fijadoras de dinitrógeno (Reyes y Florencio, 1994).

La actividad de la enzima GSI de diversas cianobacterias disminuye lentamente tras la adición de amonio a cultivos que utilizan nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, llegando al 50% a las 10-20 h (Flores y Herrero, 1994). Sin embargo, en la cianobacteria *Synechocystis* 6803, la adición de amonio provoca un fuerte y rápido descenso de la actividad GS, llegando a un 10% del nivel inicial a los 20-30 min (Mérida *et al.*, 1991a). Esta inactivación, que probablemente supone la unión no covalente a la GSI de una proteína de 14 kDa (Reyes y Florencio, 1995a), puede ser revertida por eliminación del amonio del medio de cultivo o por tratamientos *in vitro* (Mérida *et al.*, 1991b). La inactivación de la GSI se ha detectado, igualmente, en cultivos de *Synechocystis* 6803 sometidos a oscuridad o incubados con DCMU, pudiéndose prevenir por adición de glucosa. Estos resultados sugieren que la actividad de la enzima GSI está controlada por el estado redox celular (Reyes *et al.*, 1995b), lo cual se observa también a nivel de regulación transcripcional (Reyes y Florencio, 1995b). Una regulación similar ha sido descrita para la tiorredoxina de esta misma cianobacteria, proteína no implicada directamente en el metabolismo del nitrógeno, aunque sí ligada a la fotosíntesis (Navarro y Florencio, 1996; Navarro y Florencio, en preparación), lo que sugiere una regulación común por el estado redox, de aquellos genes implicados en el metabolismo fotosintético.

Un esquema que resume la interrelación entre la fotosíntesis, fijación de CO<sub>2</sub> y asimilación de nitrógeno en cianobacterias, figura 1.



**Fig. 1. Principales rutas metabólicas de asimilación de nitrógeno y carbono en cianobacterias y su interrelación con el proceso fotosintético.**

Tanto la actividad GSI como la GSIII, así como la transcripción de los correspondiente genes en *Synechocystis* 6803, están regulados por la fuente de nitrógeno, produciéndose un incremento de las mismas en condiciones de carencia de fuente nitrogenada, más acusado en el caso de la GSIII (gen *glnN*) y un descenso en crecimiento con amonio, a diferencia del crecimiento con nitrato (Reyes y Florencio, 1994).

Se ha observado también en las cianobacterias *Synechococcus* 7942 y *Anabaena* 7120 Una regulación negativa por amonio de la transcripción de los genes *glnA* (Luque *et al.*, 1994; Frías *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994). Una regulación positiva en condiciones de carencia de nitrógeno, similar a la observada para *Synechocystis* 6803, se observa en diversas cianobacterias, como *Anabaena*



7120, *Calothrix* 7601 y *Synechococcus* 7942, alcanzándose un aumento de 2-5 veces en la cantidad del mRNA del gen *glnA* (Tumer *et al.*, 1983; Elmorjani *et al.*, 1992; Cohen-Kupiec *et al.*, 1993; Luque *et al.*, 1994).

La actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa (IDH), los niveles de esta proteína y de transcritos del gen *icd*, se ven incrementados en condiciones de estrés de nitrógeno, tanto en *Synechocystis* 6803 como en *Anabaena* 7120 (Muro-Pastor *et al.*, en prensa).

Respecto a las glutamato sintasas de cianobacterias, está bien caracterizada la proteína de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992), enzima dependiente de ferredoxina. La actividad Fd-GOGAT en este organismo aumenta en carencia de nitrógeno, aunque no se incrementa a niveles comparables a los de la actividad GS en las mismas condiciones. En la cianobacteria *Anabaena* 7120, de la cual se ha clonado el gen *gltS* que codifica la Fd-GOGAT (Martín-Figueroa, comunicación personal), se ha determinado una mayor actividad Fd-GOGAT en crecimiento con dinitrógeno que con nitrato o amonio (Martín-Figueroa *et al.*, 1995). Sin embargo, no queda claro si este aumento de la actividad es debido a una inducción de la misma en estas condiciones de crecimiento, o a un aumento de actividad Fd-GOGAT en los heterocistos, ya que los estudios previos realizados con las cianobacterias *Anabaena variabilis* (Amar *et al.*, 1982) y *Anabaena* 7120 (Gupta y Carr, 1981), son contradictorios al respecto.

Se han clonado los genes correspondientes a los activadores transcripcionales NtcA de *Synechococcus* 7942 (Vega-Palas *et al.*, 1992), *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 (Frías *et al.*, 1993). La proteína NtcA, requerida para la completa expresión de las proteínas sujetas a regulación por amonio, interacciona con el DNA, habiéndose demostrado su unión a las zonas promotoras de los genes *nirA*, *glnA* y del propio *ntcA* de *Synechococcus* 7942 (Luque *et al.*, 1994), *icd* (Muro-Pastor *et al.*, en prensa) y *glnA* de *Synechocystis* 6803 (Reyes *et al.*, en preparación). La estructura consenso para promotores que requieren NtcA es:

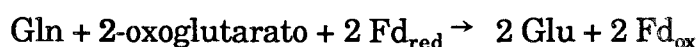


Se han obtenido mutantes del gen *ntcA* de *Synechococcus* 7942, incapaces de inducir la nitrato reductasa, la nitrito reductasa, los sistemas de transporte de nitrato y amonio y afectados en la cantidad de proteína GS (Vega-Palas *et al.*, 1990). Igualmente, se ha aislado un mutante del mismo gen de *Anabaena* 7120, incapaz de asimilar dinitrógeno o nitrato, no acumula RNAm correspondiente a los genes de nitrogenasa (*nifHDK*), nitrito reductasa (*nirA*) y glutamina sintetasa (*glnA*) cuando se elimina el amonio del medio de cultivo y no es capaz de desarrollar heterocistos ni presenta inducción del gen *hetR* (gen regulador

requerido para el desarrollo de heterocistos), lo que indica que el desarrollo de estas células especializadas está también controlado por NtcA (Frías *et al.*, 1994).

## 1.2. GLUTAMATO SINTASAS

Las glutamato sintasas catalizan la transferencia reductiva del grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, con la participación de dos equivalentes de poder reductor, originando la formación de dos moléculas de glutamato, de las cuales una entra de nuevo en la ruta:



Según la especificidad por el donador inmediato de electrones, se han dividido en dos grupos, las que utilizan piridín nucleótido (NADH-GOGAT, EC 1.4.1.13 o NADPH-GOGAT, EC 1.4.1.14) y las que utilizan ferredoxina (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1).

Las enzimas dependientes de NADPH están formadas por dos subunidades, la subunidad  $\alpha$  (subunidad grande), de 135-170 kDa y la subunidad  $\beta$  (subunidad pequeña), de 45-55 kDa, las cuales han sido bien caracterizadas en *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium*, *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter capsulatus* (Miller y Stadman, 1972; Trotta *et al.*, 1974; Hemmilä y Mäntsälä, 1978; Carlberg y Nordlund, 1991; Vanoni *et al.*, 1991; Igenño *et al.*, 1993). Sin embargo, en el caso de la NADPH-GOGAT de *E. coli*, se ha descrito que la enzima nativa está compuesta por 4 heterotetrámeros  $\alpha\beta$ , con una masa molecular de aproximadamente 800 kDa (Miller y Stadman, 1972). En *A. brasilense*, el protómero  $\alpha\beta$  contiene una molécula de FMN y otra de FAD, además de distintos centros sulfoférricos (Vanoni *et al.*, 1991), si bien en el caso de la bacteria fototrófica *Rhodobacter capsulatus* E1F1 se ha descrito la presencia de 4 mol FAD y 4 moles de azufre lábil por mol de dímero de enzima (Igenño *et al.*, 1993). Estudios recientes sobre la glutamato sintasa de *A. brasilense* indican que es la subunidad  $\alpha$  la que presenta FMN y un centro [3Fe-4S] y la subunidad  $\beta$  la que presenta FAD y dos centros [4Fe-4S] (Vanoni *et al.*, 1996) La existencia del centro [3Fe-4S] ha sido también descrita para las glutamato sintasas de *E. coli* (Rendina, 1980),

*Azotobacter vinelandii* (Peisach *et al.*, 1979) y *Bacillus subtilis* (Matsuoka y Kimura, 1986).

Las NADH-GOGATs son enzimas monoméricas de aproximadamente 220 kDa, siendo este monómero similar al conjunto de las dos subunidades de las NADPH-GOGATs unidas y aparecen tanto en levaduras (Cogoni *et al.*, 1995), como en plantas (Gregerson *et al.*, 1993) y algas (Miyatake y Kitaoka, 1981; Márquez *et al.*, 1984). Sin embargo, en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína nativa presenta una masa molecular, calculada por filtración en gel, de 610 kDa, lo que indica que se trata de un trímero, ya que la subunidad presenta un tamaño de 200 kDa (Cogoni *et al.*, 1995). En plantas superiores, la NADH-GOGAT se ha localizado en tejidos no fotosintéticos, como raíz y nódulos y ha sido bien caracterizada (Suzuki y Gadal, 1984; Chen y Cullimore, 1988; Anderson *et al.*, 1989; Gregerson *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1995).

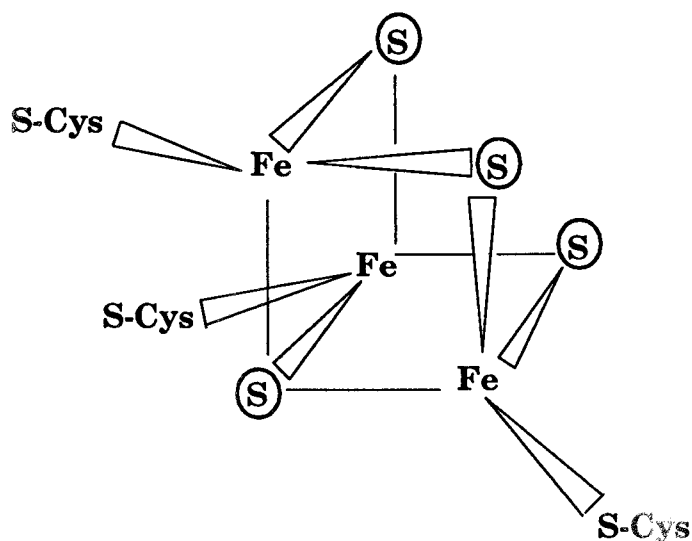
Recientemente ha sido descrita la existencia de dos glutamato sintasas en la cianobacteria *Plectonema boryanum*, siendo una dependiente de ferredoxina, compuesta por una única subunidad y otra de NADH, formada por dos subunidades, a diferencia del resto de NADH-GOGATs caracterizadas hasta el momento (Okuhara *et al.*, en preparación).

Las Fd-GOGATs son enzimas monoméricas de tamaño comprendido entre 160-180 kDa, equivalentes a la subunidad  $\alpha$  de bacterias y presentes tanto en cianobacterias (Marqués *et al.*, 1992) como en los cloroplastos de algas (Galván *et al.*, 1984; Valentin *et al.*, 1993) y de plantas superiores, a diferencia de las NADH-GOGATs (Lea y Mifflin, 1974; Suzuki y Gadal, 1982; Botella *et al.*, 1988; Hirasawa y Knaff, 1992; Lam *et al.*, 1995). Una caracterización bioquímica de estas enzimas muestra la presencia de un centro [3Fe-4S] en espinaca (Knaff *et al.*, 1991) y en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Márquez, 1985). En las Fd-GOGATs de estos dos organismos se ha determinado la presencia de FAD y FMN (Hirasawa y Tamura, 1984; Márquez *et al.*, 1986), aunque sólo se ha detectado FMN en el caso de la enzima de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992). Estudios más recientes sobre la Fd-GOGAT de espinaca muestran que sólo posee 1 FMN por molécula de enzima y no FMN y FAD como previamente se había descrito (Hirasawa *et al.*, 1996).

Hasta el momento se han determinado los potenciales de oxido-reducción del FMN y del centro [3Fe-4S] de la Fd-GOGAT de espinaca, tanto por medidas de cambios de absorbancia usando ditionito sódico como reductor y ferricianuro potásico como oxidante (para el FMN), como por técnicas de voltametría cíclica (para FMN y centro sulfoférico). Ambos grupos son isopotenciales con un valor  $E_m = -200 \pm 25$  mV y  $n=2$ , calculado por la ecuación de Nernst (Hirasawa *et al.*, 1992; 1996).

Se han clonado y secuenciado los genes correspondientes a las subunidades  $\alpha$  (*gltB*) y  $\beta$  (*gltD*) de las NADPH-GOGATs de *E. coli* (Oliver *et al.*, 1987) y *A. brasilense* (Pelanda *et al.*, 1992). El gen de la NADH-GOGAT de *S. cerevisiae* (GUS) ha sido también clonado (Cogoni *et al.*, 1995) y secuenciado (Ballario, en preparación). Han sido igualmente aislados y secuenciados los genes correspondientes a la NADH-GOGAT de alfalfa (Gregerson *et al.*, 1993), así como a la NADH-GOGAT y Fd-GOGAT de la cianobacteria *Plectonema boryanum* (Okuhara *et al.*, en preparación), las Fd-GOGATs del alga roja *Antithamnion sp.* (Valentin *et al.*, 1993) y *Porphyra purpurea* (Reith y Munholland, 1995) y el cDNA total de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991) y parciales de espinaca (Nalbantoglu *et al.*, 1994), tabaco (Zehnacker *et al.*, 1992), cebada (Ávila *et al.*, 1993) y pino (García-Gutiérrez *et al.*, 1995) que codifican la Fd-GOGATs. Dos cDNAs distintos de Fd-GOGATs, una en hojas, gen GLU1 y otra en raíces, genGLU2, han sido clonados en *Arabidopsis*, al igual que el correspondiente a la NADH-GOGAT, gen GLT1, la cual se encuentra en raíces.

Un análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos deducidas, muestra la existencia de regiones fuertemente conservadas, correspondientes a los dominios de unión de glutamina, FMN y centro [3Fe-4S] (Sakakibara *et al.*, 1991; Pelanda *et al.*, 1992). Se ha determinado un espaciamiento característico de 3 Cys para el centro [3Fe-4S] (se muestra la estructura en la figura 2), CX<sub>5</sub>CHX<sub>3</sub>C, con el que probablemente se coordina.



**Fig. 2. Estructura de la agrupación sulfoférrica [3Fe-4S].**

El papel fisiológico de las diferentes GOGATs no está hasta el momento bien definido en eucariotas fotosintéticos. Estudios realizados con guisante, hojas de cebada y plantas de *Arabidopsis* parecen indicar que las Fd-GOGATs (GLU1 para *Arabidopsis*) están implicadas en la asimilación primaria del nitrógeno y del amonio procedente de la fotorrespiración (Matoh y Takahashi, 1982; Wallsgrove *et al.*, 1982; Lam *et al.*, 1995). Por el contrario, la NADH-GOGAT, así como la segunda Fd-GOGAT (GLU2) de *Arabidopsis*, pueden ser enzimas auxiliares de la ruta anterior o funcionar como fuente de síntesis de glutamato para el transporte intracelular (Lam *et al.*, 1995). El aislamiento de mutantes fotorrespiratorios de plantas, deficientes en Fd-GOGAT, pero con actividad NADH-GOGAT, así como mutantes del gen GLT1 de *Arabidopsis*, ha permitido establecer el papel inequívoco de la Fd-GOGAT en la reasimilación de amonio (Somerville y Ogren, 1980; Kendall *et al.*, 1986; Lam *et al.*, 1995).

En *C. reinhardtii* se ha sugerido que la Fd-GOGAT es responsable de la asimilación y reasimilación del amonio, mientras que la NADH-GOGAT participaría como enzima auxiliar del ciclo en oscuridad y en condiciones adversas de crecimiento (Márquez *et al.*, 1986a).

Se ha observado un aumento de la actividad NADH-GOGAT de *Monoraphidium braunii* en condiciones de carencia de fuente de nitrógeno (Vigara, 1995), así como de la actividad Fd-GOGAT de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 en las mismas condiciones (Marqués, 1988). En hojas de maíz se ha descrito una inducción de la actividad Fd-GOGAT y de la transcripción del gen correspondiente, tanto en hambre de nitrógeno (Suzuki *et al.*, 1996) como al someter éstas a iluminación (Sakakibara *et al.*, 1991). Un aumento por luz de la expresión del gen GLU1 (Fd-GOGAT) se ha descrito también en *Arabidopsis* (Lam *et al.*, 1995), mientras que en plántulas de pino, el mRNA de la Fd-GOGAT y la actividad correspondiente aumentan cuando éste crece en oscuridad (García-Gutiérrez *et al.*, 1995).

### 1.3. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

El objetivo de este trabajo fue, en principio, la caracterización del gen de la Fd-GOGAT de *Synechocystis* 6803, así como de la proteína correspondiente y el análisis de mutantes del mismo.

El descubrimiento de dos enzimas con actividad glutamato sintasa en esta cianobacteria, llevó a un estudio de los genes correspondientes y a un análisis comparativo de los mismos, entre sí y con el resto de secuencias de glutamato sintasas disponibles.

La obtención de mutantes simples de cada gen y de mutantes dobles sería la herramienta idónea para intentar analizar la funcionalidad de cada enzima.

La expresión heteróloga de los genes en *E. coli* y la caracterización de las correspondientes proteínas nativas y recombinantes nos permitiría determinar la similitud entre ellas y la funcionalidad de las proteínas recombinantes y, por tanto, utilizar este sistema para obtener cantidades adecuadas de ambas proteínas lo que nos permitiría llevar a cabo estudios de estructura-función a partir de la mutagénesis dirigida de residuos críticos de los correspondientes genes.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1.1. Cianobacterias

### 2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas.

La realización del presente trabajo se ha centrado en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, organismo unicelular heterótrofo facultativo y no fijador de dinitrógeno, perteneciente a la sección I de la clasificación taxonómica de las cianobacterias propuesta por Rippka *et al.* (1979).

Las estirpes de cianobacterias utilizadas se relacionan en la Tabla 1.

**Tabla 1.- Estirpes silvestres de cianobacterias utilizadas en este trabajo.**

Estirpe		Sección <sup>a</sup>	Referencia
<i>Synechocystis</i>	PCC 6308	I	Rippka <i>et al.</i> , 1979
<i>Synechococcus</i>	PCC 7942	I	Rippka <i>et al.</i> , 1979
	PCC 6301	I	Rippka <i>et al.</i> , 1979
<i>Pseudanabaena</i>	PCC 6903	III	Rippka <i>et al.</i> , 1979
<i>Anabaena</i>	PCC 7120	IV	Rippka <i>et al.</i> , 1979
	ATCC 29413	IV	Catálogo ATCC
<i>Nostoc</i>	PCC 6705	IV	Rippka <i>et al.</i> , 1979
<i>Calothrix</i>	PCC 7601	IV	Catálogo PCC
<i>Fischerella</i>	UTEX 1829	V	Catálogo UTEX

<sup>a</sup> Sección taxonómica según Rippka *et al.*, 1979 (1.1.1).

Las estirpes de *Synechocystis* 6803 obtenidas en este trabajo y sus características más relevantes se presentan en la Tabla 2.



**Tabla 2.- Estirpes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 obtenidas en este trabajo<sup>a</sup>.**

Estirpe	Características
SFN1+	<i>gltB:cat</i> , Cm <sup>r</sup> (+)
SFN1-	<i>gltB:cat</i> , Cm <sup>r</sup> (-)
SFN2+	<i>gltS:npt</i> , Km <sup>r</sup> (+)
SFN2-	<i>gltS:npt</i> , Km <sup>r</sup> (-)
SFN3	<i>gltB:cat</i> , Cm <sup>r</sup> ; <i>gltS:npt</i> , Km <sup>r</sup> no totalmente segregado

<sup>a</sup> +/- indican la orientación del gen de resistencia respecto al gen inactivado. El signo + indica la misma orientación y el - la orientación contraria.

#### 2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo de cianobacterias.

Los medios empleados para cultivar las distintas estirpes de *Synechocystis* 6803 y otras cianobacterias empleadas en este trabajo se basan en el denominado BG11 (Rippka *et al.*, 1979), cuya composición es la siguiente:

#### \* BG11

NaNO <sub>3</sub>	17,6 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,30 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,24 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,20 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,20 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46 µM
Ácido cítrico	28,5 µM
Citrato férrico-amónico (15 % Fe)	6 mg/l
MnCl <sub>2</sub>	9,1 µM
Na <sub>2</sub> -EDTA	2,4 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	1,6 µM
ZnSO <sub>4</sub>	0,8 µM
CuSO <sub>4</sub>	0,3 µM
CoCl <sub>2</sub>	0,2 µM

\* BG11C: BG11 suplementado con NaHCO<sub>3</sub> 12 mM.

\* BG11<sub>0</sub>C: BG11C sin fuente de nitrógeno combinada.

Cuando se utilizó amonio como fuente de nitrógeno el  $\text{NaNO}_3$  fue sustituido por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a una concentración de 10 mM o 15 mM, añadiéndose tampón TES-NaOH (pH 7,5), a una concentración final de 20 mM o 30 mM, respectivamente. Los medios conteniendo todos sus componentes excepto el tampón TES-NaOH se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 1 atm de sobrepresión y 121 °C de temperatura (autoclave Selecta modelo P). El tampón TES-NaOH se esterilizó por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con poros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro suministrados por Millipore (Puerto Rico) o filtros Acrodisc Gelman (EE.UU.) de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

La adición de otros compuestos como aminoácidos o antibióticos se realizó previa esterilización de los mismos por filtración. Las concentraciones finales de los distintos antibióticos empleados fueron: cloranfenicol, 20  $\mu\text{g/ml}$  y kanamicina 50  $\mu\text{g/ml}$  o 500  $\mu\text{g/ml}$ , según la estirpe utilizada.

Para someter las células a tratamientos de ausencia de fuente nitrogenada, se cultivaron en medio BG11C, se recogieron por centrifugación como se describe en el apartado 2.1.3. y se lavaron y resuspendieron en medio BG110C.

El crecimiento de los cultivos en medio líquido tuvo lugar en condiciones termostatzadas a 30 °C bajo iluminación continua de 50  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , suministrada por paneles de tubos fluorescentes de luz blanca (Sylvania daylight F20w/D o similares), bien en condiciones de burbujeo con una mezcla aire- $\text{CO}_2$  en la proporción 98,5:1,5 (v/v) (en tubos de vidrio de 40 ó 150ml, en frascos de Roux de 750 ml o en botellas de 20 l), o sin burbujeo en matraces Erlenmeyer incubados a 150 rpm en incubadores orbitales Gallenkamp (Gran Bretaña) modelo INR.401.010W.

Para las purificaciones y en todos los experimentos fisiológicos (determinación de actividades enzimáticas, curvas de crecimiento y extracciones de RNA para estudios de regulación transcripcional), se utilizaron cultivos en medio líquido en las condiciones de burbujeo anteriormente descritas. Para los aislamientos de DNA, o para los experimentos de transformación genética se utilizaron cultivos en matraces.

Para cultivar en medio sólido, se suplementó al medio líquido con agar a una concentración final del 1 %. Para ello, se disolvieron las sales en la mitad del volumen de agua a utilizar y el agar (Bacto-Agar Difco) en la otra mitad. Una vez esterilizados todos los componentes, se mezclaron y el medio se vertió en cajas de Petri a razón de 35 a 40 ml por caja. La utilización de antibióticos y las condiciones de iluminación fueron las descritas para los cultivos líquidos.

## 2.1.2. *Escherichia coli*

### 2.1.2.1. Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas.

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y los genotipos correspondientes se recogen en la Tabla 3.

**Tabla 3.- Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo.**

Estirpe	Características	Referencia
K12	Silvestre	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (mK <sup>+</sup> ,rK <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> <i>DlacU169</i> (f80d- <i>lacZDM15</i> )	Hanahan, 1983
MC1061	<i>hsdR</i> , <i>mcrB</i> , <i>araD139</i> , D( <i>araABC-leu</i> )7679, <i>DlacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i>	Meissner <i>et al.</i> , 1987
HB101	<i>SupE44</i> , <i>hsdS20</i> , (r <sup>-</sup> m <sup>-</sup> ), <i>recA13</i> <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>mcrB</i>	Boyer y Roulland -Dussoix, 1969
CLR207 <i>RecA</i>	F <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>leu-6</i> , <i>his-1</i> , <i>argH1</i> <i>gltB31</i> , <i>gdhA1</i> , <i>lacY1</i> , <i>gal-6</i> <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>rpsL9</i> , <i>trp</i> , <i>tonA2</i> <i>tsx-68</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR</i> , (m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ,r <sub>k</sub> <sup>-</sup> )	Mattaj <i>et al.</i> , 1982
BMH71-18 <i>mutS</i>	<i>thi</i> , <i>supE</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), [ <i>mutS</i> ::Tn 10] F <sup>-</sup> [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> , $\Delta$ M15]	"U.S.E. mutagenesis Kit", Pharmacia (Suecia)

En la tabla 4 se detallan las estirpes de *E. coli* generadas en este trabajo con sus características más relevantes.

**Tabla 4.- Estirpes de *E. coli* generadas en este trabajo.**

Estirpe	Características <sup>a</sup>
CLR-pFN12	CLR207 <i>RecA</i> conteniendo el plásmido pFN12
CLR-pFN13	CLR207 <i>RecA</i> conteniendo el plásmido pFN13
CLR-pFN14	CLR207 <i>RecA</i> conteniendo el plásmido pFN14
CLR-pFN15	CLR207 <i>RecA</i> conteniendo el plásmido pFN15
CLR-pFN23	CLR207 <i>RecA</i> conteniendo el plásmido pFN23
CLR-pFN24	CLR207 <i>RecA</i> conteniendo el plásmido pFN24

<sup>a</sup>Las características de los plásmidos se indican en la Tabla 5.

#### 2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo de *Escherichia. coli*.

Como medio habitual de crecimiento de *E. coli*, tanto en cultivos líquidos como sólidos, se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente:

NaCl	10 g/l
Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l

En el caso del medio sólido, se añadió agar a una concentración final del 1,5 % (p/v). El medio completo se esterilizó en autoclave como se ha descrito (2.1.1.2).

El medio SOB (Sambrook *et al.*, 1989) se utilizó para cultivos destinados a la preparación de células competentes. Su composición es la siguiente:

Bactotripton	20 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
KCl	2,5 mM

El medio se esterilizó en autoclave como ya se ha descrito, excepto las sales de magnesio, que se esterilizaron separadamente por filtración y se mezclaron con el resto del medio una vez enfriado.

El medio mínimo utilizado en los experimentos de complementación fue el descrito por Mattaj *et al.*, 1982. Su composición es la siguiente:

Tampón fosfato potásico, pH 7,5	27 mM
NH <sub>4</sub> Cl	15 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	14 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM

Como fuente de carbono se utilizó glucosa o glicerol a una concentración final de 27 mM, esterilizados separadamente en autoclave y añadidos al medio una vez fríos. El medio en forma sólida se preparó añadiendo agar a una concentración final de 1,5 %.

Los antibióticos, esterilizados por filtración, se añadían en caso necesario, a las siguientes concentraciones:

	<u>Medio rico</u>	<u>Medio mínimo</u>
Ampicilina	100 µg/ml	40 µg/ml
Cloranfenicol	25 µg/ml	5 µg/ml

Los cultivos en medio líquido se realizaron a 37 °C en tubos o matraces Erlenmeyer de volumen quintuple al del cultivo y con agitación orbital continua a 200 rpm en aparatos New Brunswick Scientific (EE.UU.) modelo G25. Los cultivos en medio sólido se realizaron en cajas de Petri a 37 °C.

### 2.1.2.3. Obtención de células de partida para la purificación de proteínas.

Para obtener células destinadas a la purificación de la ferredoxina o glutamato sintasas de *Synechocystis* 6803 expresadas en *E. coli*, se utilizaron 2 viales de células competentes (200 µl) de la estirpe requerida, por cada litro final de cultivo. Cada vial fue transformado, según se describe en el apartado 2.5.1, con 0,5-1 µg de plásmido y con ellos se inocularon matraces Erlenmeyer

conteniendo medio LB (2 viales/20 ml). Tras incubar en agitación a 200 rpm y 37 °C durante 8 horas, se emplearon 20 ml de estos cultivos para inocular matraces de 5 l de volumen conteniendo 2 l de LB y se cultivaron las células en iguales condiciones durante 12-16 horas.

### **2.1.3. Métodos de recogida de células**

En los cultivos líquidos de volúmenes inferiores a seis litros, las células se recogieron por centrifugación, bien en microcentrifuga Eppendorf (12.000 x g, 10 min), bien en centrífuga de mesa Heraeus (2.500 x g, 5 min) o en centrífuga refrigerada Sorvall (EE.UU.) modelos RC2-B y RC5-C (7.000 x g, 10 min), según el volumen del cultivo. Para centrifugar cantidades superiores, se utilizó un sistema de flujo continuo Szent-Gyorgyi-Blum Sorvall (EE.UU.) a 18.000 x g y 4 °C.

## **2.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

### **2.2.1. Determinación de la actividad glutamato sintasa**

#### **2.2.1.1. Ensayo *in vitro* de la actividad glutamato sintasa.**

La actividad GOGAT se determinó según el método descrito por Marqués *et al.* (1989), cuantificando la formación de glutamato por HPLC, según se describe en el apartado 2.7.2. La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 0,9 ml: 45 µmol de tampón fosfato potásico pH 7,5; 5 µmol de glutamina; 1 µmol de 2-oxoglutarato; 1 µmol de aminooxiacetato, una cantidad apropiada de extracto libre de células o proteína purificada y como transportador de electrones, 10 nmol de ferredoxina (actividad Fd-GOGAT) o 0,25 µmol de metilviológeno (actividad MV-GOGAT). La reacción se inició por la adición de 0,8 mg de ditionito sódico recién disueltos en 0,1 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0,12 M y se detuvo tras incubarlo a 30°C el tiempo indicado, añadiendo 0,25 ml de la mezcla de reacción a 0,15 ml de HCl 1 mM, en hielo. Tras centrifugar a 12.000 x g, 4 min a 4°C, la muestra se neutralizó diluyendo 25 µl del sobrenadante con 600 µl de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5. Una unidad (U) de actividad glutamato sintasa corresponde a la formación de 1 µmol de glutamato por minuto.

#### **2.2.1.2. Ensayo *in vitro* de la actividad glutamato sintasa usando piridín nucleótidos como donadores de electrones.**

La mezcla de ensayo fue la descrita en el apartado anterior, excepto que se omitieron el donador y el transportador de electrones y se usó el piridín

nucleótido correspondiente. En este caso, la reacción se inició por la adición de NADPH a concentración final de 0,25 mM (actividad NADPH-GOGAT), o NADH 1 mM (actividad NADH-GOGAT). La determinación y definición de actividad glutamato sintasa son las descritas anteriormente.

#### 2.2.1.3. Ensayo *in vitro* de la actividad glutamato sintasa usando ferredoxina: NADP<sup>+</sup>-óxidoreductasa.

Esta reacción utiliza NADPH como reductor de la ferredoxina:NADP<sup>+</sup>-óxidoreductasa (EC 1.6.7.1) (FNR), la cual a su vez, transfiere los electrones a la ferredoxina, donador natural de la glutamato sintasa.

A la mezcla de ensayo descrita en el apartado 2.2.1.1, se le añadieron 600 mU de FNR de *Anabaena* 7120, una cantidad adecuada de preparación enzimática y ferredoxina a una concentración final de 30  $\mu$ M. La reacción se inició por la adición de 1 mM de NADPH en un volumen final de 1 ml. La determinación del glutamato formado y de la actividad glutamato sintasa se indican en el apartado 2.2.1.1.

#### 2.2.1.4. Ensayo *in situ* de la actividad glutamato sintasa.

Para el ensayo *in situ*, un volumen de células de cianobacterias conteniendo una cantidad total de clorofila de 15-25  $\mu$ g, o bien 1 ml de cultivo de células de *E. coli* incubadas durante 12-16 h a 37 °C, se recogieron por centrifugación como se describe (2.1.3) y se lavaron con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5. Las células se resuspendieron en la mezcla de ensayo indicada en el apartado 2.2.1.1, conteniendo en este caso 5  $\mu$ mol de 2-oxoglutarato y metil viológeno a concentración de 10 mM como transportador de electrones. Tras la adición de 20  $\mu$ l de tolueno, se agitó vigorosamente la mezcla de reacción durante 1 min para permeabilizar las células y se inició y detuvo la reacción en las condiciones descritas anteriormente. El glutamato formado y la actividad glutamato sintasa se determinó según se indica en el apartado 2.2.1.1.

### 2.2.2. Determinación de la actividad glutamina sintetasa

#### 2.2.2.1. Ensayo de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa.

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se estimó según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970). Para el ensayo *in situ*, un volumen de cultivo de células conteniendo 5-10  $\mu$ g de clorofila se centrifugó a 12.000 x g, durante 1 minuto a temperatura ambiente y las células se

resuspendieron en 0,8 ml de una mezcla de ensayo que contenía: 66,7  $\mu\text{mol}$  de tampón HEPES-NaOH (pH 7); 40  $\mu\text{mol}$  de L-glutamina; 4  $\mu\text{mol}$  de  $\text{MnCl}_2$  y 0,5 mmol de ADP. A esta suspensión se le añadieron 0,1 ml de una mezcla recién preparada de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M en proporción 1:1 y 20  $\mu\text{l}$  de una solución de MTA al 1,25 % en agua, para permeabilizar las células. Después de agitar vigorosamente durante 10 s, la reacción se inició por adición de 50  $\mu\text{l}$  de una solución  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$  0,4 M. Como testigos (o blancos) se realizaron ensayos en paralelo que contenían agua en lugar de arseniato. La mezcla de reacción se incubó durante 5 ó 10 min a 30 °C y la reacción se detuvo por adición de 2 ml de una disolución de  $\text{FeCl}_3$  en medio ácido (ver apartado 2.7.5) para revelar el  $\gamma$ -glutamilhidroxamato producido en la reacción. Para el ensayo *in vitro* se utilizó la misma mezcla de ensayo suprimiendo el MTA y añadiendo, en lugar de células, una cantidad apropiada de preparación proteica.

Una unidad de actividad transferasa de la GS se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de  $\gamma$ -glutamilhidroxamato por minuto en estas condiciones de ensayo.

## 2.3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 2.3.1. Preparación de extractos celulares

Los extractos crudos de células de *Synechocystis* 6803 o de *E. coli* se obtuvieron siguiendo tres procedimientos, según la cantidad de extracto necesario y del volumen de cultivo.

#### 2.3.1.1. Rotura por ultrasonidos.

Para volúmenes de extractos superiores a 2 ml y en el caso de las purificaciones, se utilizó un tratamiento con ultrasonidos. Una vez recogidas las células por centrifugación, se resuspendieron en el tampón correspondiente a cada caso a razón de 5 ml/g células y se suplementó con PMSF a una concentración final de 1 mM (a partir de una solución 100 mM en isopropanol). En el caso de preparación de extractos para las purificaciones de la Fd-GOGAT, GltB, de *Synechocystis* 6803 tanto nativa como expresada en *E. coli*, se utilizó una mezcla de inhibidores de proteasas que incluían PMSF 2 mM, ácido  $\epsilon$ -aminocaproico 1 mM (desde una solución concentrada 500mM) y benzamidina 1 mM (solución concentrada 100 mM). Las suspensiones, mantenidas en hielo, se sometían a un tratamiento con ultrasonidos durante 1 min 30 s en ciclos de 30 s, alternados con ciclos de 1 min en los que se cesó el tratamiento, con objeto de evitar un calentamiento excesivo. La frecuencia de los ultrasonidos, producidos por un



sonicador Branson (Reino Unido) modelo B12, fue de 20 KHz y su potencia de 75 W. Una vez concluido el tratamiento de rotura, la suspensión celular se sometió a centrifugación durante 15 min a 18.000 x g. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo libre de células.

#### 2.3.1.2. Rotura con nitrógeno líquido.

Para volúmenes de extractos entre 0,5 y 2 ml, las células, una vez recogidas por centrifugación, se resuspendieron en un volumen del tampón correspondiente comprendido entre los indicados, se les añadió PMSF a una concentración final de 1 mM o la mezcla de inhibidores de proteasas descrita en el apartado anterior y se sometieron a congelación con nitrógeno líquido, triturándose en un mortero hasta reducir las a polvo antes de llegar a descongelarse. El polvo de células se recogió en tubos Eppendorf y tras su descongelación se centrifugó la preparación a 12.000 x g y 4 °C durante 15 min para conseguir el extracto crudo libre de células.

#### 2.3.1.3. Rotura con perlas de vidrio.

En el caso de requerir pequeñas cantidades de extracto con objeto de someter las muestras a electroforesis o para determinar actividades enzimáticas, se utilizó un método de rotura con perlas de vidrio. Para ello, un volumen de 1 ó 2 ml de cultivo se centrifugó en tubos Eppendorf y el precipitado celular se lavó con 200 µl del tampón deseado en cada caso. Tras volver a centrifugar se resuspendió entre 100 y 500 µl del mismo tampón suplementado con 1 mM de PMSF, según la cantidad de células. A esta suspensión se le añadió una cantidad equivalente a 50 µl de perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro) Sigma (EE.UU.) por cada 100 µl de tampón.

En el caso de extractos de células de *Synechocystis*, se sometió la suspensión celular anterior a 4 periodos consecutivos de 30 s de agitación vigorosa en agitador automático, alternados con periodos de 1 min en hielo. Cuando el extracto era de células de *E. coli*, el tratamiento consistió en dos periodos de 15 s de agitación vigorosa, alternados con periodos de 30 s en hielo. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 min a 12.000 x g y 4 °C, constituyendo el sobrenadante el extracto crudo libre de células.

### **2.3.2. Purificación de la ferredoxina de *Synechocystis* 6803 expresada en *Escherichia coli***

Para la purificación de la ferredoxina de *Synechocystis* 6803, se sobreexpresó en *E. coli* DH5 $\alpha$  el plásmido pCK1 (Schmitz *et al.*, en preparación), que contiene el gen que codifica la ferredoxina de esta cianobacteria (*petF*) bajo el control de su propio promotor y del promotor *PLac*. Para ello, las células de *E. coli* se transformaron con este vector, según se describe en el apartado 2.1.2.3 y finalmente se recogieron, por centrifugación, células procedentes de 6 l de cultivo en medio LB con ampicilina como antibiótico.

El tampón usado para la purificación fue fosfato potásico 20 mM pH 7,5 (tampón A) y todo el proceso se realizó a 4 °C. Las células se lavaron, se resuspendieron en este tampón y posteriormente se sometieron a rotura por ultrasonidos, como se indica en el apartado 2.3.1.1. Tras la rotura, se centrifugó la suspensión a 18.000 x *g* durante 15 min y el sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación a 40.000 x *g* durante 45 min en ultracentrífuga Beckman modelo L8-80M (EE.UU.), constituyendo el sobrenadante obtenido el extracto crudo libre de células.

#### **2.3.2.1. Primera cromatografía de intercambio iónico.**

Se empleó DEAE-celulosa microgranular suministrada por Sigma (EE.UU) equilibrada inicialmente con tampón concentrado, Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5) y reequilibrada posteriormente en la columna con el tampón A. La columna utilizada fue de vidrio de 2,5 cm de diámetro y 15 cm de altura. Los gases disueltos en las suspensiones de DEAE-celulosa se eliminaron, antes de montar las columnas, mediante una bomba de vacío Millipore modelo XX5522050 (EE.UU.).

El flujo de aplicación de las muestras y el del solvente de lavado y elución (40 ml/h) se reguló por medio de bombas peristálticas LKB tipo Perpex 10.200 (Alemania). Las fracciones del eluato se recogieron automáticamente con un colector Pharmacia modelo Frac-100 (Suecia). Tras la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 4 volúmenes de columna de tampón A suplementado con 0,25 M de NaCl. La ferredoxina se eluyó lavando la columna con 0,5 M de NaCl en tampón A.

### 2.3.2.2. Precipitación mediante sulfato amónico.

El eluato procedente de la cromatografía anterior se sometió a precipitación con sulfato amónico al 50 % de saturación y tras centrifugar a 12.000 x g durante 15 min, el sobrenadante se dializó frente a 2 l de tampón A durante 6 h y posteriormente, frente a otros 2 l durante 12-14 h.

### 2.3.2.3. Segunda cromatografía de intercambio iónico

La muestra, dializada como se explica en el apartado anterior, se sometió a una segunda cromatografía en DEAE-celulosa, en columna de 1 cm de diámetro y 7 cm de altura. El flujo de aplicación de la muestra, lavado y elución fue 20 ml/h. Las condiciones de lavado y elución de la ferredoxina fueron las descritas en el apartado 2.3.2.1.

La concentración de la ferredoxina se estimó por absorbancia a 422 nm empleando un coeficiente de extinción  $6.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , calculado para la ferredoxina de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 (Smillie y Entsch, 1971).

### 2.3.3. Preparación de geles de ferredoxina Sefarosa

Para la preparación de geles de ferredoxina Sefarosa, se utilizó Sefarosa 4B activada con CNBr de Pharmacia (Suecia). Se utilizó 1 ml de gel hinchado (un g de matriz seca equivale a 3,5 ml hinchada) por cada 7 mg ferredoxina. La cantidad deseada de matriz se hinchó en HCl 1 mM durante 15 min y a continuación se lavó con 200 ml HCl 1 mM por cada gramo de matriz seca. Este gel se mezcló durante 2,5 h a temperatura ambiente y con agitación suave con la ferredoxina disuelta en tampón bicarbonato sódico 0,1 M, pH 8,4, conteniendo NaCl 0,5 M. La matriz se filtró y lavó posteriormente con el mismo tampón para eliminar la ferredoxina no acoplada. En estas condiciones, aproximadamente el 95 % de la ferredoxina quedó unida a los grupos de la matriz, bloqueándose el resto de grupos con Tris-HCl 0,1 M, pH 8 (20 ml/g gel seco) durante 3 h. El gel resultante fue lavado tres veces con 0,1 M acetato sódico, pH 4, conteniendo 0,5 M NaCl y otras tres con NaCl 0,5 M en Tris-HCl 0,1 M, pH 8, alternadamente, a razón de 20 ml/g gel seco. Finalmente, la matriz se equilibró con tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5. Tras cada uso, la columna fue lavada con el mismo tampón, suplementado con 1,5 M NaCl, seguido de lavado en tampón sin sal y sólo equilibrada con tampón B (apartado 2.3.4.) antes de cada uso, pues el 2-mercaptoetanol presente en este tampón provoca decoloración de la ferredoxina unida a la matriz.

#### **2.3.4. Técnicas cromatográficas usadas en la purificación de la ferredoxina glutamato sintasa, GltS.**

El tampón usado para la purificación de la Fd-GOGAT, GltS, es el descrito para la purificación de la Fd-GOGAT de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992) y consiste en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5 conteniendo glutamina 1mM; 2-oxoglutarato 1 mM; EDTA 1 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM (tampón B).

##### **2.3.4.1. Cromatografía de intercambio iónico.**

Se empleó DEAE-celulosa preparada como se describe (2.3.2.1) y equilibrada en tampón B. Las columnas usadas fueron de vidrio y de tamaño variable, según la cantidad de extracto de partida.

##### **2.3.4.2. Cromatografía de filtración en gel Ultrogel AcA34.**

En el caso de la cromatografía usada como segundo paso de purificación de la Fd-GOGAT, se usó una columna de vidrio calibrado de Pharmacia (Suecia) de 2,5 cm de diámetro por 90 cm de altura, conteniendo un lecho de gel Ultrogel AcA34 de LKB y equilibrada con tampón B (4 volúmenes). Las condiciones generales de cromatografía fueron las descritas en el apartado 2.3.2.1.

##### **2.3.4.3. Cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.**

Para la cromatografía de afinidad usada como paso final de purificación de la Fd-GOGAT, se empleó una columna de vidrio conteniendo un lecho de gel de ferredoxina Sefarosa preparado según se describe en el apartado 2.3.3., de 2 cm de diámetro y empaquetada hasta 7 cm de altura. Las condiciones generales de cromatografía fueron las descritas en el apartado 2.3.2.1.

##### **2.3.4.4. Cromatografía de filtración en gel NovaPacK S300.**

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de baja presión (FPLC) Waters (EE.UU.), compuesto por un inyector 650E y conectado a una bomba modelo 600E que creaba un flujo de solvente de 0,2 ml/min. La salida del inyector estaba conectada a una columna de cromatografía NovaPacK S300 de 0,8 x 30 cm. La columna se equilibró con tampón B suplementado con NaCl 0,1 M. La muestra, 0,1 ml, se aplicó directamente, con una jeringuilla de 1 ml de

volumen, a través del inyector y se recogieron fracciones de 0,2 ml. La salida de la columna estaba conectada a un detector de absorbancia modelo 486 cuyos datos se procesaron automáticamente mediante un integrador modelo ABB Goertz (EE.UU.). El volumen de elución ( $V_e$ ) de cada muestra se determinó siguiendo la absorbancia a 280 nm y por detección en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. El volumen vacío ( $V_0$ ) se estimó como el volumen de elución de una muestra conteniendo azul dextrano al 1 % y el volumen total ( $V_t$ ), como el de una muestra de ferricianuro potásico al 0,02 %.

La masa molecular de las Fd-GOGATs, en condiciones nativas se determinó siguiendo el método de Andrews (1965), representando la  $K_{av}$  ( $V_e - V_0 / V_t - V_0$ ) frente al logaritmo de la masa molecular. Las proteínas utilizadas como marcadores y los valores considerados como masas moleculares fueron: catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), seroalbúmina bovina (64 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa).

### **2.3.5. Electroforesis de proteínas**

#### **2.3.5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.**

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en aparatos Mini-Protean II de Bio-Rad (EE.UU.) o Vertical Slab Gel Electrophoresis Units modelos SE250 y SE600 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.). El gel de separación, el de concentración y el tampón de electrodo contenían dodecil sulfato sódico al 0,1 %. La concentración de acrilamida fue del 6 % en los geles de separación y las muestras se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga, que contenía: tampón Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), glicerol al 20 % (v/v), SDS al 4 %, 2-mercaptoetanol al 10 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,0025 %, todo ello en agua destilada. La desnaturalización de las muestras se llevó a cabo calentando a 100 °C durante 3 min y la electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente.

Se utilizaron como patrones de masas moleculares las siguientes proteínas suministradas por Bio-Rad (EE.UU.): miosina (200 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B de músculo de conejo (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa) y ovoalbúmina de gallina (45 kDa). Para la determinación de las masas moleculares, se representó el logaritmo de las masas moleculares de las proteínas marcadoras frente a la movilidad electroforética relativa de cada proteína, respecto al frente de electroforesis, obteniéndose así una curva patrón.

### 2.3.5.2. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se visualizaban sumergiendo los geles en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,1 %, ácido acético al 10 % (v/v) y metanol al 40 % (v/v) en agua. Tras 15 min de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaron varias veces con una solución de metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v) en agua. Una vez concluido este tratamiento, las proteínas aparecían como bandas de color azul. Los geles se conservaban en ácido acético al 10 % (v/v) en agua o se secaban utilizando un secador de geles Drygel modelo SE1160 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.).

### 2.3.6. Técnicas inmunológicas

#### 2.3.6.1. Obtención de antisuero de conejo anti-Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Aproximadamente 0,5 mg de GltS de *Synechocystis* 6803, purificada hasta homogeneidad como se describe en el apartado 3.7., se diluyó hasta 5 ml con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,9) y se le añadió una cantidad equivalente de adyuvante incompleto de Freund. Se homogeneizó la suspensión hasta conseguir una emulsión uniforme y se inyectó en varios puntos del cuerpo de un conejo albino neozelandés de aproximadamente 1,5 kg de peso, de forma subcutánea. Transcurridos quince días de esta primera inyección se realizaron nuevas inyecciones subcutáneas, con 0,2 mg de enzima purificada cada una y preparada de la misma forma que se ha descrito previamente. A los 15 días de la última inyección de antígeno, se realizó la extracción de sangre al conejo. Tras coagulación y centrifugación de la sangre a 12.000 x g, 15 min a 4 °C, se tomó el sobrenadante y se procedió a la inactivación del complemento por calentamiento a 55 °C durante 15 min, tras lo cual volvió a centrifugarse en las mismas condiciones constituyendo el sobrenadante el suero inmune anti-Fd-GOGAT, GltS.

#### 2.3.6.2. Inmunodetección de GOGAT en geles de poliacrilamida (Western blot).

La presencia de Fd-GOGAT en muestras sometidas a electroforesis, se detectó mediante inmunorreacción con anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-Fd-GOGAT, de la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 6301, o con suero anti-Fd-GOGAT, GltS, obtenidos como se describe en el apartado 2.3.6.1. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transferían a membranas de

nitrocelulosa Bio-Rad (EE.UU.) de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro, en un aparato Nova Blot de Pharmacia (Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora, a intensidad constante y utilizando como tampón de electrodo una solución de Tris (5,89 g/l), glicina (2,93 g/l), SDS (0,375 g/l) y metanol al 20 % (v/v). El proceso de transferencia se siguió mediante el empleo en la electroforesis de patrones de masa molecular preteñidos. A continuación, la membrana se incubó durante 1 hora en una solución bloqueante preparada con leche en polvo desnatada Molico-Sveltesse de Nestlé (España) al 5 % (p/v) en tampón TBS (Tris-HCl 15 mM, pH 7,4 y de NaCl 0,2 M). Posteriormente, la membrana se incubó con el antisero anti-Fd-GOGAT, diluido (1:1000) en solución de bloqueo, durante 2 h a temperatura ambiente y agitación constante. Tras lavar la membrana cuatro veces, durante 5 min cada una, en tampón TBS suplementado con Tween 20 al 0,05 % (v/v) (SIGMA, EE.UU.), se incubó la misma con una solución de anticuerpos (inmunoglobulina G) de oveja anti-inmunoglobulina G de conejo, conjugados con peroxidasa de rábano Sigma (EE.UU.), diluidos (1:1.000) en solución de lavado, durante 45 min a temperatura ambiente y con agitación constante. Tras repetir el proceso de lavado descrito anteriormente, se reveló la actividad peroxidasa sumergiendo la membrana en una solución de cloronaftol (30 mg en 10 ml de metanol),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (250  $\mu\text{l}$ , 3 % p/v) y TBS (50 ml).

### **2.3.7. Concentración de proteínas por ultrafiltración**

La concentración de proteínas se realizó por ultrafiltración, centrifugando a 4.500  $\times g$  y 4 °C durante 30-60 min, utilizando aparatos Centricon 30 suministrados por Amicon (EE.UU.) o microconcentradores Microsep 10K o 30K suministrados por Filtron (EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso. Se empleó un rotor SS34 en una centrifuga refrigerada RC5C Sorvall (EE.UU.).

### **2.3.8. Cambio de tampón y eliminación de sales y moléculas pequeñas de preparaciones de proteínas y DNA**

En los casos en los que se requería cambiar el tampón o bien eliminar las sales contenidas en un volumen pequeño de muestra (100-500  $\mu\text{l}$ ), se empleó una filtración forzada a través de Sephadex G-25 o G-50, siguiendo el método de Orly y Selinger descrito por Penefsky (1977). Para ello, jeringas de plástico de 1 ó 2 ml, o bien pequeñas columnas de plástico, se llenaron con Sephadex G-25 o G-50 hinchado y se equilibraron con dos volúmenes del tampón en el que se deseaba dejar la muestra. Las columnas se centrifugaron 2 min a 1100  $\times g$  para eliminar

el exceso de tampón, tras lo cual se aplicó la muestra (inferior a un décimo del volumen de lecho) y se centrifugó durante 4 min a 1100 x g, recogiénose en un tubo de centrifuga. Cuando se trataba de eliminar las sales o cambiar el tampón a mayores volúmenes de soluciones proteicas, se utilizó cromatografía de filtración en gel en columnas de vidrio de distinto diámetro y altura, según el volumen de muestra a aplicar (1-5 % del volumen de columna). En este caso, las condiciones generales de la cromatografía fueron las descritas (2.3.2.1).

Las muestras proteicas de alta concentración salina destinadas a electroforesis se dializaron sobre membranas de microdiálisis tipo VS, de 0,025  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, suministradas por Millipore (Irlanda). Las membranas se situaban flotando en cajas de Petri conteniendo 50 ml de tampón estándar, se aplicaba la muestra en la superficie y se mantenía a 4 °C durante varias horas.

### **2.3.9. Formación de complejos entre la Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* expresada en *E. coli* y distintos transportadores de electrones**

Para la formación de estos complejos, se utilizó una carbodiimida soluble, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), que activa grupos aminos facilitando su reacción con grupos carboxilos próximos. Los tratamientos con EDC, a una concentración final de 4 mM, se realizaron a 30 °C, en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,2 y en un volumen final de 20-40  $\mu\text{l}$  con aproximadamente 8  $\mu\text{g}$  de GltS purificada como se describe en el apartado 3.7., por cada 10  $\mu\text{l}$  finales y 35  $\mu\text{M}$  de ferredoxina o flavodoxina. A diferentes tiempos de tratamiento se tomaron muestras de 10  $\mu\text{l}$  y se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga para electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, apartado 2.3.5.2, para detener la reacción y se sometieron a electroforesis desnaturalizante.

### **2.3.10. Determinación de la secuencia amino-terminal de GltS de *Synechocystis* expresada en *E. coli***

La determinación se realizó mediante la degradación secuencial de Edman. La muestra, aproximadamente 10  $\mu\text{g}$ , tratada con fenilisotiocianato, se aplicó a una membrana de fibra de vidrio y la secuenciación de aminoácidos se llevó a cabo en un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 470 A conectado a un analizador de aminoácidos.



### 2.3.11. Técnicas espectroscópicas

#### 2.3.11.1. Determinación de los espectros de absorción de GltS de *Synechocystis* 6803 expresada en *E. coli*.

Para llevar a cabo la determinación de los espectros de absorción, las muestras de Fd-GOGAT fueron preparadas en tampón fosfato potásico 20 mM, pH 7,5, conteniendo 2-mercaptoetanol 1 mM y EDTA 1 mM. La anaerobiosis de las preparaciones se consiguió mediante el gaseo de las mismas, en cubeta cerrada con tapón de goma, usando gas nitrógeno libre de oxígeno y manteniéndose durante todo el proceso. Los espectros de absorción fueron obtenidos usando un espectrofotómetro ultravioleta/visible Varian modelo Cary 1 (Australia).

Las muestras se redujeron con ditionito sódico 50 mM, en condiciones anaeróbicas, como se ha indicado anteriormente, usando una microjeringa de vidrio S.G.E. (Australia) tipo GSG de 50  $\mu$ l. La reducción de GltS fue medida por la desaparición del máximo de absorción a 436 nm.

La reoxidación de las muestras, previamente reducidas con ditionito, se consiguió añadiendo a la preparación 2-oxoglutarato 50 mM. La reoxidación de GltS se siguió por el incremento de absorbancia a 436 nm.

#### 2.3.11.2. Espectroscopía de resonancia paramagnética del electrón (EPR).

Las medidas de EPR para determinar el centro sulfoférico se realizaron en la frecuencia de la banda X con 3-80  $\mu$ M de GltS en tubos de cuarzo de EPR, usando un espectrómetro Bruker ER-200-SDR-D-SRC equipado con un criostato de flujo continuo. Las temperaturas a las que se realizaron las medidas, la modulación de la amplitud y los valores de g se indican en las figuras. La cuantificación de las señales de [Fe-S] se realizó usando una solución de CuEDTA como patrón.

Los análisis de EPR se llevaron a cabo en colaboración con el grupo del profesor Pierre Sétiff, perteneciente al servicio de bioenergética/URA 1290 (CNRS) del Departamento de Biología Celular y Molecular, C. E. A., en Saclay, Francia.

#### 2.3.11.3. Medidas potenciométricas.

Las titulaciones redox de la Fd-GOGAT, GltS, se han llevado a cabo siguiendo los cambios de absorbancia a 445 nm, al añadir alícuotas de ditionito sódico (11 mM) como reductor y ferricianuro potásico (15 mM) como oxidante, todo preparado en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7 y manteniendo la



anaerobiosis con argón. No se siguieron los cambios de absorbancia a 436 nm (máximo de absorbancia), para evitar interferencia con el agente oxidante. El potencial se determinó mediante un electrodo de potencial de Pt-Ag/AgCl Ingold (Dr. W. Ingold, Suiza), conectado a un potenciómetro Beckman 4500 (Beckman RIIC Ltd., Gran Bretaña) y previamente calibrado con una solución saturada de quinhidrona ( $E_o'$ , pH 7, + 280 mV a 20°C).

Como mediadores redox se usaron 2-hidroxi-1,4-naftoquinona ( $E_o'$ , pH 7, -145 mV), antraquinona-2-sulfonato ( $E_o'$ , pH 7, -225 mV) y benzil viológeno ( $E_o'$ , pH 7, -311 mV).

### 2.3.12. Análisis de flavinas.

La flavina asociada a la ferredoxina-glutamato sintasa de *Synechocystis* 6803 se identificó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), por comparación con patrones de FMN y FAD, según el método descrito (Light *et al.*, 1980).

#### 2.3.12.1. Extracción de flavinas por incubación a 100 °C.

Se siguió una simplificación del método descrito por (Faeder y Siegel, 1973). Muestras de 20  $\mu$ l de glutamato sintasa purificada conteniendo 50 ó 100  $\mu$ g de proteína en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7, se incubaron en tubos Eppendorfs durante 10 min a 100 °C, tras lo cual se enfriaron a 4 °C y se centrifugaron a 12.000 x *g* durante 15 min. El sobrenadante conteniendo la flavina liberada se analizó mediante HPLC como se indica (2.3.12.3).

#### 2.3.12.2. Extracción de flavinas por hidrólisis con TCA en frío.

El método utilizado se describe en (Koziol, 1971). A muestras de 20  $\mu$ l de glutamato sintasa purificada conteniendo 50-100  $\mu$ g de proteína se le añade un volumen igual de ácido tricloroacético al 20 % y se incuba a 4 °C durante 10 min, tras lo cual se centrifuga a 12.000 x *g* durante 15 min. El sobrenadante obtenido se neutraliza por adición de 10  $\mu$ l de fosfato dipotásico 4 M. La suspensión se analiza mediante HPLC como se indica (2.3.12.3).

#### 2.3.12.3. Análisis de flavina por HPLC.

La separación de flavinas se llevó a cabo mediante HPLC utilizando el método de elución isocrático (Light *et al.*, 1980). Para ello, se empleó un cromatógrafo Waters (EE.UU.), compuesto por una bomba peristáltica modelo

501 y un inyector universal U6K, un detector de fluorescencia AC-420, provisto de un filtro de excitación de 450 nm y un filtro de emisión de 530 nm y un integrador modelo 745. La separación se llevó a cabo en una columna de octadecilsilano en soporte de sílice Novapack C<sub>18</sub> de 15 cm de largo y 3,9 mm de diámetro interno. El solvente empleado fue tampón acetato amónico 5 mM, pH 6, suplementado con 50 % metanol, bombeado a un flujo constante de 1 ml/min.

Las flavinas se identificaron por comparación con patrones externos de FMN y FAD tratados en cada caso del mismo modo que las muestras.

## 2.4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA Y RNA

### 2.4.1. Plásmidos utilizados

En la Tabla 5 se relacionan los plásmidos utilizados, no construidos en este trabajo, así como sus características más notables. Los plásmidos pRL161 y pRL171 se utilizaron para obtener los genes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol que fueron usados para la mutagénesis de los genes *gltB* y *gltS*. El plásmido pBluescript II SK(+) (denominado pBS) fue el vector utilizado en las clonaciones estándar, salvo cuando se indican y el plásmido pUC19 fue usado para llevar a cabo las mutagénesis dirigidas del gen *gltS*.

**Tabla 5.- Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.**

Plásmido	Características	Referencias
pBluescript II SK(+)	Ap <sup>r</sup> , <i>oriF1 colE1ori, lacZ</i>	Stratagene
pUC19	Ap <sup>r</sup> , <i>oriF1 colE1ori, lacZ</i>	Stratagene
pRL161	Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , C.K1 ( <i>npt</i> de Tn5), derivado de pBR322	Elhai y Wolk, 1988
pRL171	Ap <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , C.C1 ( <i>cat</i> de pKT210), derivado de pBR322	Elhai y Wolk, 1988
pBG1	Cm <sup>r</sup> , <i>oriP15, gdhA</i>	Mattaj <i>et al.</i> , 1988
pCK1	Ap <sup>r</sup> .pUC conteniendo el gen <i>petF</i> que codifica la ferredoxina de <i>Synechocystis</i> 6803	Schmitz <i>et al.</i> , en preparación

En la tabla 6 se relacionan los plásmidos construidos en este trabajo.

**Tabla 6.- Plásmidos construidos en este trabajo.**

Plásmido	Características
pFN3	Fragmento <i>XmnI</i> (3,9 kb) de DNA genómico de <i>Synechocystis</i> 6803, conteniendo parte del gen <i>gltB</i> , en pBS <i>EcoRV</i> .
pFN4	Fragmento <i>SmaI</i> (4,9 kb) de DNA genómico de <i>Synechocystis</i> 6803, conteniendo parte del gen <i>gltS</i> , en pBS <i>SmaI</i> .
pFN5/6	Fragmento <i>HindIII</i> (6,3 kb) de DNA genómico de <i>Synechocystis</i> 6803, conteniendo el gen <i>gltB</i> , en orientación igual (5) o contraria (6) al sentido de transcripción del promotor <i>PLac</i> del plásmido, en pBS <i>HindIII</i> .
pFN7/8	Fragmento <i>ClaI</i> (9,3 kb) de DNA genómico de <i>Synechocystis</i> 6803, conteniendo el gen <i>gltS</i> , en orientación igual (7) o contraria (8) al sentido de transcripción del promotor <i>Plac</i> del plásmido, en pBS <i>ClaI</i> .
pFN9	Eliminación del fragmento <i>ApaI</i> de 4,3 kb de pFN7.
pFN10(+/-) <sup>a</sup>	Sustitución de un fragmento <i>HincII</i> (894 pb) de pFN6 (gen <i>gltB</i> ) por C.C1.
pFN11(+/-) <sup>a</sup>	Inserción de C.K1 en <i>XbaI</i> de pFN9 (gen <i>gltS</i> ).
pFN12	Fragmento <i>EcoRV-HindIII</i> (5 kb) de pFN5 conteniendo el gen <i>gltB</i> en pBS <i>SmaI-HindIII</i> .
pFN13	Eliminación de 3 kb <i>BglII-BamHI</i> de pFN8.
pFN14	Fragmento <i>ApaI</i> de pFN13 (4,6 kb) conteniendo el gen <i>gltS</i> , hecho romo con Klenow, en pBS <i>EcoRV</i> .
pFN15	Eliminación de la zona 5' del gen <i>gltB</i> contenido en pFN12.
pFN20/21	Fragmento <i>HindIII</i> (3,7 kb) del gen <i>gltS</i> , en pUC19 <i>HindIII</i> , en orientación igual (21) o distinta (20) al sentido de transcripción del promotor <i>PLac</i> .
pFN22	pFN21 conteniendo la mutación C1173S.
pFN23	Cambio del fragmento <i>HindIII</i> (3,7 kb) de pFN14 por el fragmento <i>HindIII</i> (3,7 kb) de pFN22 conteniendo la mutación C1173S.
pFN24	Cambio del fragmento <i>HindIII</i> (3,7 kb) de pFN14 por el fragmento <i>HindIII</i> (3,7 kb) de pFN22 conteniendo la mutación C1173S, en sentido contrario al original.

<sup>a</sup> (+/-) indica el sentido de inserción de C.C1 y C.K1 en relación al sentido de transcripción de los genes *gltB* y *gltS*, respectivamente.

## 2.4.2. Aislamiento y análisis de DNA

### 2.4.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala, se emplearon dos métodos alternativos: un método de lisis alcalina y un método de lisis por ebullición. El primero de estos métodos, descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979), consiste en la lisis de las células en presencia de SDS y NaOH, seguida de la eliminación del DNA cromosómico y las proteínas mediante precipitación con acetato potásico y centrifugación. Este procedimiento se llevó a cabo según se describe en Sambrook *et al.*, (1989). Las preparaciones se sometían a extracciones con fenol:cloroformo (1:1, v/v) para reducir el contenido proteico de las mismas. El método alternativo de lisis por ebullición, originalmente descrito por Holmes y Quigley (1981), consiste en la lisis de las células mediante hervido en presencia de Tritón X-100 y se realizó, igualmente, según Sambrook *et al.*, (1989). El aislamiento de DNA plasmídico destinado a la secuenciación se realizó por los métodos indicados seguidos de desproteinización con fenol.

El DNA utilizado para digestión con exonucleasa III de *E. coli* (apartado 2.4.5.1.) se aisló por el procedimiento de lisis alcalina seguido de tratamiento con RNAasa A de páncreas bovino, Boehringer Mannheim (Alemania), a una concentración final de 20 µg/ml y precipitación con polietilenglicol (Ausubel *et al.*, 1989) o bien por ebullición, seguido igualmente por tratamiento con RNAasa A y filtrado en columnas de Sephadex G50, según el método descrito por Penefsky (1977).

### 2.4.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias.

El aislamiento de DNA total de cianobacterias se llevó a cabo según el método descrito por Cai y Wolk (1990), basado en la rotura de las células con perlas de vidrio. Células procedentes de 50 ml de cultivo en medio BG11 o derivados se recogieron por centrifugación (6.000 x g, 10 min) y se resuspendieron en 400 µl de tampón T0,1E (Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM, pH 7,5). A la suspensión celular se le añadieron 150 µl de perlas de vidrio estériles (0,25-0,30 mm de diámetro; Sigma, Alemania), 20 µl de una solución de SDS al 10 % y 450 µl de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v). La suspensión se sometió a continuación a 10 ciclos de 1 min de agitación vigorosa intercalados con ciclos de 1 min de incubación en hielo. El lisado se centrifugó (12.000 x g, 15 min, 4 °C) y se sometió el sobrenadante a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v).

El DNA se precipitó finalmente con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, en presencia de acetato sódico a una concentración final de 0,3 M (pH 5,2).

Para las extracciones de DNA de *Synechocystis* 6803, se añadió a los cultivos penicilina-G a una concentración final de 100 µg/ml 20 h antes de proceder a su aislamiento.

Antes de ser utilizadas, las perlas de vidrio se sometieron a un tratamiento con ácido nítrico y HCl concentrados (3:1) durante 12 h, seguido de numerosos lavados con agua destilada, posterior esterilización en autoclave y secado.

#### 2.4.2.3. Amplificación de fragmentos de DNA de *Synechocystis* 6803 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación de fragmentos de DNA correspondientes a regiones internas a los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803, se utilizó como molde DNA total de esta cianobacteria, obtenido según se describe en el apartado 2.4.2.2. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, conteniendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; KCl 50 mM; gelatina 0,1 mg/ml; 0,2 mM de cada dNTP; 50 pmol de cada oligonucleótido; 1,5 ng de DNA total de *Synechocystis* 6803 y 2,5 U de Taq DNA polimerasa suministrada por Boehringer (Alemania). A esta mezcla se le añadió un volumen igual de aceite mineral Sigma (EE.UU.) para evitar la evaporación. La amplificación se realizó en un aparato Gene Ataq Controller de Pharmacia (Suecia) o Mastercycler 5330 de Eppendorf (Alemania) y consistió en un primer ciclo de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94 °C; 1 min de renaturalización a 42 °C y 1 min de polimerización a 72 °C y un ciclo final de 1 min a 94 °C; 1 min a 42 °C y 10 min a 72 °C.

El resultado de la PCR se analizó según se describe (2.4.2.4).

#### 2.4.2.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Se realizaron según se describe en Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 0,7-1 % preparados en tampones TBE 0,5x (TBE 1x está compuesto por Tris-borato 45 mM y de EDTA, 1 mM, pH 8,0) o TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA, 10 mM, pH 7,7). Las electroforesis se realizaron en aparatos GNA-100 o GNA-200 suministrados por Pharmacia (Suecia). A cada muestra se añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga formado por 0,25 % de azul de bromofenol; 0,25 % de xileno-cianol FF y 30 % (v/v) de glicerol, en agua. Cuando se deseaba eliminar el RNA de las muestras, se trataban éstas con RNAasa A de páncreas bovino a una concentración final de 20 µg/ml.

Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA sometidos a electroforesis, se emplearon como marcadores los fragmentos provenientes de la digestión del fago  $\lambda$  con *Hind* III o con *Hind* III y *Eco*RI.

Tras la electroforesis, los geles, que incluían bromuro de etidio a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$ , se sometieron a iluminación con luz ultravioleta de 302 nm para visualizar los fragmentos de DNA.

#### 2.4.2.5. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa.

Se emplearon dos métodos, el primero basado en la solubilización de la agarosa con NaI y adsorción de los fragmentos de DNA a perlas de vidrio, realizándose el proceso de extracción tras desarrollar la electroforesis, empleando tampón TAE utilizando los productos suministrados bajo la denominación GeneClean (BIO 101 Inc., EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El segundo método consiste en la congelación de los fragmentos de agarosa conteniendo el DNA, a  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 hora en jeringuillas desechables de 1 ml. En este caso, el DNA se extrajo haciendo presión con el émbolo de la jeringuilla y suministrando calor por frotamiento de la misma, sometiéndose éste a continuación a extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). El DNA se precipitó posteriormente con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío en presencia de acetato sódico a una concentración final de 0,3 M (pH 5,2).

#### 2.4.2.6. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación con sondas radiactivas (*Southern blot*).

La hibridación del DNA fijado a filtros de nylon, con sondas marcadas radiactivamente, se llevó a cabo según Ausubel *et al.* (1989). Para ello, una vez realizada la electroforesis de DNA en gel de agarosa al 0,7 %, éste se incubó durante 15 min con agitación suave en una solución de Hcl 0,25 N para despurinizar parcialmente el DNA. Posteriormente se lavó con agua destilada y se incubó durante una hora en una solución desnaturalizante de NaOH 0,5 N conteniendo NaCl 1,5 M, manteniéndose también en agitación suave. A continuación se realizó la transferencia del DNA a filtros de nylon Zeta-Probe suministrados por Bio-Rad (EE.UU.), utilizándose un aparato de transferencia por vacío TransVac TE80 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante, tras lo cual se horneó el filtro durante dos horas a  $80\text{ }^\circ\text{C}$ .

Los filtros se prehibridaron durante 4-6 horas con una solución compuesta por: tampón fosfato potásico 25 mM, pH 7; SSC 5x (el tampón SSC 1x contiene NaCl 0,15 M y citrato sódico, 15 mM, pH 7,0); disolución de Denhardt 5x

( Denhardt 1x contiene 0,2 g/l de ficol tipo 400, 0,2 g/l de polivinilpirrolidona y 0,2 g/l de seroalbúmina bovina); DNA de esperma de salmón 50 µg/ml y SDS al 1 %. Transcurrido el tiempo de prehibridación, se añadió la sonda de DNA marcada radiactivamente y se llevó a cabo la hibridación durante 15 h. La temperatura de prehibridación e hibridación fue de 55 °C, 65 °C o 68 °C, dependiendo del grado de homología existente entre la sonda y el DNA a hibridar.

Los filtros, una vez hibridados, se lavaron con agitación moderada a temperatura ambiente con las siguientes soluciones: SSC 2x, SDS 0,1 % (5 min); SSC 2x, SDS 0,1 % (15 min); SSC 0,5x, SDS 0,1 % (15 min); SSC 0,1x, SDS 0,1 % (15 min) y a 42 °C con SSC 0,1x, SDS 1 % (30 min). Este último lavado se suprimió en las hibridaciones heterólogas. Tras los lavados, la hibridación presente en los filtros se detectó en un analizador de radiactividad Instantimager Electronic Autoradiography de Packard Instrument Co. (EE.UU.) y se sometieron éstos a autorradiografía a -70 °C con películas Valca (España) modelo HPX-44, utilizándose para ello una carcasa de exposición Sigma (EE.UU.) y pantallas intensificadoras Lightning Plus (Dupont) (EE.UU.). Una vez transcurrido el tiempo de exposición, se reveló la película empleando reactivos reveladores y fijadores suministrados por Valca (España) y según las instrucciones del fabricante.

#### 2.4.2.7. Manipulaciones enzimáticas del DNA.

Las endonucleasas de restricción, así como la ligasa, la fosfatasa alcalina, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa o la nucleasa S1 empleados fueron suministradas por Boehringer Mannheim (Alemania), Pharmacia (Suecia) o Promega (EE.UU.) y se utilizaron siguiendo las instrucciones indicadas por los proveedores.

Los fragmentos de DNA que se iban a utilizar como sondas en las hibridaciones se obtenían mediante restricción de los plásmidos adecuados y se purificaban mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción de las bandas correspondientes, como se describe en el apartado 2.4.2.5. Aproximadamente 100 ng de dichos fragmentos se marcaban radiactivamente utilizando 20-30 µCi de 5'[α-<sup>32</sup>P]dCTP (3000 mCi/mmol) suministrado por New England Nuclear (Gran Bretaña). Se emplearon alternativamente dos equipos de marcaje suministrados por Boehringer Mannheim (Alemania), "Nick translation kit" y Pharmacia (Suecia), "Random primed DNA labeling kit", de acuerdo con las instrucciones de los proveedores. En todos los casos, el exceso de nucleótidos no incorporados se eliminaba mediante filtración de las muestras a través de columnas de Sephadex G-50 (Apartado 2.3.8.).



### 2.4.3. Aislamiento y análisis de RNA total de *Synechocystis* 6803

#### 2.4.3.1. Aislamiento de RNA total de *Synechocystis* 6803.

Todas las soluciones utilizadas en las extracciones se trataron con dietil pirocarbonato 0,1 % (v/v) para eliminar restos de RNAasa.

##### 2.4.3.1.1. Extracción de RNA con fenol caliente.

Se empleó el método descrito por Mohamed y Jansson (1989), basado en el uso de fenol caliente, con algunas modificaciones. Las células procedentes de 50 ml de cultivo en medio BG11 o derivados, se recogieron por centrifugación (12.000 x g, 4 min y 4 °C) y se resuspendieron en 1 ml de solución de resuspensión preenfriada (sacarosa 0,3 M; acetato sódico 10 mM, pH 4,5). La suspensión celular se transfirió a tubos Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó (12.000 x g, 30 s), tras lo cual el precipitado celular se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a - 80 °C hasta el momento de proseguir el aislamiento, resuspendiéndose entonces en 250 µl de la solución de resuspensión más 75 µl de Na<sub>2</sub>-EDTA 250 µM. Esta preparación se vertió en un mortero conteniendo nitrógeno líquido y se sometió a trituración, añadiéndose a continuación 375 µl de tampón de lisis (SDS 2 % (p/v); acetato sódico 10 mM, pH 4,5). Posteriormente, el lisado se incubó a 65 °C durante 3 min y se le añadieron 700 µl de fenol a esta misma temperatura, incubándose de nuevo a igual temperatura durante otros 3 min. La preparación se centrifugó a continuación a 12.000 x g durante 5 min a 4 °C, repitiéndose la extracción con fenol caliente dos veces, realizándose finalmente otra extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). El RNA se precipitó añadiendo 1/5 del volumen de la muestra de una solución de LiCl 10 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Tras centrifugación (15 min, 12.000 x g) y secado, el RNA se resuspendió en 20 µl de H<sub>2</sub>O. Para determinar la concentración y la calidad del RNA obtenido, se cuantificó espectrofotométricamente como se describe en el apartado 2.7.7. y se sometió a electroforesis en geles de agarosa como se describe en el apartado 2.4.2.4. Cuando fue necesario, el contenido de DNA se eliminó mediante tratamiento con DNAasa I libre de RNAasa suministrada por Boehringer Mannheim (Alemania) siguiendo el protocolo descrito por Ausubel *et al.* (1989).

##### 2.4.3.1.2. Extracción de RNA con perlas de vidrio.

Las células correspondientes a 50 ml de cultivo en medio BG11 o derivados se recogieron por centrifugación (12.000 x g, 4 min y 4 °C) y se

resuspendieron en 400  $\mu$ l de de tampón T0,1E. A la suspensión celular se le añadieron 150  $\mu$ l de perlas de vidrio estériles (0,25-0,30 mm de diámetro; Sigma, Alemania), 20  $\mu$ l de una solución de SDS al 10 %, 450  $\mu$ l de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v), DTT 10 mM y 40 U de RNAsin suministrada por Promega (EE.UU.). Tras 10 ciclos de 1 min de agitación vigorosa alternados con ciclos de 1 min en hielo, se centrifugó la suspensión (12.000 x g, 10 min y 4 °C). El sobrenadante se sometió a 2 extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y se precipitó el RNA con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/5 de volumen de LiCl 10 M. Tras posterior centrifugación en iguales condiciones, se lavó el sedimento con etanol al 80 % y se resuspendió en 40  $\mu$ l de TE una vez seco éste. Para la eliminación del DNA se añadieron a la preparación de RNA 40 U de DNAasa I suministrada por Boehringer Mannheim (Alemania) y 10 mM de MgSO<sub>4</sub>, incubándose durante 30 min a 30 °C. Posteriormente, se sometió la preparación a extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y se precipitó el RNA con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato sódico 3 M (pH 4,5). Finalmente, el RNA se resuspendió en H<sub>2</sub>O, tras lavar el sedimento con etanol al 80 % y secarlo. La cuantificación del RNA y su visualización se realizó como se describe en el apartado anterior.

#### 2.4.3.2. Detección de RNAm mediante hibridación con sondas de DNA radiactivas (*Northern blot*).

El RNA total se sometió a electroforesis según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 1 % conteniendo formaldehído al 1,9 % (v/v) y preparados en tampón MOPS (MOPS 20 mM; acetato sódico 5 mM y EDTA 0,5 mM). Las electroforesis se realizaron en aparatos GNA-100 o GNA-200 suministrados por Pharmacia (Suecia). Las muestras, con un volumen final de 20,5  $\mu$ l, contenían 15  $\mu$ g de RNA; 1  $\mu$ l de tampón MOPS 10x; 3,5  $\mu$ l de formaldehído; 10  $\mu$ l de formamida desionizada y 1  $\mu$ l de bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml). Los geles, una vez finalizada la electroforesis, se sometían a dos periodos de lavado durante 15 min en agua destilada a 65 °C para eliminar el formaldehído, equilibrándose a continuación en tampón SSPE 10x (el tampón SSPE 1x contiene NaCl 0,36 M; fosfato sódico 0,02 M y EDTA 2 mM, pH 7,7). A continuación, el RNA se transfirió a filtros de nylon Hybond-N+ (Amersham, Gran Bretaña), utilizándose para ello un aparato de transferencia por vacío TransVac TE80 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h utilizando NaOH 50 mM como solución de transferencia.

Las hibridaciones se realizaron según las instrucciones del fabricante de las membranas empleadas en estos experimentos. Para ello, los filtros se

prehibridaron 4-6 horas a 42 °C en una solución compuesta de SSPE 5x; disolución de Denhardt 5x; formamida 50 % (v/v); SDS 0,1 % (p/v) y DNA de esperma de salmón 50 µg/ml. Transcurrido el tiempo de prehibridación, se añadió la sonda de DNA marcado radiactivamente, desnaturalizada y se procedió a realizar la hibridación durante 15 h, a igual temperatura.

Los filtros, una vez hibridados, se lavaron con agitación moderada usando las siguientes soluciones: SSPE 2x, SDS 0,1 % (2 veces a temperatura ambiente durante 10 min); SSPE 1x, SDS 0,1 % (1 vez a 65 °C durante 15 min). Tras los lavados, los filtros se sometieron a autorradiografía y se analizó la hibridación en las mismas condiciones descritas para las hibridaciones de DNA.

#### **2.4.4. Amplificación de DNA a partir de RNA total de *Synechocystis* 6803 (RT-PCR)**

##### **2.4.4.1. Obtención de cDNA utilizando RNA total de *Synechocystis* 6803.**

Para la obtención de cDNAs correspondientes a los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803, se utilizaron oligonucleótidos complementarios a los RNA mensajeros de cada uno de estos genes.

Para la reacción de síntesis de los cDNAs se utilizó Tris-HCl 27 mM, pH 8,3; MgCl<sub>2</sub> 13,5 mM; DTT 7,5 mM; 250 pmol del oligonucleótido correspondiente; 2,5 mM de cada dNTP; 20 U de AMV transcriptasa reversa suministrada por Promega (EE.UU.), 20 U de inhibidor de RNAasa Rnasin, Promega (EE.UU.), y 1 µg de RNA total en un volumen final de 20 µl y a 42 °C durante 1 hora. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se llevó hasta 200 µl con H<sub>2</sub>O.

##### **2.4.4.2. Amplificación de DNA, utilizando cDNA, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La reacción de amplificación de DNAs correspondientes a los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803, se llevó a cabo por PCR, según se describe (2.4.2.3), utilizando como molde una dilución 1/20 de la suspensión de cDNA anterior y con sólo 20 ciclos de amplificación.

El resultado de la PCR se analizó usando geles de agarosa al 0,7 %, según se describe en el apartado 2.4.2.4., y posterior hibridación con sondas correspondientes a los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803, como se indica en el apartado 2.4.2.6.

## 2.4.5. Secuenciación de DNA

### 2.4.5.1. Obtención de deleciones seriadas de fragmentos de DNA mediante digestión con exonucleasa III.

La obtención de plásmidos delecionados en forma seriada, se llevó a cabo mediante digestión con exonucleasa III de *E. coli*, utilizando el equipo "double-stranded nested deletion kit" suministrado por Pharmacia (Suecia) o "Erase-a-Base System" de Promega (EE.UU.), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Este método se basa en las propiedades de dicha enzima, específica para DNA de doble cadena y que digiere una de ellas, comenzando por un extremo 5' protuberante (Henikoff, 1984). El hecho de que la enzima no actúe sobre extremos 3' protuberantes, la hace idónea para realizar digestiones unidireccionales de plásmidos tratados con una enzima de restricción que genere estos extremos y con una segunda que produzca extremos 5' protuberantes. De esta forma, la deleción ocurre sólo a partir del extremo 5' protuberante, evitando así que ocurra en zonas funcionalmente esenciales del vector. El DNA plasmídico empleado en este proceso se aisló por los procedimientos de lisis alcalina o de ebullición y se purificó como se describe en el apartado 2.4.2.1.

Los plásmidos utilizados a tal efecto, se digirieron en primer lugar con la enzima que proporcionaba extremos 3' protuberantes y a continuación con la que proporcionaba extremos 5' protuberantes, sometiéndose posteriormente a digestión con exonucleasa III. Se extrajeron muestras alícuotas a diferentes tiempos de tratamiento con la exonucleasa III y los plásmidos obtenidos se trataron con nucleasa S1, generándose así extremos romos. La mitad de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa, para comprobar el resultado del proceso y la otra mitad se ligó con ligasa del fago T4, para recircularizar los fragmentos obtenidos. Tras la ligación, se transformaron células de *E. coli* y se seleccionaron los clones deseados.

### 2.4.5.2. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea-poliacrilamida.

El DNA plasmídico empleado en los experimentos de secuenciación se obtuvo mediante lisis alcalina o ebullición (2.4.2.1) y seguido de desproteinización con fenol:cloroformo. La secuenciación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sanger *et al.* (1982), basado en el uso de didesoxirribonucleótidos de adenina, guanina, citosina y timina para producir paradas aleatorias durante la reacción de polimerización a partir del cebador. El nucleótido empleado para marcar radiactivamente las cadenas sintetizadas en dichas reacciones fue 5'

[ $\alpha$ - $^{35}\text{S}$ ]dATP (1.212  $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ), suministrado por New England Nuclear (Gran Bretaña). Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos comerciales "Reverse primer" y "M13-20 primer", suministrados por Boehringer Mannheim (Alemania), adecuados para secuenciar plásmidos derivados de pBluescript II. Los reactivos y la DNA-polimerasa empleados en las reacciones fueron los incluidos en el equipo Sequenase versión 2.0, suministrado por United States Biochemical (EE.UU.). Se siguieron las instrucciones del fabricante, excepto en la eliminación del hidróxido sódico utilizado para la desnaturalización del DNA molde, que se realizó por filtración a través de columnas de Sephadex G-50 (apartado 2.3.8.), previamente equilibradas en tampón T0,1E.

Los productos de las reacciones de secuenciación se separaron en geles de poliacrilamida al 6 % (p/v), conteniendo 4,68 M de urea en tampón TBE. Se empleó un aparato de electroforesis modelo SE 1500, suministrado por Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, desarrollándose la electroforesis entre 50 y 60 °C de temperatura a una potencia constante de 130 W. El producto de una misma reacción se dividía en tres partes que se sometían a electroforesis de distinta duración, consiguiéndose con ello determinar en cada caso una secuencia de al menos 300 bases.

Terminada la electroforesis, los geles se pasaban a papel Whatman 3 MM y se secaban utilizando un secador de geles Drygel Sr. modelo SE1160 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.). La autorradiografía se realizaba con películas Kodak X-OMAT-S 100, en carcasas de exposición Sigma (EE.UU.), a temperatura ambiente, empleándose para el revelado de las películas reactivos suministrados por Valca (España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.5. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA**

### **2.5.1. Obtención de células competentes y transformación de *E. coli***

La preparación de células competentes de *E. coli* de las diferentes estirpes utilizadas se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Hanahan (1985). Las células se cultivaban en 100 ml de medio líquido SOB (apartado 2.1.2.2.) con agitación vigorosa, hasta alcanzar una absorbancia a 580 nm de entre 0,45 y 0,65. Tras mantener el cultivo en hielo durante 15 min, las células se recogían por centrifugación (750 x g, 15 min y 4 °C) y se resuspendían en 33 ml de solución RF1 fría (tampón acetato potásico 30 mM, pH 5,8; RbCl<sub>2</sub> 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM y glicerol al 15 % (v/v)) esterilizada por filtración. Tras mantener la solución en hielo durante 30 min, se repitió el proceso de centrifugación anterior y se resuspendieron las células en 8 ml de solución RF2 fría (tampón MOPS-NaOH 10 mM, pH 7,0; RbCl<sub>2</sub> 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 25 mM y glicerol

al 15 % (v/v)). Las células así preparadas se conservaron a -70 °C en alícuotas de 200 µl. La competencia de las células se comprobó transformándolas con cantidades conocidas de DNA plasmídico, obteniéndose en torno a 10<sup>7</sup> transformantes/µg de DNA.

Para transformar las células competentes, el DNA transformante (máximo 20 µl) se mezclaba suavemente con una alícuota de células competentes descongelada en hielo, empleando tubos (13 x 75 mm) de poliestireno-cristal suministrado por Soria Greiner S.A. (España). Tras incubar 45 min en hielo, se sometían a un choque térmico de 45 s a 42 °C y se volvían a incubar en hielo durante 2 min. La suspensión se suplementaba posteriormente con 0,8 ml de medio LB y se incubaba durante una hora a 37 °C. A continuación, las células se sembraban en medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de los transformantes. Cuando las mezclas de transformación iban a ser sembradas en medio mínimo para los experimentos de complementación, tras la incubación a 37 °C en medio LB, se lavaban las células con medio mínimo, antes de sembrarlas en las cajas de medio selectivo.

Cuando se utilizaron plásmidos y estirpes de *E. coli* que permitieran identificar clones portadores de moléculas recombinantes gracias a la inactivación por inserción del gen *lacZ*, el medio se suplementó con 0,2 µM de IPTG y 40 mg/ml de X-gal. Las colonias con plásmidos recombinantes mostraron color blanco, frente al color azul de las que no lo portaban.

### 2.5.2. Transformación de *Synechocystis* 6803

La transformación de *Synechocystis* 6803 se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Chauvat *et al.* (1986). Las estirpes de *Synechocystis* 6803 se cultivaron en 50 ml de medio BG11C a 30 °C y 150 rpm hasta densidad óptica a 580 nm de 0,5, inoculándose desde esta suspensión un nuevo cultivo hasta alcanzar una densidad óptica a 580 nm de entre 1,0 y 1,5. En este momento, las células se recogieron por centrifugación a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con BG11C, resuspendiéndose a continuación en 5 ml del mismo medio. Alícuotas de 1 ml de esta suspensión se mezclaron con 1 µg de DNA transformante, disuelto en 100 µl de tampón T0,1E y se incubaron a la luz y 30 °C durante 1,5 horas. Posteriormente, la suspensión celular se sembró en cajas de medio BG11C que se incubaron a la luz y 30 °C durante 20 horas, momento en el que se le añadieron 0,4 ml de cloranfenicol (1 mg/ml) o 0,4 ml de kanamicina (10 mg/ml). Como control negativo se realizaban experimentos equivalentes sin añadir DNA.

## 2.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL GEN *gltS* DE *Synechocystis* 6803

Para la realización de las distintas mutagénesis dirigidas del gen *gltS* de *Synechocystis* 6803, se utilizó el sistema "U.S.E. Mutagenesis Kit" de Pharmacia (Suecia). Este método se basa en la eliminación de un único sitio de restricción del plásmido usado, según el procedimiento descrito por Deng y Nickoloff (1992). Para ello, se utiliza un oligonucleótido portando la mutación diseñada, con el fin de introducir ésta en una secuencia conocida del DNA y un segundo oligonucleótido que elimina un único sitio de restricción no esencial en el plásmido, el cual sirve como base para la selección de los plásmidos mutados. Puesto que ambos oligonucleótidos hibridan con la misma cadena del DNA plasmídico, es posible sintetizar una nueva cadena de DNA conteniendo las dos mutaciones.

Los plásmidos usados en los experimentos de mutagénesis fueron pFN20 y pFN21 (apartado 2.4.1.) y se obtuvieron mediante lisis alcalina (apartado 2.4.2.1.), incluyendo extracción con fenol:cloroformo (1:1).

### 2.6.1. Hibridación de los oligonucleótidos al plásmido y síntesis de la cadena de DNA mutada.

La reacción de hibridación incluía la utilización del oligonucleótido "U.S.E. Selection primer" suministrado por Pharmacia (Suecia), complementario al sitio de restricción *ScaI* del vector pUC19 y conteniendo la mutación que hace cambiar esta diana por *MluI*:

5' CTGTGACTGGTGACGCGTCAACCAAGTC 3'

Una alícuota de 25 pmol del oligonucleótido anterior, 25 pmol del oligonucleótido con la mutación diseñada en cada caso (apartado 3.13) y 0,025 pmol de plásmido se llevaron hasta un volumen final de 20  $\mu$ l en tampón OPA (Tris-acetato 10 mM; acetato magnésico 10 mM y acetato potásico 50 mM, pH 7,5). Tras incubar a 100 °C durante 5 min y enfriar en hielo otros 5 min, se incubó la preparación durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 7  $\mu$ l de una solución conteniendo 2,86 mM de cada dNTP; 4,34 mM ATP y 1,43x del tampón OPA, así como 3  $\mu$ l de la mezcla de reacción que incluía DNA ligasa del fago T4 (0,83-1,17 ku/ml); DNA polimerasa del fago T4 (0,83-1,67 ku/ml) y proteína del gen 32 del fago T4 (0,2-0,28 mg/ml), en tampón acuoso. La mezcla anterior se incubó a 37 °C durante 1 h y se detuvo la reacción calentando a 85 °C durante 15 min.

### 2.6.2. Primera ronda de selección

La preparación anterior se sometió a digestión con la enzima de restricción *ScaI* como se indica en el apartado 2.4.2.7, en un volumen final de 50  $\mu$ l. De esta forma se reduce la capacidad de los plásmido silvestres (que contienen el sitio *ScaI*) para transformar células de *E. coli*.

Se utilizaron 20  $\mu$ l de la mezcla de plásmidos silvestres y mutados resultado de la digestión anterior, para transformar alícuotas de 200  $\mu$ l de la estirpe de *E. coli* BMH71-18 *mutS*, la cual es defectiva en reparación de mutaciones en el DNA y por tanto, no revierte las mutaciones introducidas con los oligonucleótidos usados. La transformación de las células de *E. coli* se realizó según se describe en el apartado 2.5.1. Con la mezcla de transformación se inocularon 3 ml de medio LB con ampicilina, a 100  $\mu$ g/ml de concentración final y se incubaron en agitación a 37 °C durante 12-16 h.

### 2.6.3. Segunda ronda de selección

Para conseguir la máxima eficiencia en el proceso de mutagénesis, los plásmidos obtenidos por lisis alcalina (2.4.2) a partir de la estirpe de *E. coli* BMH71-18 *mutS*, transformada como se describe en el apartado anterior, se sometieron a digestión con la enzima de restricción *MluI*. De esta forma, se digirieron aquellos plásmidos que portaban la mutación que hacía aparecer el sitio de restricción *MluI*, mientras que los plásmidos silvestres o los que sólo portaban la mutación en el gen *gltS* quedaron recircularizados. El resultado de esta digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %, según 2.4.2.4. y se extrajo la banda correspondiente a DNA plasmídico linearizado, según se describe en el apartado 2.4.2.5. Posteriormente se recircularizaron los plásmidos aislados del gel de agarosa usando DNA ligasa del fago T4, según 2.4.2.7.

### 2.6.4. Obtención e identificación de mutantes.

Las mezclas de ligación, obtenidas como se describe en el apartado anterior, se utilizaron para transformar alícuotas de 200  $\mu$ l de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las mezclas de transformación se sembraron en cajas conteniendo medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y varios de los clones aparecidos se usaron para extraer DNA plasmídico, según (2.4.2.1). Posteriormente, los plásmidos se digirieron con la enzima de restricción *MluI* y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7 %. Se seleccionaron aquellos clones en los que se obtuvo el plásmido en forma lineal, indicando esto que contenían la



mutación que hacía aparecer el sitio único de restricción *MluI*. Algunos de los clones conteniendo este nuevo sitio de restricción se usaron para realizar reacciones de secuenciación (2.4.5.2), con el fin de comprobar la existencia en el gen *gltS* de la mutación diseñada.

## **2.7. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **2.7.1. Determinación de la concentración interna de aspártico, glutámico y glutamina en células de *Synechocystis* 6803**

Para determinar las concentraciones intracelulares de aspártico, glutámico y glutamina se realizó una extracción mediante lisis ácida de las células, como se describe en Romero *et al.*, 1989. Para ello, fracciones alícuotas de 0,9 ml de un cultivo con una concentración de clorofila de aproximadamente 10 µg/ml, se mezclaron con 0,1 ml de HCl 2 N enfriado en hielo. La mezcla se agitó durante 10 s y se centrifugó (12,000 x *g*, 5 min y 4 °C). El sobrenadante constituyó el lisado celular donde se analizaron los distintos aminoácidos. Se tomaron 150 µl de este lisado y se tamponó con tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5 hasta un volumen de 1,25 ml y el aspártico, el glutámico y la glutamina se determinaron mediante HPLC, como se describe en el apartado siguiente.

### **2.7.2. Separación y determinación de aspártico glutámico y glutamina mediante HPLC**

Para la separación y determinación de aspártico, glutámico y glutamina se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Waters (EE.UU.), compuesto por un inyector U6K, conectado a una bomba modelo 501 que creaba un flujo constante de solvente. La salida del inyector estaba conectada a una columna de cromatografía en fase reversa Novapak C<sub>18</sub> de 3,9 mm x 15,0 cm, precedida por una precolumna de 3,9 mm x 4,0 cm rellena de perlas de vidrio, en serie con un detector de fluorescencia Ac-420 provisto de filtros de 338 nm (excitación) y 425 nm (emisión). Los datos obtenidos se procesaron automáticamente mediante un integrador modelo 745. La derivatización y la cromatografía se realizaron como se describe (Marqués *et al.*, 1989). Las muestras de aminoácidos se derivatizaron antes de su inyección, usando 50 µl de cada una ellas e incubándose a temperatura ambiente durante 90 s con 150 µl de una mezcla derivatizante conteniendo 27 mg de o-ftaldialdehído (OPA) disueltos en 0,5 ml de metanol; 4,5 ml de tampón borato sódico 0,4 M, pH 10 y 20 µl de 2-mercaptoetanol. Transcurrido ese tiempo, se inyectaron 40 µl de la muestra. La cromatografía en fase reversa de los OPA-

derivados así obtenidos se llevó a cabo de forma isocrática, empleando como solvente tampón fosfato sódico 20 mM pH 7,5, conteniendo 22 % de metanol y 2 % de tetrahidrofurano, bombeado a través de la columna a un flujo constante de 1 ml/min, creando una presión de aproximadamente 2.400 psi.

### **2.7.3. Determinación de clorofila**

El contenido celular de clorofila  $\alpha$  se determinó espectrofotométricamente, tras someter las células a una extracción de la misma con metanol, siguiendo el método descrito por Mackinney en 1941. Las células contenidas en 0,5-1 ml de suspensión celular, se recogieron mediante centrifugación a 12.000 x g, en una centrífuga Eppendorf y el sedimento se resuspendió en 1 ml de metanol absoluto. Tras agitar vigorosamente durante 2 min, la preparación se centrifugó durante 30 s a 12.000 x g, determinándose la concentración de clorofila en el sobrenadante empleando un coeficiente de extinción de 74,46 ng<sup>-1</sup> ml cm<sup>-1</sup> a 665 nm.

### **2.7.4. Determinación de la cantidad de proteína**

El contenido celular de proteína se determinó directamente en células enteras siguiendo la modificación del método de Lowry *et al.* (1951) descrita por Markwell *et al.* (1978), empleando ovoalbúmina de gallina como patrón.

El contenido de proteína de los extractos crudos y otras preparaciones libres de células se determinó según el método descrito por Bradford (1976), usando el reactivo para proteínas de Bio-Rad (EE.UU.) y siguiendo el procedimiento de microensayo recomendado por el fabricante. Como patrón se empleó ovoalbúmina.

### **2.7.5. Determinación de $\gamma$ -glutamihidroxamato**

El  $\gamma$ -glutamihidroxamato formado en el ensayo de la actividad transferasa de la GS, se determinó por reacción con cloruro férrico en medio ácido (Shapiro y Stadtman, 1970). Para ello, a 1 ml de disolución conteniendo  $\gamma$ -glutamihidroxamato (mezcla de ensayo de la reacción de la GS tras incubación a 30 °C) se le añadían 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido (7,73 ml de HCl al 37 %; 12 g de ácido tricloroacético y 33,3 g de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, llevados a un volumen final de 1 l con H<sub>2</sub>O). La concentración del producto coloreado formado se determinó espectrofotométricamente, utilizando un coeficiente de extinción a 500 nm de 0,89 mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

### **2.7.6. Determinación de amonio**

Para la determinación de amonio se utilizó el reactivo de Nessler's (Merk, Alemania). Para ello, 0,1 ml de solución A (tetraiodomercuriato (II) de potasio) se mezclaban con 0,1 ml de solución B (NaOH) y se llevaba a un volumen final de 1,9 ml con H<sub>2</sub>O, añadiéndose posteriormente 0,1 ml de muestra. La concentración de amonio se estimó espectrofotométricamente a 420 nm, empleando una recta patrón realizada utilizando soluciones con concentraciones conocidas de amonio.

### **2.7.7. Cuantificación de DNA y RNA**

La cantidad de DNA se estimó tras electroforesis de una fracción de la muestra en un gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio. La fluorescencia emitida por las moléculas de bromuro de etidio intercaladas en el DNA de la muestra, tras iluminar con luz ultravioleta, se comparaba con la emitida por las moléculas intercaladas en cantidades conocidas de fragmentos de DNA del fago lambda, también incluidos en el gel.

Alternativamente, el DNA se cuantificaba por su absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a 50 µg/ml de DNA bicatenario o a 20 µg/ml de oligonucleótidos. El RNA se cuantificaba espectrofotométricamente considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a 40 µg/ml de RNA.

### **2.7.8. Determinaciones espectrofotométricas**

Las medidas de absorbancia de luz visible o luz ultravioleta, se realizaron en un espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard 8452A (Alemania) conectado a un ordenador Hewlett Packard (Francia) modelo H.P. Vectra QS/16S o en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Japón).

## **2.8. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEÍNAS**

Para la búsqueda de fases de lectura abierta, localización de sitios de restricción y traducción a proteína de secuencias nucleotídicas, se utilizaron los programas DNA-Strider en su versión 1.1, diseñado por Christian Mark (Service de Biochimie, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Francia) y MacMolly's Heart en su versión 3.0, desarrollado por Ursula Priedomuth y Uwe Schoneberg, Soft

Gene (Alemania) y compilado por A. Hochberg (DuPont de Nemours and Co., EE.UU.).

La conexión con el Centro Informático Científico de Andalucía (CICA) permitió la utilización del paquete informático del Genetic Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin (EE.UU.) (Devereaux *et al.*, 1984) en su versión 7.1 y 8.x y el acceso al banco de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Heidelberg (Alemania). La búsqueda de similitudes de una secuencia con las contenidas en el banco de datos del EMBL/Genbank, se realizó utilizando la aplicación FASTA (Pearson y Lipman, 1988) contenida en el paquete GCG. El alineamiento de secuencias homólogas se realizó utilizando el programa Pileup de este mismo paquete informático, que usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) y mediante arreglo manual. La determinación de los porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos se realizaron utilizando los programas Bestfit y Gap, los cuales se basan en el mejor alineamiento entre dos secuencias, calculando el número de residuos idénticos entre ambas.

Los estudios filogenéticos se llevaron a cabo empleando el paquete informático PHYLIP (Felsenstein, 1989) versión 3.5 p.

### **3. RESULTADOS**

### 3.1. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE LAS Fd-GOGATs (*gltB* Y *gltS*) DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

En este apartado se describe la clonación de los genes estructurales de las ferredoxina glutamato sintasas (Fd-GOGATs) de *Synechocystis* sp. PCC 6803, con objeto de caracterizarlos y poder obtener mutantes afectados en la actividad Fd-GOGAT, a fin de clarificar su papel fisiológico en esta cianobacteria. La expresión de dichas proteínas en *Escherichia coli* nos permitirá obtener las cantidades necesarias para poder llevar a cabo estudios de estructura-función de las mismas, empleando de la mutagenésis dirigida de residuos concretos.

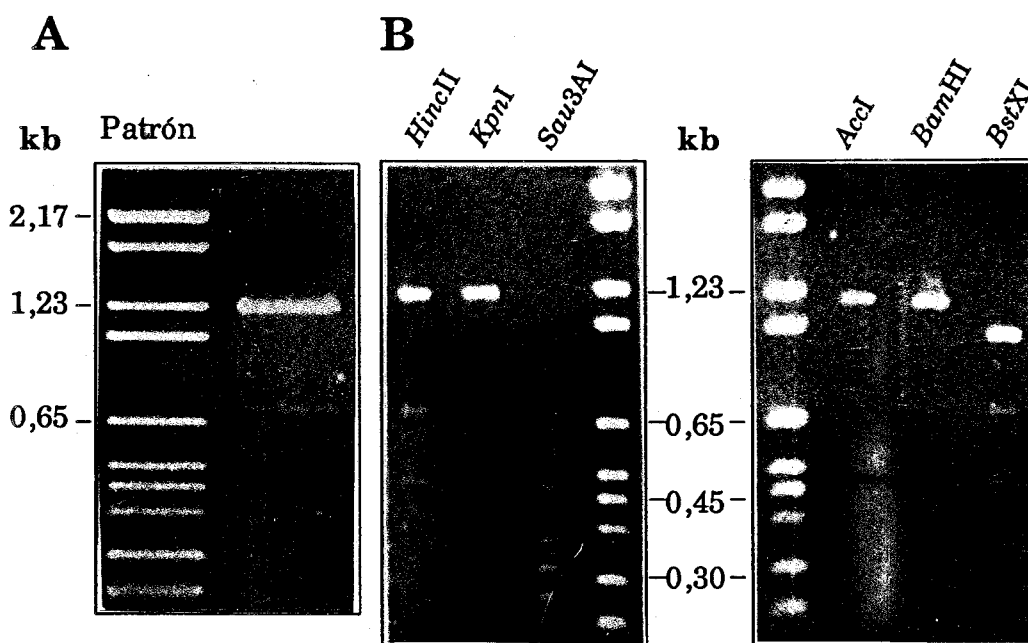
#### 3.1.1. Obtención por PCR de un fragmento de DNA interno a los genes de las glutamato sintasas de *Synechocystis*

Los estudios previos realizados por nuestro grupo en la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 6301, ponían de manifiesto la existencia de una enzima con actividad glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (Marqués *et al.*, 1992). Basándonos en estos resultados, pensamos en la existencia de un único gen que codificase la Fd-GOGAT de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Con objeto de clonar el gen estructural de esta enzima y a partir de la comparación de las secuencias de aminoácidos de las diferentes glutamato sintasas conocidas, se seleccionaron dos oligonucleótidos correspondientes a secuencias internas de las mismas, perfectamente conservadas entre ellas, con el fin de obtener mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de DNA interno a dicho gen. Como oligonucleótido directo se usó el correspondiente a los residuos 1097-1102 de la Fd-GOGAT de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991) idéntico al 998-1003 de la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de *E. coli* (Oliver *et al.*, 1987) y como oligonucleótido reversos el correspondiente a los residuos 1494-1499 y 1395-1400 de las mismas glutamato sintasas.



Utilizando los dos oligonucleótidos indicados, se llevó a cabo la amplificación de DNA, por PCR, según se describe en 2.4.2.3., utilizando como molde DNA total de *Synechocystis*. El resultado de la PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Como se muestra en la figura 3A, una banda de 1,2 kb y otra de 0,7 kb se amplificaron en estas condiciones, siendo la primera de ellas de tamaño similar al fragmento de DNA comprendido entre los oligonucleótidos usados, tanto en maíz como en *E. coli*.

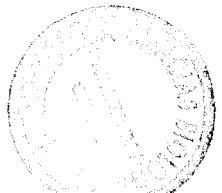
El fragmento de 1,2 kb fue aislado del gel (apartado 2.4.2.5.) y se sometió a digestión con distintas enzimas de restricción. En la figura 3B, carril 1, se muestra la digestión con *HincII*, apareciendo tres bandas de 1,2 kb, 0,7 kb y 0,5 kb, mientras que la digestión con *BstXI* (carril 6) dio 4 fragmentos de 1, 0,7, 0,5 y 0,2 kb. Cuando se utilizó la enzima de restricción *Sau3AI* (carril 3), aparecieron más de cinco fragmentos, cuyo tamaño total fue mayor de 1,2 kb. Estos resultados sugerían, claramente, que la amplificación por PCR daba lugar a dos fragmentos de 1,2 kb, probablemente correspondientes a genes diferentes para glutamato sintasas, aunque no había evidencias previas de la existencia de dos GOGATs en cianobacterias.



**FIGURA 3. Identificación del DNA obtenido mediante amplificación por PCR.**

A, El resultado de la PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

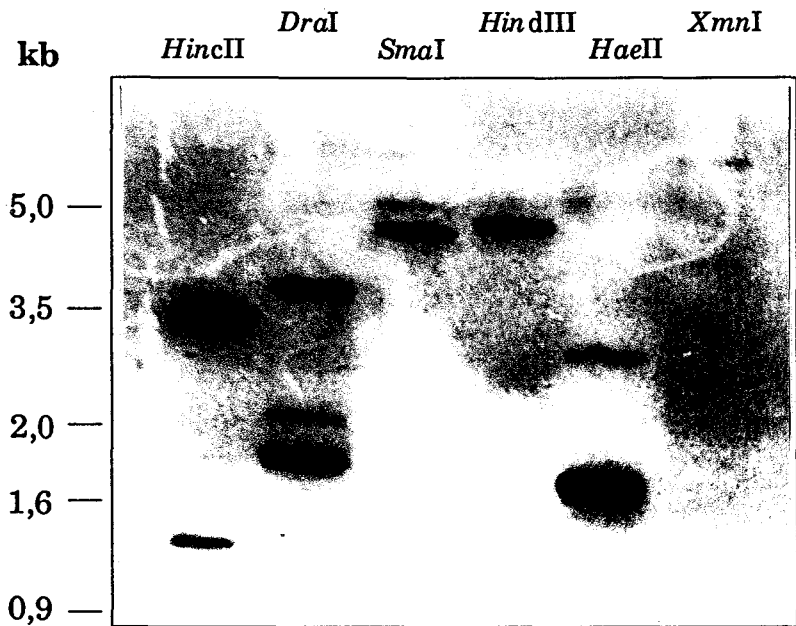
B, Análisis de restricción del producto de PCR de 1,2 kb, digerido con distintas enzimas de restricción.



### 3.1.2. Detección de hibridación homóloga entre la sonda amplificada por PCR y el DNA genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

El fragmento de 1,2 kb obtenido mediante amplificación por PCR, fue usado como sonda para llevar a cabo una hibridación homóloga, usando DNA total de *Synechocystis* digerido con varias enzimas de restricción.

El resultado de la hibridación se muestra en la figura 4. En el carril 2, correspondiente a DNA digerido con *Dra*I, aparecen cuatro bandas de hibridación, siendo tres de ellas mayores de 1,2 kb, mientras que con *Hae*II, carril 5, aparecieron tres bandas, igualmente, mayores que la sonda usada. Teniendo en cuenta estos resultados y el hecho de que habían sido amplificados por PCR dos fragmentos de 1,2 kb, concluimos que las sondas usadas en la hibridación con DNA total de *Synechocystis* hibridaron con dos genes distintos.



**FIGURA 4. Hibridación de DNA total de *Synechocystis* 6803 con la sonda de 1,2 kb amplificada por PCR.**

El DNA de *Synechocystis* 6803 se digirió con las enzimas de restricción que se indican y se hibridó usando como sonda el fragmento de 1,2 kb amplificado por PCR, a 65 °C. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 2.4.2.6.

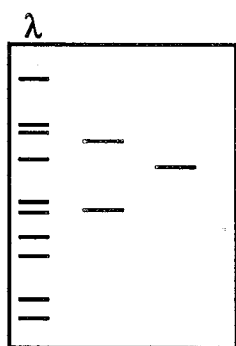


### 3.1.3. Clonación de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803.

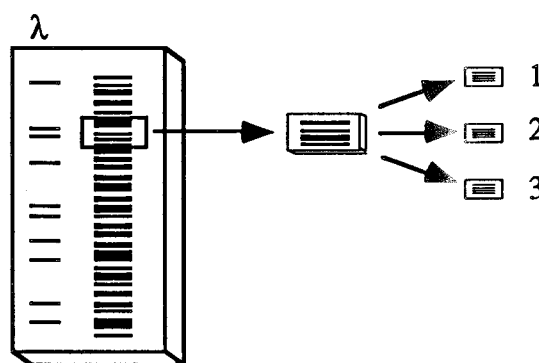
Para el aislamiento de los genes *gltB* y *gltS* se utilizó la estrategia de "clonación mediante construcción de subgenotecas", cuyas etapas fundamentales se esquematizan en la figura 5.

Basándonos en los resultados de la hibridación que se muestra en la figura 4, se procedió a la digestión del DNA genómico y al aislamiento de los fragmentos *Sma*I de 4,9 kb y *Xmn*I de 3,9 kb, los cuales fueron usados para la construcción de librerías genómicas de ADNs de estos tamaños, usando el plásmido pBluescript II SK(+) (pBS) como vector. Estas librerías fueron analizadas mediante hibridación en colonias en *E. coli* MC1061, usando el fragmento de PCR de 1,2 kb como sonda.

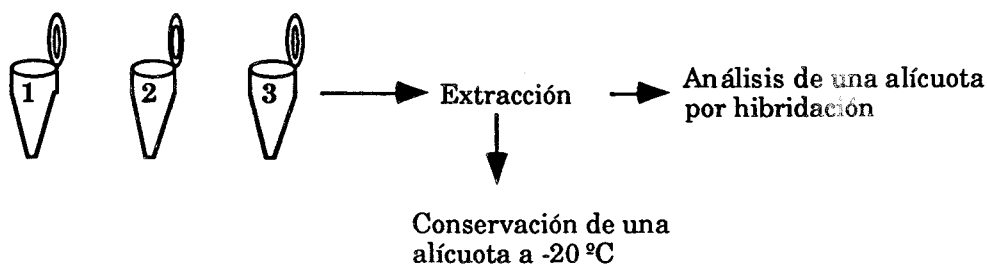
1.- Identificación de bandas de hibridación.



2.- Aislamiento de los fragmentos de DNA del tamaño deseado a partir de un gel preparativo de agarosa



3.- Extracción de los fragmentos contenidos en las distintas fracciones de agarosa.



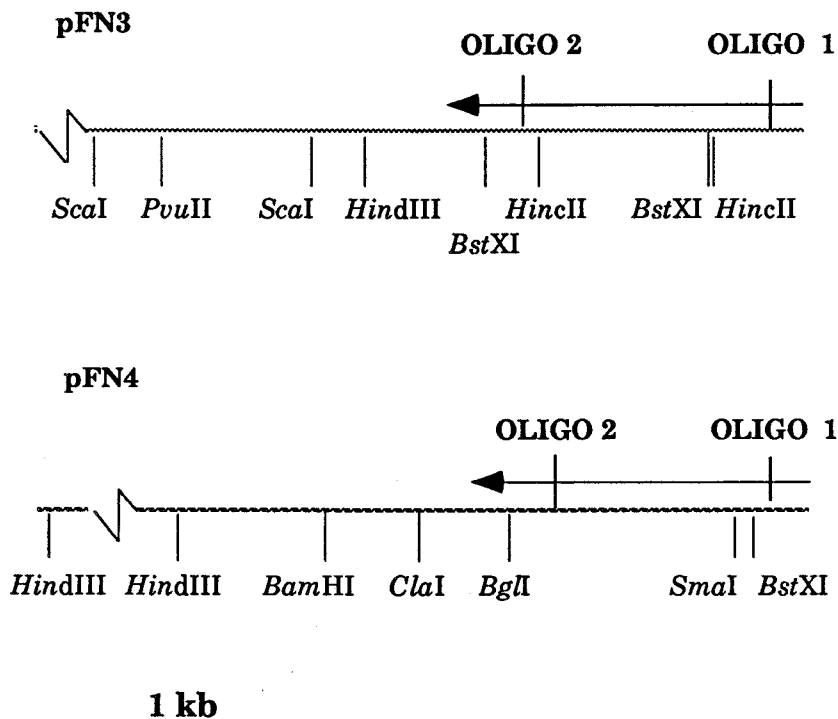
- 4.- Clonación de la fracción que contiene el fragmento deseado en el plásmido pBS.
- 5.- Transformación de *E. coli* MC1061 o HB101 y selección en medio con ampicilina.
- 6.- Transferencia a filtros de nitrocelulosa y conservación de duplicados.
- 7.- Selección de los clones positivos, por hibridación en filtros de nitrocelulosa conteniendo réplicas de las colonias transformantes.

**FIGURA 5. Esquema del proceso de clonación de fragmentos de DNA cromosómico mediante construcción de una subgenotecas.**

Se muestran las etapas principales del proceso desde la detección de secuencias homólogas a la sonda utilizada, hasta la obtención de clones de *E. coli* que contienen el fragmento deseado clonado en el plásmido.

De los más de 200 clones analizados para cada una de las subgenotecas, fueron seleccionados dos conteniendo el fragmento *Xmn*I y uno conteniendo el fragmento *Sma*I. Los plásmidos obtenidos a partir de estos clones se denominaron pFN3, en el caso de *Xmn*I (idénticos para los dos clones) y pFN4, para la subgenoteca con *Sma*I, mostrando sus mapas de restricción, claras diferencias entre ellos, figura 6.

Los insertos contenidos en los plásmidos pFN3 y pFN4 fueron secuenciados por sus extremos por el procedimiento de la terminación de cadenas de didesoxinucleótidos, utilizando como cebadores oligonucleótidos comerciales cuyas secuencias complementarias se encontraban localizadas en pBS a ambos lados de los insertos clonados. Se identificaron de esta forma secuencias homólogas a los genes *gltB* de *E. coli* (subunidad grande de la NADPH-GOGAT) y *glsF* de maíz (Fd-GOGAT), en uno de los extremos de cada uno de los insertos.



**FIGURA 6. Mapas de restricción de los insertos de DNA de *Synechocystis* contenidos en los plásmidos pFN3 y pFN4.**

Mapas de restricción de los fragmentos *XmnI* y *SmaI* clonados. Las flechas indican la localización de los genes de las glutamato sintasas, así con su sentido de transcripción. Los oligos 1 y 2 corresponden a los oligonucleótidos usados para la amplificación, por PCR, del fragmento de 1,2 kb.

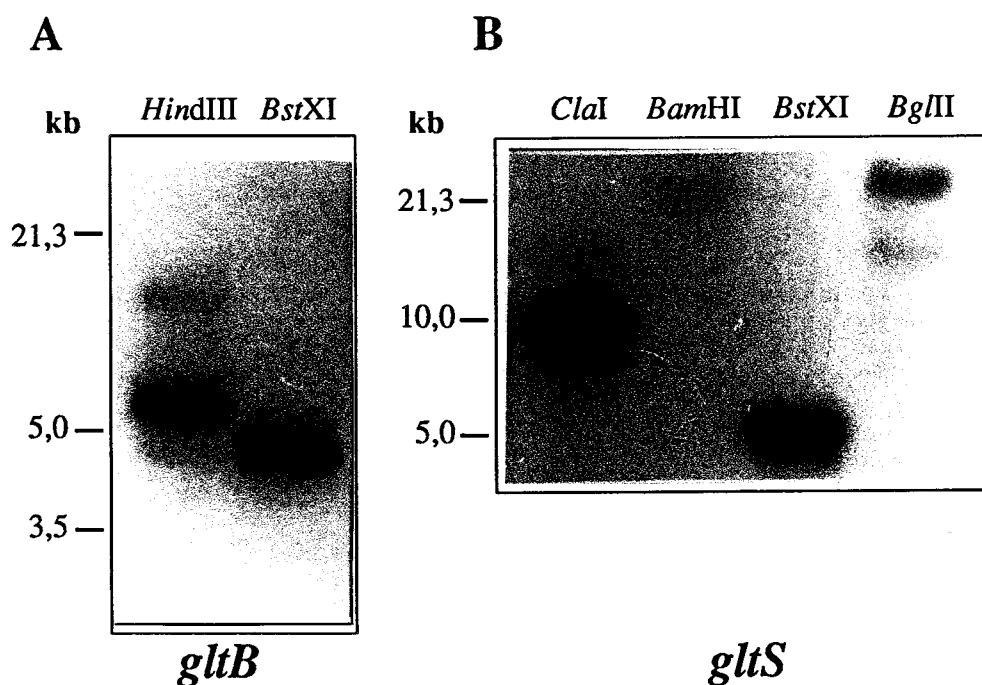
La comparación con *glsF*, de las dos secuencias obtenidas de los insertos contenidos en pFN3 y pFN4, confirmó la existencia de dos genes diferentes para la glutamato sintasa, denominados, desde este momento, *gltB* (pFN3) y *gltS* (pFN4), con una alta homología entre ellos, en las zonas secuenciadas figura 7.

<i>gltB</i>	I P L E E V E P I E A I M K R F K T G A M S Y G S I S K E A H E S L A I A M N R I G G K S N T
<i>gltS</i>	.....E A H E T L A I A M N R L G A K S N S
<i>glsF</i>	I P I G K V E S A T S I V E R F C T G G M S L G A I S R E T H E A I A I A M N R I G G K S N S 994
<i>gltB</i>	.....
<i>gltS</i>	G E P P E D V V R Y L S L D D V D S E G N S P T L P H L.....
<i>glsF</i>	G E G G E D P I R W N P L T D V V D G Y S P T L P H L K G L Q N G..... 1028

**FIGURA 7. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los insertos de DNA de *Synechocystis* contenidos en los plásmidos pFN3 y pFN4.**

*gltB* y *gltS*, corresponden a los dos genes de las glutamato sintasas de *Synechocystis* y *glsF* corresponde al gen que codifica la Fd-GOGAT de maíz. La comparación de las secuencias se hizo usando el programa Pileup. Los números indican la posición del último residuo.

Teniendo en cuenta la masa molecular relativa descrita para las Fd-GOGATs de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992) y maíz (Sakakibara *et al.*, 1991), aproximadamente 160 kDa, procedimos a la clonación completa de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803, esperando un tamaño medio de 5,5 kb. Se usaron sondas internas a cada uno de los genes, para llevar a cabo una nueva hibridación homóloga con DNA genómico de esta cianobacteria digerido con distintas enzimas de restricción. El resultado de la hibridación muestra la existencia de reacción cruzada de los dos genes con las sondas utilizadas, sugiriendo una alta homología entre ellos, figura 8.

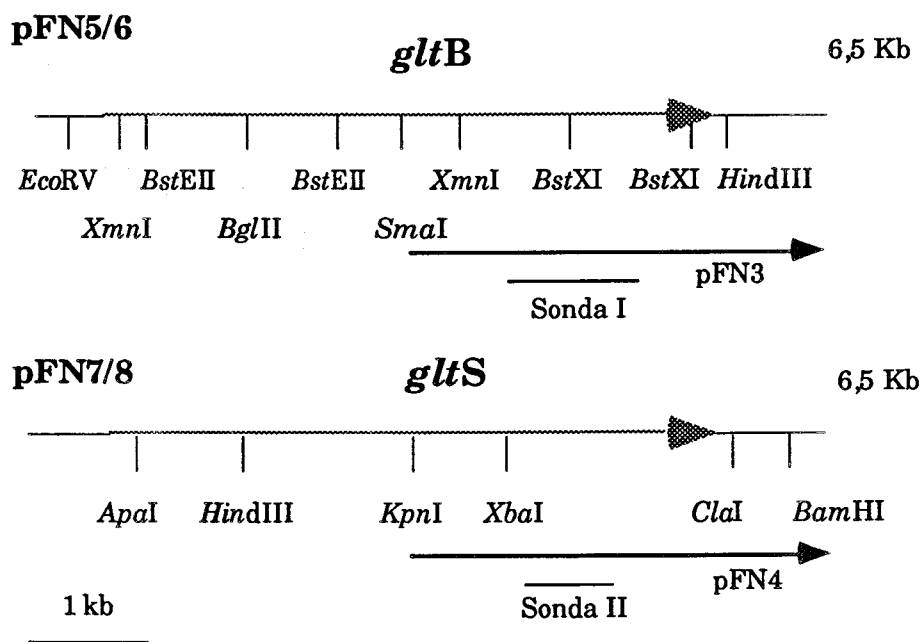


**FIGURA 8. Análisis mediante hibridación homóloga de DNA total de *Synechocystis*, usando como sondas fragmentos internos a los genes *gltB* y *gltS*.**

El DNA de *Synechocystis* se digirió con las enzimas de restricción que se indican y se hibridó a 65 °C con los fragmentos internos a los genes *gltB* y *gltS*, mostrados en la figura 9. Las condiciones experimentales se detallan en 2.4.2.6.

Basándonos en los mapas de restricción de pFN3 y pFN4, en el tamaño esperado de los genes, aproximadamente 5,5 kb y en el resultado de la hibridación mostrada en la figura 8, nos propusimos clonar los genes *gltB* y *gltS* completos, construyendo dos genotecas de fragmentos *HindIII* de aproximadamente 6,3 kb (Fig. 8A, carril 1) y fragmentos *ClaI* de aproximadamente 9,3

kb (Fig. 8B, carril 1), las cuales fueron analizadas por hibridación en colonias de *E. coli* HB101, usando las sondas utilizadas en la hibridación mostrada en la figura 8. De los 256 clones analizados para *gltB* fueron positivos dos (fragmentos *Hind*III) y catorce de los 477 de *gltS* (fragmentos *Cla*I). De estos clones se aislaron los plásmidos pFN5 y pFN6, que solapan con el inserto contenido en pFN3 y se extienden 4 kb hacia la zona 5', comprendiendo la totalidad del gen *gltB*, y pFN7 y pFN8, que solapan con el inserto contenido en pFN4 y se extienden 7 kb hacia la zona 5', conteniendo el gen *gltS* completo. En la figura 9 se muestran los mapas de restricción de los insertos contenidos en pFN5/6 y pFN7/8.



**FIGURA 9. Mapas de restricción de los insertos contenidos en los plásmidos pFN5/6 (*gltB*) y pFN7/8 (*gltS*).**

Se muestran los mapas de restricción de los insertos contenidos en los plásmidos pFN5/6 y pFN7/8, conteniendo los genes *gltB* y *gltS*, con las enzimas de restricción más relevantes. Las flechas finas indican los fragmentos de los plásmido pFN3 y pFN4 equivalentes a los plásmidos mostrados en la figura.

### 3.1.4. Secuenciación y análisis de los insertos de pFN5 y pFN7 que contienen los genes *gltB* y *gltS*.

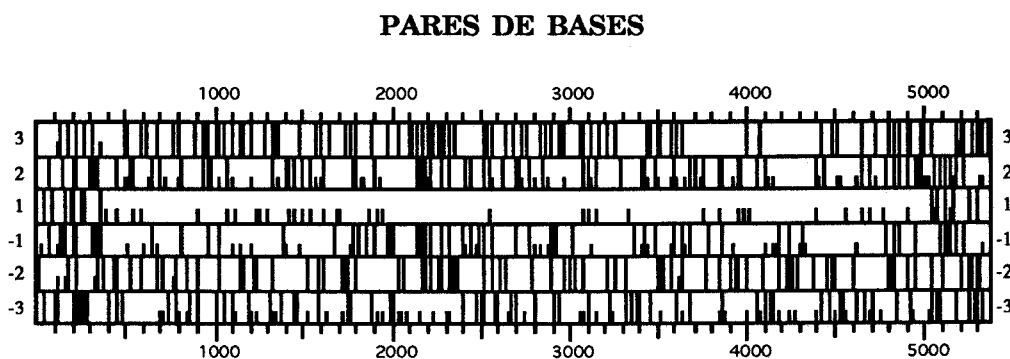
Dado que los insertos contenidos en pFN5 y pFN7 parecían contener la totalidad de los genes *gltB* y *gltS*, se procedió a la secuenciación de estos

fragmentos, utilizando para ello deleciones seriadas realizadas con exonucleasa III como se describe en el apartado 2.4.5.1.

La secuenciación se llevó a cabo por el procedimiento de la terminación de cadenas con didesoxinucleótidos (2.4.5.2.). De las deleciones se obtuvieron fragmentos de secuencias parciales de longitud variable que se superpusieron para obtener la secuencia lineal completa. La estrategia de secuenciación se siguió en las dos cadenas del DNA.

#### 3.1.4.1. Secuencia del gen *gltB*.

La secuencia de nucleótidos del inserto contenido en el plásmido pFN5 se determinó en las dos cadenas. Mediante el análisis por ordenador de las 5367 pb se determinaron las zonas de lectura abierta (ORFs) en las seis fases posibles. El resultado de este estudio se muestra en la figura 10.



**FIGURA 10. Análisis de las posibles fases de lectura abierta existentes en el fragmento de DNA de *Synechocystis* 6803 que contiene el gen *gltB*.**

Las líneas verticales cortas indican codones que codifican el aminoácido metionina; las líneas verticales largas indican codones de terminación de la traducción. El estudio se realizó utilizando el programa DNA-Strider (2.8).

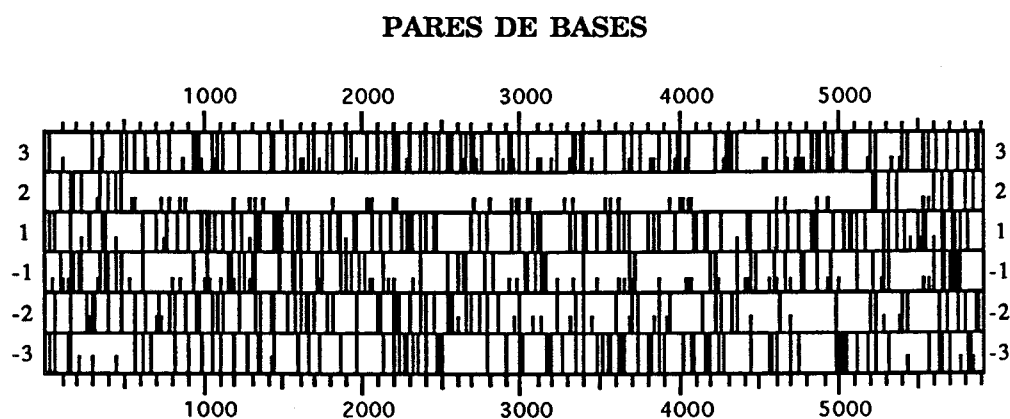
Del análisis de las fases de lectura abierta, tan sólo la correspondiente a la fase 1 en la figura 10, presentaba el tamaño adecuado para codificar la glutamato sintasa, *GltB*, de *Synechocystis* 6803. Ésta, de 4650 pb, daría lugar a una proteína de 1550 residuos con una masa molecular de 168.964 Da, lo cual estaría de acuerdo con el tamaño determinado para otras Fd-GOGATs (Marqués *et al.*, 1992).



Como se muestra en la figura 11, aparecen en la secuencia de *gltB* dos codones putativos de iniciación de la traducción, ATG, precedidos por posibles secuencias de unión a ribosomas (secuencias de Shine-Dalgarno). Igualmente, en la zona 3' del gen aparecen dos secuencias de DNA complementarias que podrían actuar como terminadores de la transcripción.

### 3.1.4.2. Secuencia de *gltS*.

Utilizando el plásmido pFN7 se llevó a cabo la secuenciación, en doble cadena, de la mayor parte del inserto contenido en este plásmido. La secuenciación se llevó a cabo de la misma forma que se ha indicado para *gltB*, utilizando fragmentos de secuencia de longitud variable, obtenidos por deleciones seriadas con la exonucleasa III. Se secuenciaron un total de 5914 pb, de los que se determinaron las zonas de lectura abierta (ORFs) contenidas en las seis fases, figura 12.



**FIGURA 12. Análisis de las posibles fases de lectura abierta existentes en el fragmento de DNA de *Synechocystis* 6803 que contiene el gen *gltS*.**

Las líneas verticales cortas indican codones que codifican el aminoácido metionina; las líneas verticales largas indican codones de terminación de la traducción. El estudio se realizó utilizando el programa DNA-Strider (2.8.).

Del análisis de las fases de lectura abierta, sólo la correspondiente a la fase 2 en la figura 10, presentaba el tamaño adecuado para codificar la glutamato sintasa, GltS, de *Synechocystis* 6803. Esta fase presenta un tamaño de 4674 pb y codificaría una proteína de 1558 residuos con una masa molecular de 170.208 Da, tamaño similar al de otras Fd-GOGATs y a la proteína que codificaría el gen *gltB* de *Synechocystis*.





En la figura 13 se muestra la secuencia nucleotídica y la deducida de aminoácidos de parte del fragmento de DNA de *Synechocystis* contenido en el plásmido pFN7. La secuencia de aminoácidos correspondiente al gen *gltS*, al igual que la correspondiente al gen *gltB*, presenta dos posibles metioninas de iniciación de la proteína, precedidas por posibles secuencias de unión de ribosomas (secuencias de Shine-Dalgarno). En la zona 3' aparecen dos secuencias de nucleótidos complementarias que podrían actuar como terminador de la transcripción.

### **3.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS GENES *gltB* Y *gltS* DE *Synechocystis*. COMPARACIÓN CON OTRAS GLUTAMATO SINTASAS**

Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* se compararon con las secuencias disponibles en los bancos de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL, Heidelberg y GenBank) (2.8.).

#### **3.2.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de glutamato sintasas.**

El resultado de la comparación del producto de los genes *gltB* y *gltS* con la subunidad grande de las NADPH-GOGATs de bacterias, las Fd-GOGATs y NADH-GOGATs disponibles, reveló la existencia de una alta homología entre ellas, lo que confirmaba que tanto *gltB* como *gltS* codificaban glutamato sintasas.

En la figura 14 y 15 se muestran los alineamientos entre las secuencias de glutamato sintasas disponibles, así como la localización de los posibles dominios funcionales: dominio de unión glutamina amido transferasa, sitio de maduración, sitio de unión del centro sulfoférico [3Fe-4S] y sitio de unión de FMN.







Alfalfa	.....	.....	KPSEAPKRPQVTD	VKHRGFVAYEREVQ	YRDPNVRNLNDWNEVM	1708
<i>P. boryanum</i>	.....	.....	.....M	GKPTGPIEYLRRLPS	ELAPLDRIRNWDFPH	30
<i>S. cerevisiae</i>	.....	.....LKEPKVVDLED	AVPDSKQLEKNSERI	EKTRGPMIHKRRHET	HRDPRTRVNDWKEP	1667
<i>A. brasilense</i>	.....	.....	.....MAN	QRMLGFVHTAQRPMD	KRPAERRODFAEIY	33
<i>E. coli</i>	.....	.....	.....MS	QNVYQFIDLQRVDDP	KKPLKIRKIEFVEIY	32
				*	*	
Alfalfa	METKPGPLLKTQSAR	CMDCGTPPFCHQE...	...NSGCPLGNKIPE	FNELVYQNRWQEALE	RLELTNNFFFTGRV	1777
<i>P. boryanum</i>	L.SMPEENLRTOGAR	CMDCGIPFCHTGTLI	SGMASGCPINNLIPE	WNDLIYRGLWKEALD	RLHKTNNFFFTGRV	105
<i>S. cerevisiae</i>	TNPITKDKAKYQTAR	CMDCGTPPCLSDT...	.....GCPLSNIIIPK	FNELLPKNQWKLALD	KLELTNNFFFTGRV	1735
<i>A. brasilense</i>	.ARFSDERANEQANR	CSQCGVPPFCQVH...	.....CPVSNINIPD	WLKLTSEGRLEEAYE	VSQATNNFFFTGRV	98
<i>E. coli</i>	.EPFSEARPKRRLTA	ACRAANPYCEWK...	.....CPVHNYIPN	WLKLANEGRIFEAEE	LSHQNTNLFVCGRV	97
		* *	* * * * *	*	* * * * *	
Alfalfa	CPAP..CEGSCVLGI	IE.NPVSIKNIIECAI	IDKAFEEGWMIPRPP	VKRTGKRVAVGSGP	SGLAADQLNKMIGHI	1849
<i>P. boryanum</i>	CPAP..CEGSCVLGI	HN.PPVTIKNIEYSI	AEKWNEGWIKPEPP	AKRTGKKIAIVGSGP	AGLSAAAQLNKVGHW	177
<i>S. cerevisiae</i>	CPAP..CEGACTLGI	IE.DPVGKISVERII	IDNAFKEGWIKPCPP	STRTGPTVGVIGSGP	AGLACADMLNRAAGT	1807
<i>A. brasilense</i>	CPQDRLECEGNCVIEQ	STHGAVTIGSVEKII	NDTAWDQGWKPRTP	SRELGLSVGVIGAGP	AGLAAAEELRANGYE	173
<i>E. coli</i>	CPQDRLECEGNCVIEQ	.EFGAVTIGNIKRYI	NDKAFEMGWRPDMG	VKQTKKVAIVIGAGP	AGLACADVLTNRGVK	171
	**	* * * *	* *	*	* * * *	* *
Alfalfa	VTYFERADRIIGGLM	YGVPMKTKDQVDIVQ	RRVNMAEEGINFVV	NANIGLDPLYSLERL	REENDAVLAVGATK	1924
<i>P. boryanum</i>	VTYFERADRIIGGLM	YGVPMKTKDQVDIVQ	RRVNMAEEGINFVV	NANIGLDPLYSLERL	REENDAVLAVGATK	250
<i>S. cerevisiae</i>	VTVYERSDRCGGLM	YGIPNMKLDKQEVVM	RRVNLLEAEGVVFVC	NTEIGKD..LPAEDL	LRDFDAVVLCTGATK	1879
<i>A. brasilense</i>	VHVDYDRDMGGLLV	YGIPGFKLEK.SVVE	RRVKKLADAGVIYHP	NFEVGRD..ASLPEL	RRKHNAVLVATGVYK	245
<i>E. coli</i>	AVCFDRHPEIGLLT	FGIPAFKLEK.EVMT	RRREIPTGMGIEPKL	NTEVGRD..VQLDDL	LSDYDAVFLGVGTQY	243
	*	* * * *	* * *	*	*	*
Alfalfa	P.RDLPVPGRELSGV	HFAMEFLHANTKSL	DSNLQD..GNYISAK	GKKVVVIGGGDTGTD	CIGTSIRHGCTAVVN	1996
<i>P. boryanum</i>	P.RDLPVPGRELSGV	HFAMEFLHANTKSL	DSNLQD..GNYISAK	GKKVVVIGGGDTGTD	CIGTSIRHGCTAVVN	319
<i>S. cerevisiae</i>	P.RDLPVPGRELSGV	HFAMEFLHANTKSL	DSNLQD..GNYISAK	GKKVVVIGGGDTGTD	CIGTSIRHGCTAVVN	1950
<i>A. brasilense</i>	P.RDLPVPGRELSGV	HFAMEFLHANTKSL	DSNLQD..GNYISAK	GKKVVVIGGGDTGTD	CIGTSIRHGCTAVVN	317
<i>E. coli</i>	SMRQGLNEDADGCT	QRCRSSPTPN..SL	MGPGETRDEPFVSM	GKKVVVIGGGDTGTD	CVRTSVRQGANV..	314
	*	*	*	* * * * *	* * * * *	
Alfalfa	LELLPQPPPTAPGN	PWPQWRIFRVDYGH	QEAETKFGKDPRTYE	VLTKRFVGDENGVVK	GLEVVRCWEKDE..	2069
<i>P. boryanum</i>	LELLPQPPPTAPGN	PWPQWRIFRVDYGH	QEAETKFGKDPRTYE	VLTKRFVGDENGVVK	GLEVVRCWEKDE..	392
<i>S. cerevisiae</i>	FELLPEPVERAKDN	PWPQWRVVRVDYGH	AEVKEHYGRDPREYC	ILSKEP IGNDGEVVT	AIRTVRVEWKKSQ..	2025
<i>A. brasilense</i>	.....KCLYRRDRK	NMPGSQR..EVAHAE	EEGVE.....FIWQ	AAPEGF..TGDTVVT	GVRAVRHLGVADA.	375
<i>E. coli</i>	.....TCAYRDEE	NMPGSRR..EVKNAR	EEGVE.....FKFN	VQPLGIEVNGNGVKS	GVKMTVTEMGEPDAK	375
	*	*	*	*	*	
Alfalfa	.....	...TGKPFQKEIEGS	EEIIEADLVLLAMGF	LGPEATIAEKLGV..	.RDNRSNFKA.DYGR	2123
<i>P. boryanum</i>	.....	...QGQFIPKQIPGT	EKIIPAQLVLLAMGF	LGPEQPLLDAMGLD.	.RDARSNIKS.EYGR	446
<i>S. cerevisiae</i>	.....	...SGVWQVMEIPNS	EEIIEADLVLLAMGF	VGPELIGNDNEVK..	.KTRRGTIATLDSS	2078
<i>A. brasilense</i>	.....T	GRQTPQVI...EGS	EFTVQADLVIKALG.	.FEPEDLPNAFDEPE	LKTRWGTLLVDHRT	437
<i>E. coli</i>	ASPRGDRCFRTYRT	GRCGDHGVWFRPHNM	EWLAKHSVELDSQGR	IIAPEGSDNAPQTSN	PK.....	437
			*	*		
Alfalfa	FSTSVQVFAAGDCR	RQSLVVWVAISEGRQ	AAAQVDSYLTNEDHG	IDGNQDEFVKRQDDL	NGKHSKHTVMT.	2194
<i>P. boryanum</i>	YTSIPKVFVAAGDCR	RQSLVVWVAISEGRQ	AARECDLYMGETNL	P.....	.....	492
<i>S. cerevisiae</i>	YSIDGKTFACGDCR	RQSLVVWVAISEGRQ	CAASVDKFLMDGTY	LPSNGGIVQRDYKLL	KELASQV.....	2146
<i>A. brasilense</i>	KMTNMDGVFAAGDIV	RGASLVVVAIRDGRD	AGRGRHRLRQEGERG	TGCRGG.....	.....	488
<i>E. coli</i>	.....IPAGGDIV	RGSDLVVVAIAEGRK	AADGIMNWEV....	.....	.....	471
		* * *	* * * * *			

**FIGURA 15. Comparación de las secuencias de aminoácidos de glutamato sintasas.**

Las secuencias correspondientes a las subunidades pequeñas de las NADPH-GOGATs de *E. coli* y *A. Brasilense* se compararon con la correspondiente subunidades de la NADH-GOGAT de la cianobacteria *P. boryanum* y con las NADH-GOGATs de alfalfa y *S. cerevisiae*. Los asteriscos indican identidades en todas las secuencias. Los números indican la posición del último residuo.

### 3.2.2. Dominio glutamina amido transferasa de las glutamato sintasas.

El sitio de unión glutamina amido transferasa incluye una región, residuos 43-102 de la proteína GltB y residuos 37-96 de GltS de *Synechocystis*, muy similares a la misma región de otras GOGATs y similar al dominio glutamina amido transferasa de las glutamina amido transferasas tipo *pur-F* (Mei y Zalkin, 1989; 1990; Pelanda *et al.*, 1993). Una segunda región de las proteínas GltB, residuos 250-260, y GltS, residuos 238-248, de esta cianobacteria, es similar a este mismo dominio en las amido transferasas tipo *trp-G*, dominio que aparece también en el resto de glutamato sintasas (Mei y Zalkin, 1989; 1990; Pelanda *et al.*, 1993). Estos dominios contienen una cisteína conservada implicada en la liberación del grupo amido de la glutamina (Mei y Zalkin, 1989; 1990), que, en el caso de las GOGATs, aparece sólo en la región amino terminal de éstas, en la región similar a las glutamina amido transferasas tipo *pur-F* (residuos 27-102). La figura 16 muestra sólo las dos GOGATs de *Synechocystis* 6803.

<i>E. coli</i> -Pur1	1	CGIVGIA	25	HRG...QDAAGIIT	99	LAHNGNLTNA	185	DPNG
<i>B. sub</i> -Pur1	1	CGVFGIW	25	HRG...QEGAGIVA	99	LAHNGNLVNA	172	DPNG
<i>R. leg</i> -NodM	2	CGIVGIV	26	YRG...YDSSGVAT	95	VVHNGIENG	171	RNAG
<i>Syn.</i> GltB	43	CGVGFIV	72	HRGACGCEPNTGDG	250	LVHSRFSTNT	390	DRNG
<i>Syn.</i> GltS	37	CGVGFIA	66	HRGGCDNADSGDG	238	VYHRRFSTNT	381	DRNG
		▲▲		▲▲		▲		▲

**FIGURA 16.** Alineamiento de las secuencias correspondientes a los dominio glutamina amido transferasas de las glutamato sintasas de *Synechocystis*, GltB y GltS, con la región que incluye el dominio glutamina amido transferasa de las glutamina amido transferasas.

Las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas, de *Synechocystis*, GltB y GltS, se compararon con las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas disponibles y con las secuencias de glutamina amido transferasas tipo *pur-F* que se indican (Pelanda *et al.*, 1993). Con ▲ se señalan los residuos conservados en las secuencias de glutamina amido transferasas. *E. coli*-Pur1 y *B. sub*-Pur1 (fosforibosil pirofosfato amido transferasas de *E. coli* y *Bacillus subtilis*); *R. leg*-NodM (*Rhizobium leguminosarum* NodM); *Syn* (*Synechocystis* 6803).

### 3.2.3. Sitio de maduración de las glutamato sintasas.

La cisteína descrita en el apartado anterior como implicada en la liberación del grupo amido de la glutamina, parece ser un sitio específico reconocido por una proteasa para dar lugar a la subunidad grande madura de la



NADPH-GOGAT de bacterias (Oliver *et al.*, 1987), a la NADH-GOGAT madura de *S. cerevisiae* (Cogoni *et al.*, 1995) y a la Fd-GOGAT madura de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991), independientemente del péptido de tránsito de ésta. En el caso de GltB y GltS de *Synechocystis*, estas cisteínas corresponden a los residuos 43 y 37, respectivamente y son reconocidas en las glutamato sintasas de *Synechocystis* expresadas en *E. coli*, dando lugar a las proteínas maduras (3.5.4).

Maíz	GACGVGFV	98
<i>Antithamnion</i>	DACGVGFI	32
<i>P. purpurea</i>	DACGVGFI	39
<i>P. boryanum</i> GlsF	DACGVGFI	44
<i>Synechocystis</i> GltS	DACGVGFI	42
<i>Synechocystis</i> GltB	DACGVGFI	48
<i>P. boryanum</i> GltB	DACGVGFI	29
<i>S. cerevisiae</i>	DACGVGFV	59
Alfalfa	DSCGVGFV	107
<i>A. Brasilense</i>	DACGVGFI	42
<i>E. coli</i>	DNCGFGLI	48

▲

**FIGURA 17. Alineamiento de las secuencias correspondientes al sitio de maduración de las glutamato sintasas de *Synechocystis*, GltB y GltS, con las GOGATs disponibles.**

Las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas de *Synechocystis*, GltB y GltS, se compararon con las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas disponibles. Se muestra la zona amino terminal, donde aparece el sitio de maduración. Con ▲ se indica la cisteína reconocida por la proteasa para la maduración de las glutamato sintasas.

### 3.2.4. Sitio de unión de FMN de las glutamato sintasas.

Tanto GltB como GltS, así como el resto de secuencias de glutamato sintasas, presentan una región de unión de FMN con bastantes residuos idénticos a esa misma región del flavocitocromo  $b_2$  de *Saccharomyces cerevisiae* (figuras 14 y 18). Estos dominios comprenden los residuos 1027-1134 y 1051-1158 de las proteínas GltB y GltS respectivamente, y poseen dos residuos críticos, D1118/K1122 y D1142/K1146 (para GltB y GltS), correspondientes al D419 y a la R423 del flavocitocromo  $b_2$  de *S. cerevisiae*, los cuales interaccionan con la cadena ribitil del FMN (Chapman *et al.*, 1991).



Espinaca	LAQ.LIY.D.	..LHQINPKA	KVSVKLV...	AEAGIGTVAS	GVAKGNADII	QVSGHDGGTG	1026
Maíz	LAQ.LIY.D.	..LHQINPKA	KVSVKLV...	SEAGIGTVAS	GVSKANADII	QISGHDGGTG	1158
<i>Antithamnion</i>	LAQ.LIF.D.	..LHQINPDA	QVSVKLV...	ASLGIGTIAA	GVAKGNADII	QISGHDGGTG	1087
<i>P. pupurea</i>	LSQ.LIF.D.	..LHQINPTA	KISVKLV...	SEIGIGTIAA	GVAKGNADII	QISGHDGGTG	1091
<i>P. boryanum</i> GlsF	LAQ.LIF.D.	..LHQINPLA	QVSVKLV...	AEVGIGTIAA	GVAKANADII	QISGHDGGTG	1101
<i>Synechocystis</i> GltS	LAQ.LIY.D.	..LLQINPEA	QVSVKLV...	AEIGIGTIAA	GVAKANADII	QISGHDGGTG	1103
<i>Synechocystis</i> GltB	LAE.LIH.D.	..LKNANREA	RINVKLV...	SEVGVGTIAA	GVAKAHADV	LVSGYDGGTG	1079
<i>P. boryanum</i> GltB	LAE.LIH.D.	..LKNANRDA	RISVKLV...	SEVGVGTIAA	GVSKAHADV	LISGYDGGTG	1059
<i>S. cerevisiae</i>	LKQ.LIY.D.	..LKCANPRA	GISVKLV...	SEVGVGIVAS	GVAKAKADHI	LVSGHDGGTG	1114
Alfalfa	LAQ.LIH.D.	..LKNANPAA	RISVKLV...	SEAGVGVAS	GVAKGHAHV	LISGHDGGTG	1175
<i>A. brasilense</i>	LAQ.LIY.D.	..LKQINPDA	KVTVKLV...	SRSIGITIAA	GVAKANADII	LISGNSGGTG	1067
<i>E. coli</i>	LAQ.LIF.D.	..LKQVNPKA	MISVKLV...	SEPGVGTIAT	GVAKAYADLI	TIAGYDGGTG	1059
<i>S.c.b2</i>	IDPSLTWKDI	EELK.KKTKL	PIVIKGVQRT	EDVI.....	...KAA.EIG	V.SGVVL.SM	370
		* * *	* *		*	*	
Espi	ASPISSIKHA	GGPWELGLSE	THQTLISNGL	RERVILRV	GLKCGVDVMM	AAAMGADEY	1096
Maíz	ASPISSIKHA	GGPWELGLTE	TNQTLIQNG	RERVILRV	GFRSQDVL	AAAMGADEY	1228
<i>Antithamnion</i>	ASPLSSIKHA	GAPWDVGLAE	VHTTLVENS	REKVILRV	GLRTGKDII	AALMGAEEF	1157
<i>P. pupurea</i>	ASPLSSIKHA	GSPWELGLSE	VHQLLAENQ	RDRVTLRV	GLRTGSDIV	AALMGAEEF	1151
<i>P. boryanum</i> GlsF	ASPLSSIKHA	GSPWELGLTE	VHRVLMENQ	RDRVILRV	GIKTGWDV	GALMGAEEY	1161
<i>Synechocystis</i> GltS	ASPLSSIKHA	GSPWELGVTE	VHRVLMENQ	RDRVILRAD	GLKTGWDV	AALMGAEEY	1173
<i>Synechocystis</i> GltB	ASPQTSIKHA	GLPWELGLAE	THQTLVNL	RSRIVVETD	QMKTRDVA	AALMGAEEF	1149
<i>P. boryanum</i> GltB	ASPQTSIKHA	GLPWELGLAE	THQTLVNL	RSRIVVEAD	QMKTRDV	AALMGAEEF	1119
<i>S. cerevisiae</i>	AARWTSVKYA	GLPWELGLAE	THQTLVNDL	RRNVVQTDG	QLRTGFDAV	AVLLGAESFT	1174
Alfalfa	ASRWTGKISA	GLPWELGLAE	THQTLVANDL	RGRTTLQTD	QLKTGRDVA	AALMGAEEY	1245
<i>A. brasilense</i>	ASPQTSIKFA	GLPWEMGLSE	VHQTTLNRL	RHRVRLRTD	GLKTGRDVI	AALMGAEEF	1137
<i>E. coli</i>	ASPLSSVKYA	GCPWELGLVE	TQQALVANG	RHKIRLQVD	GLKTGVDIK	AALMGAESF	1129
<i>S.c.b2</i>	HGGRQ.LDFS	RAPIEV.LAE	TMPILQORN	KDKLEVFVD	GVRRTDVLK	ALCLGAKGV	441
		* * *	* *	▲	▲ * *	**	

**FIGURA 18.** Alineamiento de las secuencias correspondientes al dominio de unión de FMN de las glutamato sintasas de *Synechocystis*, GltB y GltS, con las de las GOGATs disponibles y con el flavocitocromo  $b_2$  de *S. cerevisiae*.

Con ▲ se indican los residuos D y K implicados en la interacción con el grupo ribitol del FMN. Los asteriscos indican identidades en todas las secuencias.

### 3.2.5. Sitio de unión del centro sulfoférrico de las glutamato sintasas.

Una región muy conservada entre todas las GOGATs corresponde al centro 3Fe-4S único encontrado en las Fd-GOGATs, así como en la subunidad grande de las NADPH-GOGATs, aunque en bacterias se han localizado dos centros hierro-azufre en la subunidad pequeña de la NADPH-GOGAT (Vanoni *et al.*, 1991). Este dominio comprende una región rica en cisteínas en las proteínas GltB (C1150, C1156 y C1161) y GltS (C1174, C1180 y C1185) de *Synechocystis* que pueden alinearse con cisteínas similares de las otras secuencias de glutamato sintasas (Knaff *et al.*, 1991), figura 19. El espaciamiento de este dominio, CX<sub>6</sub>CX<sub>4</sub>C, ha sido también descrito de las enzimas fumarato reductasa de *E. coli* y succinato deshidrogenasa de *B. subtilis*, las cuales contienen también un centro 3Fe-4S (Johnson *et al.*, 1989; Manodori *et al.*, 1992).

Espinaca	ATGCVMARICHTNNCPVGVASQRE	1118
Maíz	ATGCVMARICHTNNCPVGVASQRE	1241
<i>Antithamnion</i>	ATGCVMARVCHTNNCPVGVATQRO	1170
<i>P. purpurea</i>	ATGCIMARICHTNKCPVGVATQRE	1182
<i>P. boryanum</i> GlsF	AEGCIMARICHTNSCPVGVASQKE	1192
<i>Synechocystis</i> GltS	AEGCIMARVCHTNNCPVGVATQOE	1194
<i>Synechocystis</i> GltB	SLGCIMMRACHLNTCPVGIATQNP	1162
<i>P. boryanum</i> GltB	TLGCIMMRVCHLNTCPVGIATQDP	1150
<i>S. cerevisiae</i>	AMGCVMLRRCHLNCAVGIATQDP	1205
Alfalfa	TLGCIMMRKCHKNTCPVGIATQDP	1258
<i>A. brasilense</i>	AMGCIMVRQCHSNTCPVGVCVQDD	1150
<i>E.coli</i>	ALGCKYLRIChLNNCATGVATQDD	1142
<i>E.coli</i> FrdB	VWSCTFVGYCSEV.CPKHVDPAAA	223
<i>B.subtilis</i> SdhB	LADCGNSQNCVQS.CPKGIPLTTS	230
	▲            ▲            ▲	

**FIGURA 19. Alineamiento de las secuencias correspondientes al sitio de unión del centro 3Fe-4S de las glutamato sintasas de *Synechocystis*, GltB y GltS, con las secuencias de GOGATs disponibles y otras enzimas con centro [3Fe-4S].**

Las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas de *Synechocystis*, GltB y GltS, se compararon con las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas disponibles, la fumarato reductasa de *E. coli* (FrdB) y la succinato deshidrogenasa de *B. Subtilis* (SdhB). Con ▲ se indican las 3 cisteínas características de este centro hierro-azufre.

### 3.2.6. Otros dominios de las glutamato sintasas.

El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas, pone de manifiesto la existencia de una zona fuertemente conservada en todas las GOGATs y que comprende los residuos 978-1145 y 1002-1169 de GltB y GltS, respectivamente, con una identidad mayor del 60 % (figura 14) y con 16 residuos de glicina conservados.

Todas las Fd-GOGATs analizadas presentan un región que no aparece en el resto de glutamato sintasas y que comprende los residuos 954-969 en el caso de GltS de *Synechocystis*, con residuos H y K/H conservados en todas ellas.

Una región que comprende 20 aminoácidos conservados en todas las glutamato sintasas LISPPPHHDIYSIEDLAQLI (con un único cambio de los residuos A y Q en alguna de ellas), aparecen tanto en GltB como en GltS, residuos 1012-1032 y 1036-1056 respectivamente (figura 14)

### 3.2.7. Análisis de distancias evolutivas entre las glutamato sintasas

A partir de las comparaciones de las distintas secuencias de GOGATs presentadas en la figura 14, se calculó el porcentaje de identidad entre ellas, realizando la comparación dos a dos y calculando la identidad sobre la secuencia más corta. La tabla 7 contiene los valores obtenidos para las diferentes GOGATs expresados en tanto por ciento.

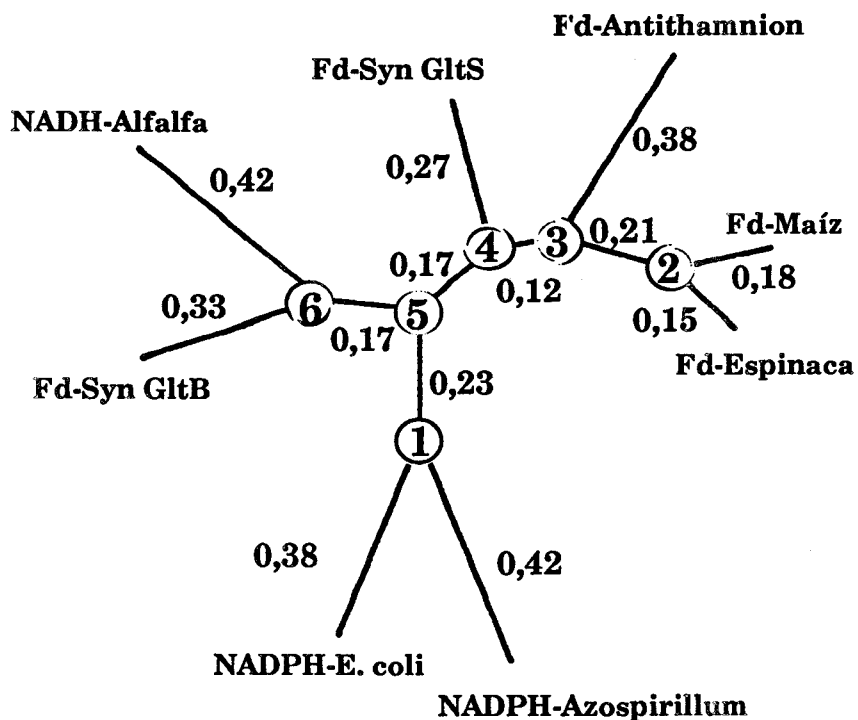
**Tabla 7. Identities entre las secuencias de aminoácidos de las glutamato sintasas<sup>a</sup>.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Fd-Syn. (GltS)	-	<b>44,3</b>	45,2	42,9	42,0	<b>67,0</b>	57,4	60,8	59,5	58,5	45,5	41,6
2. Fd-Syn. (GltB)	-	-	78,0	50,8	55,2	45,4	41,7	43,7	43,2	41,9	45,0	41,2
3. NADH-P. <i>boryamun</i> (GltB)	-	-	-	51,1	56,0	45,8	43,4	43,7	46,0	43,0	43,7	43,9
4. NADH-S. <i>cerevisiae</i>	-	-	-	-	52,8	41,2	42,3	42,9	42,5	44,2	43,3	42,0
5. NADH-alfalfa	-	-	-	-	-	43,8	43,1	44,1	43,1	41,9	43,9	42,5
6. Fd. <i>P. boryanum</i> (GlsF)	-	-	-	-	-	-	61,6	61,1	61,4	57,3	46,4	44,6
7. Fd-espínaca	-	-	-	-	-	-	-	83,6	59,8	55,2	43,8	42,6
8. Fd-maíz	-	-	-	-	-	-	-	-	59,0	55,8	43,9	42,5
9. Fd- <i>P. purpurea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60,2	44,3	42,4
10. Fd- <i>Antithamnion</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42,2	41,1
1. NADPH-A. <i>brasiliense</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	42,5
12. NADPH- <i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> La identidad de secuencias está basada en el alineamiento mostrado en la figura 14, desde el aminoácido 97 al 1602 de la secuencia de maíz. La identidad entre cada dos glutamato sintasas se calculó sobre la secuencia más corta. En negrita se indica la identidad entre las dos GOGATs de *Synechocystis*. Con rayas continuas se muestra las identidades entre GltS de *Synechocystis* y el resto de Fd-GOGATs, así como la identidad entre ellas y en raya discontinua, la identidad entre GltB y las NADH-GOGATs.

Los resultados mostrados en la tabla 7 indican que existe una identidad basal entre las GOGATs de distintos orígenes del orden del 45 %. La GOGAT de *Synechocystis*, GltB, presenta la mayor identidad con la subunidad grande de la

NADH-GOGAT de la cianobacteria *Plectonema boryanum*, 78 %, siendo ésta con alfalfa del 55,2 % y 50,8 % con la NADH-GOGAT de *S. cerevisiae*. La identidad de GltB con la otra GOGAT de *Synechocystis*, GltS, es del 44,3 %, similar a la existente con el resto de Fd-GOGATs y con las subunidades grandes de las NADPH-GOGATs bacterianas, 42-45 %. GltS, por el contrario, presenta su mayor identidad con las Fd-GOGATs tanto de la cianobacteria *P. boryanum*, como con las de algas rojas y plantas superiores, entre 57-67 %, siendo su identidad con el resto de glutamato sintasas de aproximadamente 40-45 %. Utilizando estos datos y a partir de los métodos de máxima verosimilitud y mínima parsimonia, se pudo elaborar un árbol de distancias evolutivas que se muestra en la figura 20.



**FIGURA 20. Árbol filogenético de las glutamato sintasas.**

Se utilizaron métodos de máxima verosimilitud y mínima parsimonia. Los números en círculos indican nodos y el resto de los números indican las distancias entre nodos.

Del árbol evolutivo se deduce que existen tres grupos diferenciados de glutamato sintasas, uno correspondiente a las NADPH-GOGATs bacterianas,

otro correspondiente a las Fd-GOGATs, incluyendo GltS de *Synechocystis* y un último grupo que incluye las NADH-GOGATs y GltB de *Synechocystis*.

### 3.2.8. Análisis comparativo entre los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803.

En la tabla 8 se muestran las características más importantes de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis*, a nivel de análisis de sus secuencias.

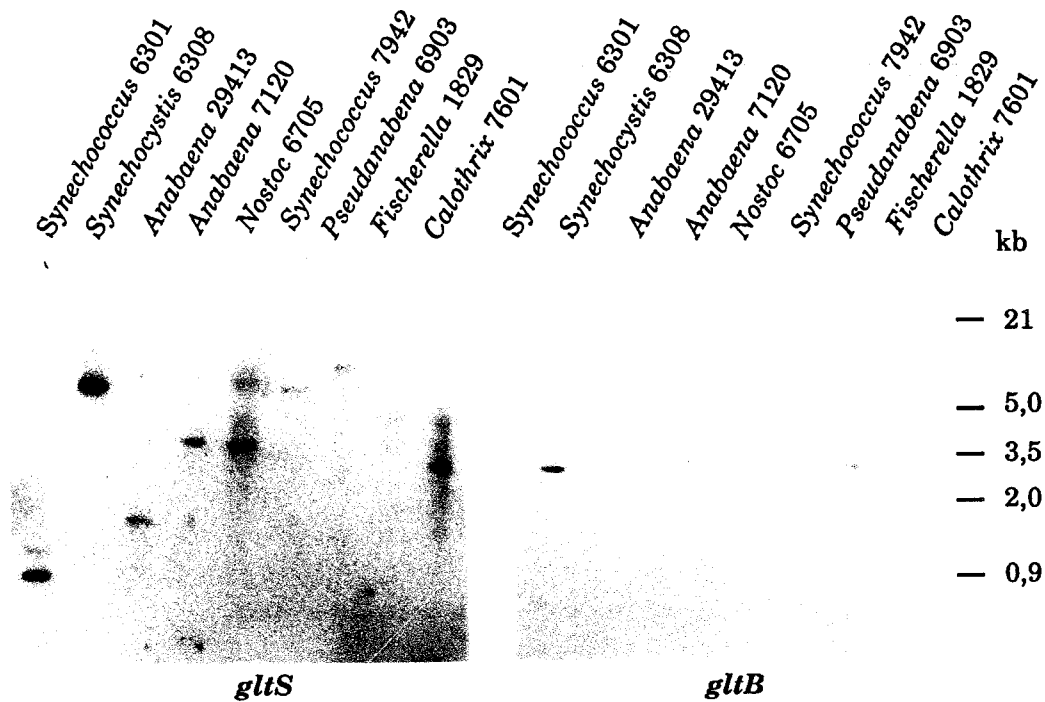
Tabla 8. Parámetros deducidos de las secuencias de *gltB* y *gltS*.

	Tamaño (pb)	Proteína			Identidad		
		residuos	Mm <sub>r</sub> (kDa)	pI	GOGAT (%)		
					NADPH	NADH	Fd
<i>gltB</i>	4650	1550	168,9	5,81	41-45	51-78	42-44
<i>gltS</i>	4674	1559	170,2	5,99	41-45	42-45	57-61

La identidad existente entre las dos secuencias deducidas de aminoácidos de estos dos genes es de 44,3 %, presentando GltB zonas más homólogas a la NADH-GOGATs que a las Fd-GOGATs, con las cuales muestra mayor similitud GltS.

### 3.2.9. Análisis de la existencia de los genes *gltB* y *gltS* en diferentes estirpes de cianobacterias.

Los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* se utilizaron como sondas para llevar a cabo hibridaciones, en condiciones heterólogas, con DNAs extraídos de distintas estirpes de cianobacterias correspondientes a las secciones I, III, IV y V, según la clasificación de Ripka *et al.* (1979). Como se muestra en la figura 21, *gltS* hibrida con el DNA de todas las estirpes usadas, mientras que *gltB* sólo muestra hibridación con *Synechocystis* sp. PCC 6308 (sección I) y *Pseudanabena* sp. PCC 6903 (sección III).



**FIGURA 21. Detección por hibridación de secuencias homólogas a los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803 en diferentes cianobacterias.**

Dos µg de DNA de las distintas estirpes indicadas se digirieron con *Hind*III, excepto el DNA de *Synechocystis* 6308 que se digirió con *Dra*I. Las sondas utilizadas fueron los genes *gltB* y *gltS* completos.

### **3.3. GENERACIÓN DE MUTANTES SIMPLES DE LOS GENES *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803.**

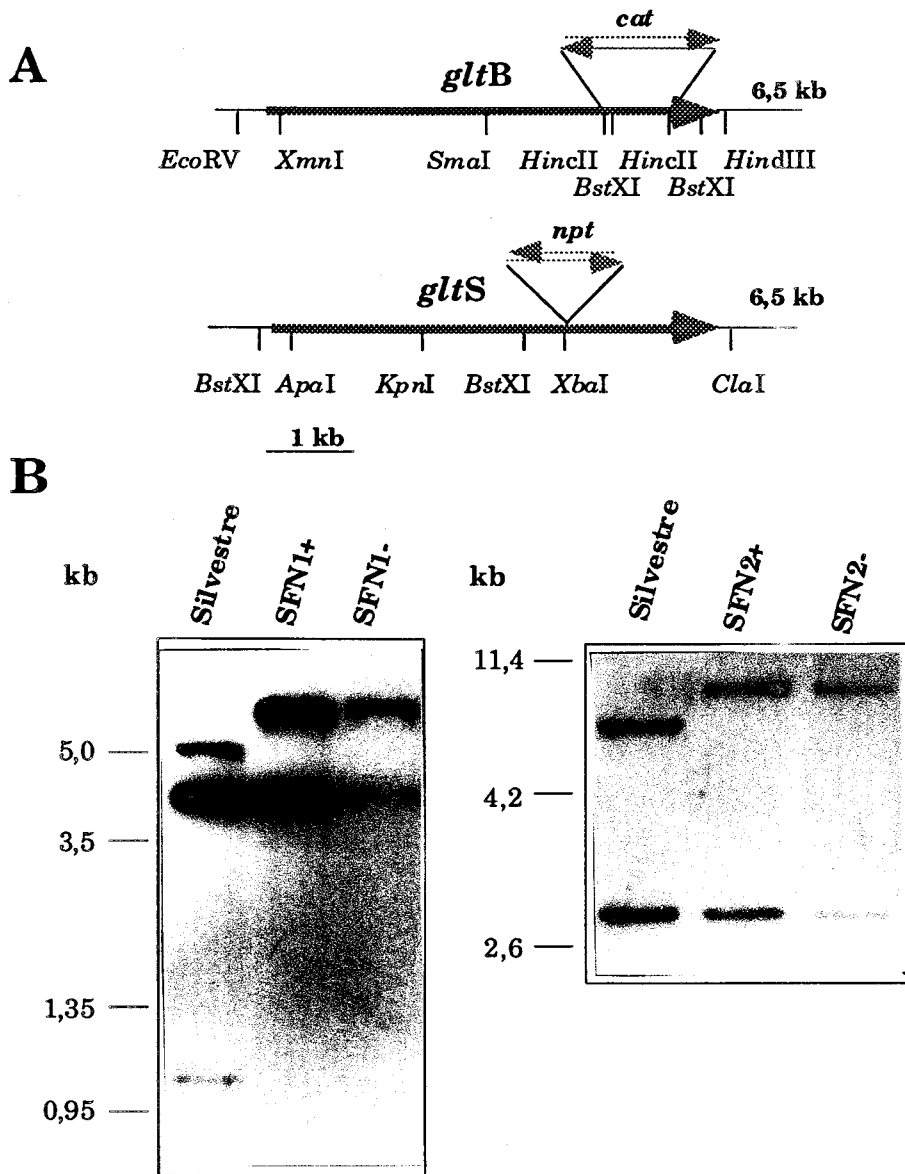
Con objeto de estudiar el papel fisiológico de las glutamato sintasas y de establecer si ambos genes codificaban proteínas funcionales en *Synechocystis*, así como para determinar la dependencia de éstas por el donador de electrones, se procedió a la obtención de mutantes, usando para ello la estrategia de inserción de genes de resistencia a antibióticos en el gen deseado.

#### **3.3.1. Construcción de plásmidos con versiones inactivadas de los genes *gltB* y *gltS*. Transferencia a *Synechocystis* por transformación.**

Para mutar el gen *gltB*, se utilizó el plásmido pFN3 que contenía parte de dicho gen. En este caso, un fragmento *Hinc*II de aproximadamente 1 kb se

sustituyó por un fragmento de 1,9 kb que contenía el gen *cat* de pKT210 (C.C1) que confiere resistencia a cloranfenicol. De esta forma se generaron los plásmidos pFN10+ y pFN10-, según el sentido de transcripción del gen *cat* con respecto al del gen *gltB*.

Para la inactivación del gen *gltS*, se utilizó el plásmido pFN4 y se insertó en el sitio *Xba*I de *gltS* un fragmento de 1,3 kb que contenía el gen *npt* de Tn5 (C.K1) que confiere resistencia a kanamicina. Los plásmidos obtenidos fueron pFN11+ y pFN11-, según el sentido de transcripción del gen *npt* con respecto al gen *gltS* (figura 22A).



**FIGURA 22. Inactivación de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.**

A) Regiones de DNA de *Synechocystis* 6803 en las que se localizan los genes *gltB* y *gltS* y las versiones de los genes *cat* y *npt* usados para la inactivación de estos genes.

B) Hibridación de DNA total de *Synechocystis* 6803 (silvestre) y las estirpes SFN1+/- y SFN2+/- cultivadas durante varias generaciones en medio BG11 con los antibióticos correspondientes. Las hibridaciones se realizaron a 68 °C utilizando como sondas los genes *gltB* y *gltS* completos. Los detalles experimentales se recogen en 2.4.2.6.

**3.3.2. Análisis de la estructura cromosómica de las estirpes mutantes obtenidas.**

Dado que *Synechocystis* es un organismo poliploide (Labarre *et al.*, 1989), era necesario comprobar si además de haberse producido la integración, la segregación de los cromosomas mutados era total respecto a los silvestres. Se analizaron por hibridación los DNAs extraídos de varias estirpes obtenidas de cada una de las transformaciones con los plásmidos pFN10+/- y pFN11+/- y se comprobó que en todos los casos la segregación de los cromosomas mutados había sido total. En la figura 22 B se muestra el análisis mediante hibridación del DNA de una estirpe tipo de cada transformación, así como del silvestre. En el caso de los mutantes SFN1+ (pFN10+) y SFN1- (pFN10-), desaparece una banda de aproximadamente 1 kb, que existe en la estirpe silvestre y aparece una nueva banda de 7 kb que corresponde al aumento de 1,9 kb (gen *cat*) sobre la banda de 5 kb (silvestre) más el fragmento de DNA desde la diana *HincII* hasta *BstXI* (figura 22 A).

En el caso de las estirpes SFN2+ (pFN11+) y SFN2- (pFN11-), en la hibridación desaparece una banda de 8 kb y aparece otra de 9,3 kb que corresponde a la suma de la anterior más 1,3 kb (gen *npt*).

**3.3.3. Análisis de la actividad GOGAT de las estirpes mutantes obtenidas.**

Con objeto de determinar si los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* se expresaban simultáneamente, se utilizaron los mutantes SFN1+ y SFN2+ a los que se les determinó la actividad glutamato sintasa. Como se muestra en la tabla 9, ambos mutantes presentaron actividad glutamato sintasa dependiente de ferredoxina. La actividad Fd-GOGAT de la estirpe SFN2+ fue aproximadamente un 75 % de la actividad de la estirpe silvestre, mientras que la actividad que presentó la estirpe SFN1+ fue aproximadamente de un 50 %. No se detectó actividad dependiente de NADH ni de NADPH, lo que indicaba que



ambos genes podrían codificar dos Fd-GOGATs distintas y que la enzima codificada por el gen *gltS* es más activa en nuestras condiciones de ensayo que la codificada por el gen *gltB*. Estos resultados indican, además, que ninguno de los dos genes es esencial si se expresa el otro. La determinación de la existencia de dos glutamato sintasas en la cianobacteria *P. boryanum* (Okuhara *et al.*, en preparación), una de ellas dependiente de ferredoxina y la otra de NADH, así como las identidades calculadas entre estas secuencias y las de las GOGATs de *Synechocystis*, sugieren que GltB podría ser una NADH-GOGAT, a pesar de que no hemos conseguido determinar tal actividad.

**Tabla 9. Actividad Fd-GOGAT de las estirpes silvestre y mutantes de los genes *gltB* (SFN1+) y *gltS* (SFN2+) de *Synechocystis* 6803<sup>a</sup>.**

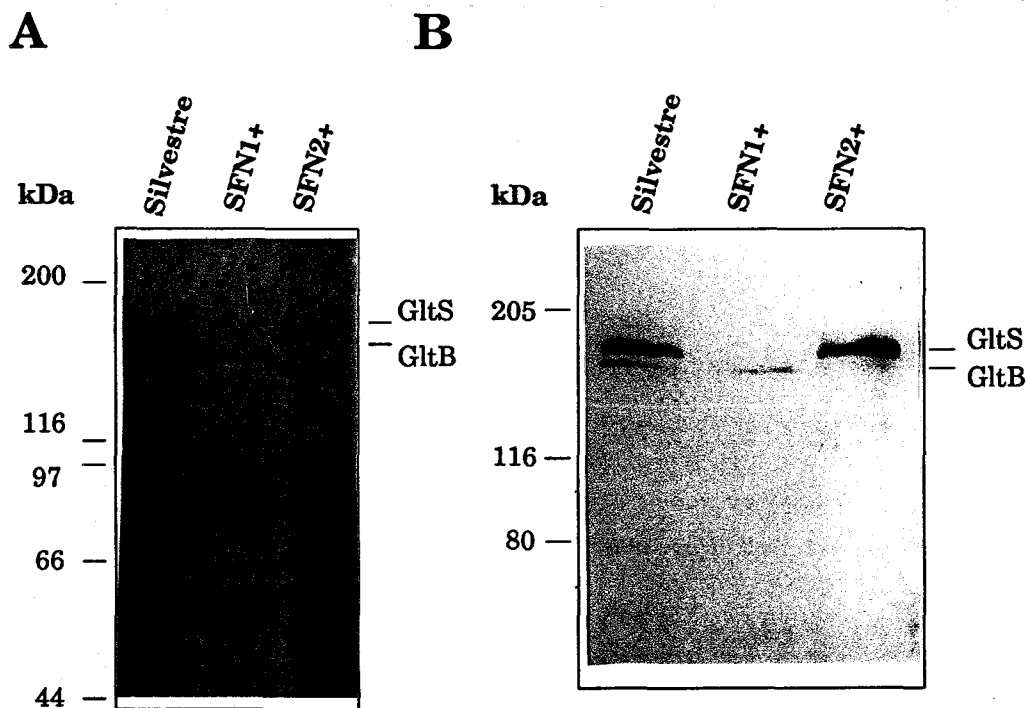
Estirpe	Actividad Fd-GOGAT (mU/mg proteína)	(%)
Silvestre	54,42 ± 3,7	100
SFN1+	41,93 ± 5,8	77
SFN2+	25,40 ± 3,6	47

<sup>a</sup> Las actividades se determinaron en extractos crudos de células de las estirpes indicadas cultivadas en medio BG11. Los ensayos de actividad glutamato sintasa se realizaron como se describe en el apartado 2.2.1.1. Los valores son la media más el error estándar de tres ensayos independientes.

### 3.3.4. Identificación de las GOGATs, GltB y GltS, en *Synechocystis* 6803.

Para identificar los polipéptidos codificados por los genes *gltB* y *gltS*, se llevó a cabo la purificación parcial de ambas enzimas, utilizando las estirpes silvestre, SFN1+ y SFN2+ de *Synechocystis*. Para ello se recogieron células procedentes de 750 ml de cultivos, en medio BG11, de las estirpes indicadas y los extractos crudos obtenidos de cada uno de los cultivos se sometieron a cromatografía en DEAE celulosa, obteniéndose una purificación de cinco veces y una recuperación del 75-80 %.

Como se muestra en la figura 23A, en el carril correspondiente a la estirpe silvestre aparecen dos polipéptidos de 170 y 180 kDa mientras que en el de SFN1+ aparece sólo la banda de 180 kDa (GltS) y en el de SFN2+ el polipéptido de 170 kDa (GltB). Estas mismas bandas son reconocidas por los anticuerpos anti Fd-GOGAT de *Synechococcus* 6301 (figura 23 B), confirmando la existencia de dos GOGATs claramente distintas en *Synechocystis* 6803, codificadas por genes distintos, que pueden ser inactivados independientemente.



**FIGURA 23. Detección de los polipéptidos GOGATs de *Synechocystis* sp. PCC 6803, SFN1+ y SFN2+.**

A) Electroforesis en SDS, de extractos crudos de las estirpes de *Synechocystis* 6803, SFN1+ y SFN2+. Se cargaron 60 µg de proteínas en cada carril.

B) Inmunodetección con anticuerpos anti Fd-GOGAT de *Synechococcus* 6301 de un filtro de nitrocelulosa, resultado de la transferencia de un gel en SDS conteniendo 60 µg de proteínas de las estirpes indicadas.

#### **3.4. GENERACIÓN DE MUTANTES DOBLES DE LOS GENES *gltB* Y *gltS* DE *Synechocystis* 6803.**

Con el fin de comprobar si la actividad glutamato sintasa era esencial para el crecimiento de *Synechocystis*, se intentó obtener un mutante doble de los genes *gltB* y *gltS*, utilizando para ello las construcciones y estirpes del apartado anterior.

Con objeto de obtener un mutante doble para los genes *gltB* y *gltS* se utilizó la estirpe SFN1+, mutante para el gen *gltB*. Esta estirpe, homocigótica para la copia inactivada del gen *gltB*, fue empleada como estirpe receptora para llevar a cabo una transformación (2.5.2) usando los plásmidos pFN11+ y pFN11- mostrados en la figura 22 A, los cuales contienen el gen *gltS* inactivado con el gen *npt* que confiere resistencia a kanamicina.

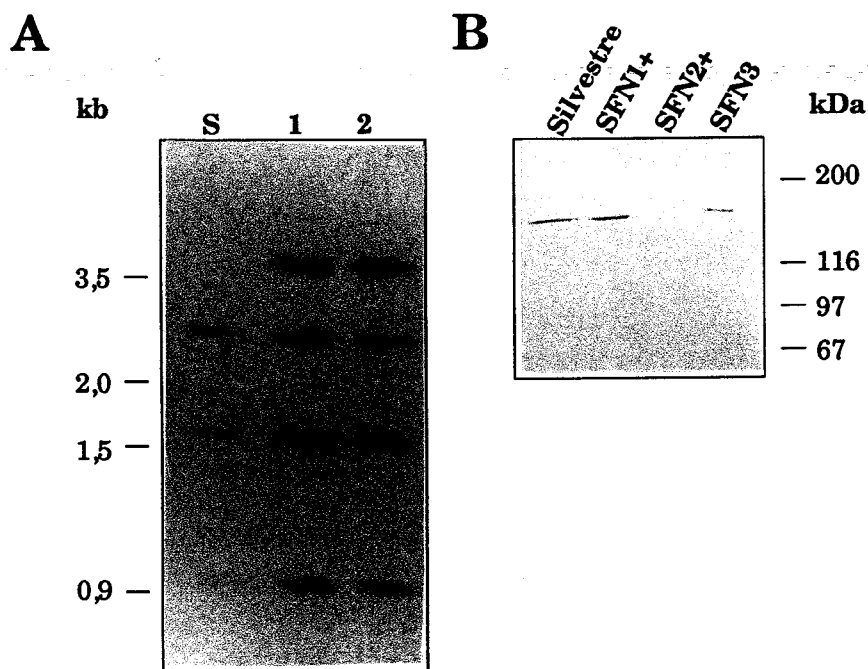
Las colonias aparecidas en la transformación se sometieron a varias rondas de segregación en las que se aumentó la concentración de kanamicina hasta 200 µg/ml, en medio BG11. Posteriormente se extrajo DNA de algunos de estos clones y se procedió a su hibridación para comprobar la segregación del gen *gltS*. De todas las colonias analizadas, ninguna de ellas mostró una segregación mayor del 50 % de las copias inactivadas de dicho gen. En la figura 24 A se muestra la hibridación de dos clones representativos de la transformación con cada uno de los plásmidos indicados.

En un intento de aumentar la segregación del gen *gltS* inactivado por la inserción de la cassette de resistencia en los transformantes obtenidos, se cultivaron algunos de éstos en medios BG11 con nitrato o amonio como fuente de nitrógeno, con amonio más glutamato o 2-oxoglutarato o con glutamato o arginina como única fuente nitrogenada, y la concentración de kanamicina se llevó hasta 500 µg/ml. Se extrajo DNA de algunos de estos clones cultivados en las distintas condiciones y se sometieron a hibridación homóloga para comprobar si había aumentado la segregación de dicho gen. Los resultados del Southern mostraron que la segregación de la copia mutada del gen *gltS* no aumentó en ninguna de las condiciones indicadas.

**FIGURA 24. Estructura cromosómica de los clones transformantes obtenidos a partir de la estirpe SFN1+ e inmunodetección de las distintas estirpes mutantes obtenidas en este trabajo.**

**A)** Hibridación en condiciones homólogas de 2 µg de DNA digerido con *HincII* de la estirpe silvestre de *Synechocystis* (S) y de dos clones obtenidos por transformación de la estirpe SFN1+ con pFN11+ (1) y pFN11- (2). La sonda empleada fue el gen *gltS* de *Synechocystis*.

**B)** Inmunodetección de glutamato sintasa de extractos crudos de las estirpes silvestre, SFN1+, SFN2+ y SFN3 (estirpe representativa de la mutagénesis doble) de *Synechocystis* 6803. Se cargaron 50 µg de proteína por carril.



La tabla 10 muestra la actividad Fd-GOGAT de dos de los clones transformantes obtenidos. La actividad mostrada por éstos es aproximadamente el 50 % de la actividad que presenta la estirpe SFN1+, lo cual concuerda con la existencia de sólo el 50 % de copias silvestres del gen *gltS* en los transformantes obtenidos a partir de esta estirpe. De ellos se seleccionó la estirpe SFN3 (resultado de la mutagénesis doble utilizando el plásmido pFN11+) como estirpe representativa, la cual presenta niveles de proteína GltS menores que las estirpes silvestre y SFN1+, como se demuestra mediante la inmunodetección que se presenta en la figura 24B.

**Tabla 10. Actividad Fd-GOGAT de las estirpes mutantes de los genes *gltB* (SFN1+) o *gltB* y *gltS* (A y B) de *Synechocystis* 6803<sup>a</sup>.**

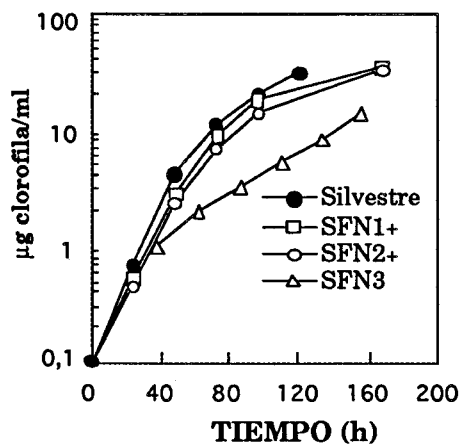
ESTIRPE	Actividad Fd-GOGAT (mU/mg proteína)	(%)
SFN1+	41,93 ± 5,8	100
A	23,70 ± 2,9	56
B	25,63 ± 6,0	59

<sup>a</sup> Las actividades se determinaron en extractos libres de células de la estirpe SFN1+ cultivada en medio BG11 y de dos transformantes obtenidos cultivados en medio BG11 con nitrato (A) o amonio (B). Los ensayos de la actividad glutamato sintasa se realizaron como se describen (2.2.1.1) Los valores son la media más la error estándar de tres o cuatro ensayos independientes.

### 3.5 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES Y DE LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD Fd-GOGAT DE *Synechocystis* 6803 Y DE LAS ESTIRPES MUTANTES.

#### 3.5.1. Crecimiento de *Synechocystis* 6803 y de las estirpes mutantes de los genes *gltB* y *gltS*.

Con objeto de comprobar si la inactivación de los genes *gltB* y *gltS* provocaba algún efecto sobre el crecimiento de las estirpes mutantes obtenidas, se procedió a determinar su crecimiento a lo largo del tiempo. Como se observa en la figura 25, los mutantes simples SFN1+ (*gltB*) y SFN2+ (*gltS*) presentan un crecimiento similar a la estirpe silvestre, mientras que la estirpe SFN3 (*gltB*, *gltS*) crece más lentamente que las estirpes anteriores. Este resultado, junto con la posibilidad de inactivación de cada gen por separado, sugiere que en las condiciones normales de crecimiento ninguno de los dos genes es esencial. La diferencia de crecimiento de la estirpe SFN3 viene provocada por la inactivación de los genes, aunque pudiera ser que la concentración de kanamicina usada, 500 µg/ml, tuviese un efecto negativo sobre este crecimiento.

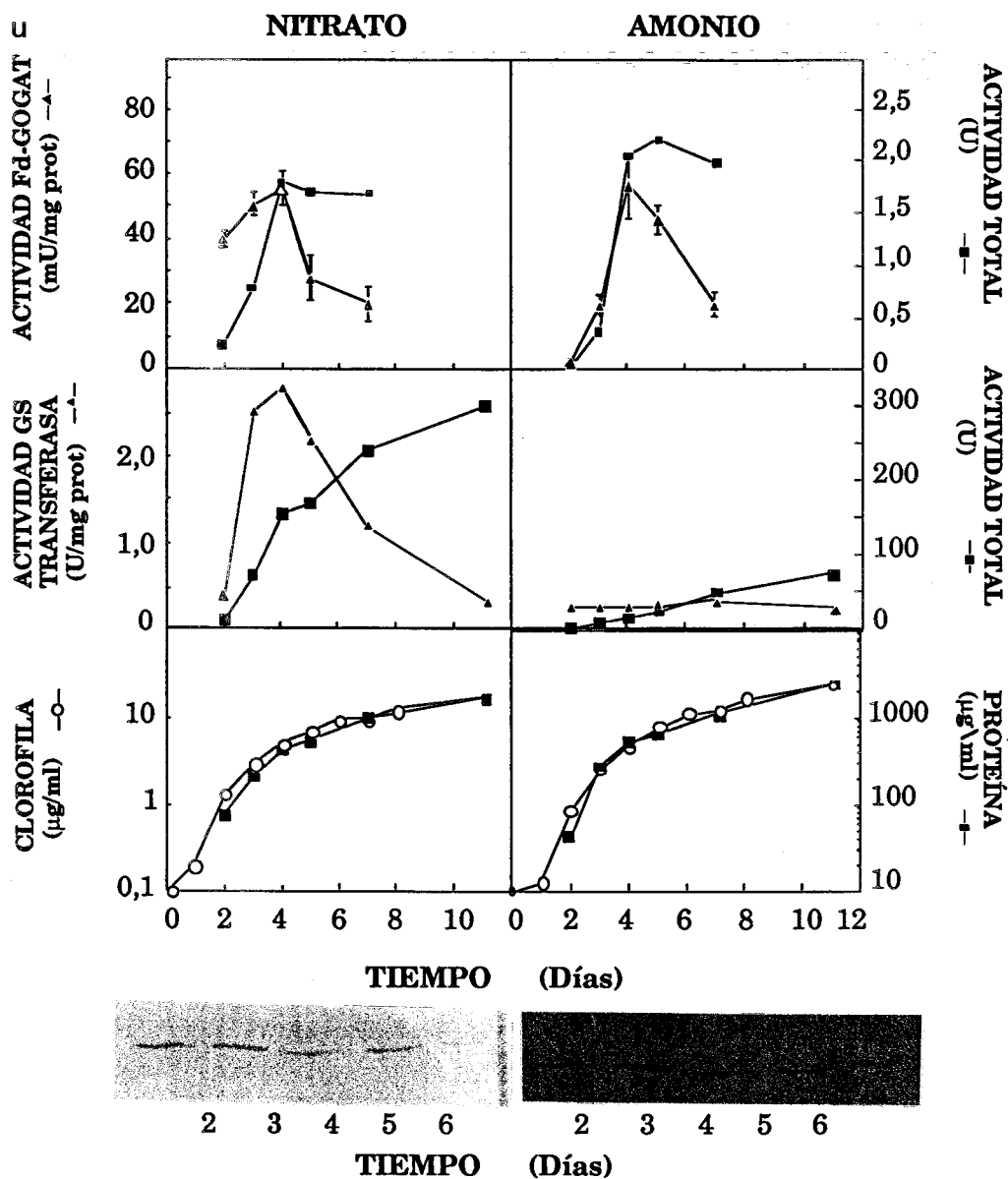


**FIGURA 25.** Crecimiento de las estirpes silvestre, SFN1+, SFN2+ y SFN3 de *Synechocystis* 6803.

Las distintas estirpes se inocularon a una concentración inicial de 0,1 µg de clorofila por mililitro, excepto SFN3 que se inoculó a una concentración inicial de 1 µg por mililitro. El medio de cultivo empleado fue BG11.

### **3.5.2. Niveles de actividad Fd-GOGAT y glutamina sintetasa de *Synechocystis* 6803 a lo largo del crecimiento en diferentes condiciones de cultivo.**

Con objeto de estudiar si existía alguna modulación de la actividad Fd-GOGAT en *Synechocystis* en función de la fuente nitrogenada utilizada, se determinaron los niveles de actividad a lo largo de las distintas fases de crecimiento, utilizando nitrato o amonio como fuente de nitrógeno. Como se observa en la figura 26, no existe regulación de la actividad Fd-GOGAT en estas condiciones de crecimiento, a diferencia de lo que ocurre con la glutamina sintetasa de este mismo organismo, la cual presenta unos niveles de actividad GS transferasa mucho bajos en crecimiento con amonio que con nitrato. La evolución de la actividad Fd-GOGAT medida en esta cianobacteria es similar a lo largo del tiempo en las dos condiciones de crecimiento, correspondiendo el máximo de actividad específica (aproximadamente 60 mU/mg proteína) con el máximo de actividad específica GS transferasa en condiciones de crecimiento con nitrato. Los niveles de proteína Fd-GOGAT, GltS, tampoco mostraban cambios significativos a lo largo del tiempo en ninguna de las condiciones de cultivo, lo que sugiere que la actividad Fd-GOGAT no es debida a una modulación de la actividad de las proteínas GltB y GltS a lo largo de las distintas fases de crecimiento. De estos resultados se deduce que no existe una correlación entre la regulación de la actividad glutamina sintetasa y de la glutamato sintasa de *Synechocystis* 6803 cuando éste crece empleando nitrato o amonio como fuente de nitrógeno.



**FIGURA 26. Evolución de la actividad Fd-GOGAT y glutamina sintetasa en células de *Synechocystis* 6803 cultivadas fotoautotróficamente con amonio o con nitrato como fuente de nitrógeno.**

Los cultivos fueron inoculados a una concentración inicial de 0,1 µg de clorofila por mililitro, con células cultivadas fotoautotróficamente en nitrato. Los datos de actividad Fd-GOGAT son la media más el error estándar de dos experimentos independientes. El resto de los datos corresponde a la media de los experimentos anteriores. En los dos paneles inferiores se muestran los niveles de proteína GltS determinados mediante inmunodetección, utilizando anticuerpos contra la Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* 6803, a lo largo del crecimiento y habiendo cargado 50 µg de proteína total en cada caso.

**3.5.3. Influencia de la ausencia de fuente nitrogenada sobre la actividad Fd-GOGAT y GS en las estirpes silvestre, SFN1+ y SFN2+ de *Synechocystis* 6803.**

La ausencia de fuente de nitrógeno provoca en *Synechocystis* el incremento de los niveles de RNAm, de la actividad y de la síntesis de proteínas de algunas enzimas directamente implicadas en la asimilación del mismo, como es el caso de la glutamina sintetasa (Reyes y Florencio, 1994), y de la isocitrato deshidrogenasa (Muro-Pastor *et al.*, , 1963). A raíz de estos resultados se ha estudiado si la situación metabólica que se crea en estas condiciones de carencia de nitrógeno altera los niveles de las actividades glutamato sintasas, GltS y GltB, tanto en este organismo como en las estirpes mutantes SFN1+ y SFN2+. Cultivos de cada una de las estirpes indicadas se sometieron a periodos de carencia de fuente nitrogenada determinándose las actividades Fd-GOGAT y GS transferasa de cada uno de ellos. No hubo, en ningún caso, variación de la actividad Fd-GOGAT mientras que sí aumentó la actividad GS transferasa tanto en la estirpe silvestre como en las mutantes, siendo este incremento similar en todos los casos (tabla 11).

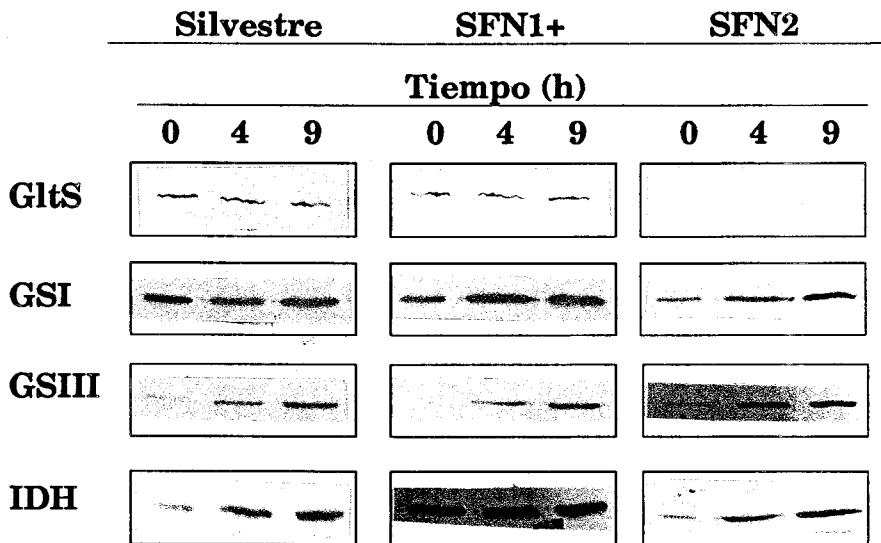
**Tabla 11. Influencia de la ausencia de fuente nitrogenada sobre la actividad GS transferasa de las estirpes silvestre y mutantes, SFN1+ y SFN2+ de *Synechocystis* 6803<sup>a</sup>.**

Estirpe	Actividad GS transferasa (U/mg Prot)		
	0	4	9 Tiempo (h)
Silvestre	0,6 (100)	0,9 (144)	1,0 (170)
SFN1+	0,7 (100)	1,0 (130)	1,2 (160)
SFN2+	0,6 (100)	0,8 (125)	0,9 (155)

<sup>a</sup> La actividad GS transferasa se ensayó *in situ* (2.2.2.10. Se muestran los valores de un experimento típico. Células de un cultivo de cada estirpe cultivadas fotoautotróficamente en medio BG11, fueron recogidas y lavadas 3 veces con medio BG11<sub>0</sub>C. Posteriormente se resuspendieron en el mismo medio a concentración de clorofila igual a la inicial (aproximadamente 7 µg de clorofila /ml). Los números entre paréntesis indican el porcentaje de actividad.



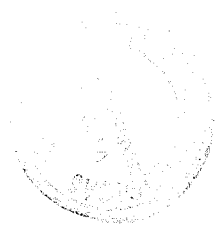
En las estirpes mencionadas se determinaron los niveles de proteína GltS, así como los de GSI, GSIII e IDH, los cuales aumentan en condiciones de carencia de nitrógeno. Como se observa en la figura 27 por inmunodetección, no aumentó la cantidad de proteína correspondiente a GltS ni en la estirpe silvestre ni en SFN1+, lo que concuerda con la actividad Fd-GOGAT medida. Por el contrario, los niveles del resto de proteínas aumentaron con el tiempo en las estirpes mutantes, de manera similar a lo que ocurre con la estirpe silvestre.



**FIGURA 27.** Cuantificación mediante inmunodetección de los niveles de GltS, GSI, GSIII e IDH en células de las estirpes silvestre, SFN1+ y SFN2+ de *Synechocystis* 6803 sometidas a carencia de nitrógeno.

Se realizaron electroforesis en presencia de SDS de 25 µg de proteínas de extractos crudos procedentes de células de las distintas estirpes indicadas, sometidas a 4 y 9 horas de carencia de nitrógeno.

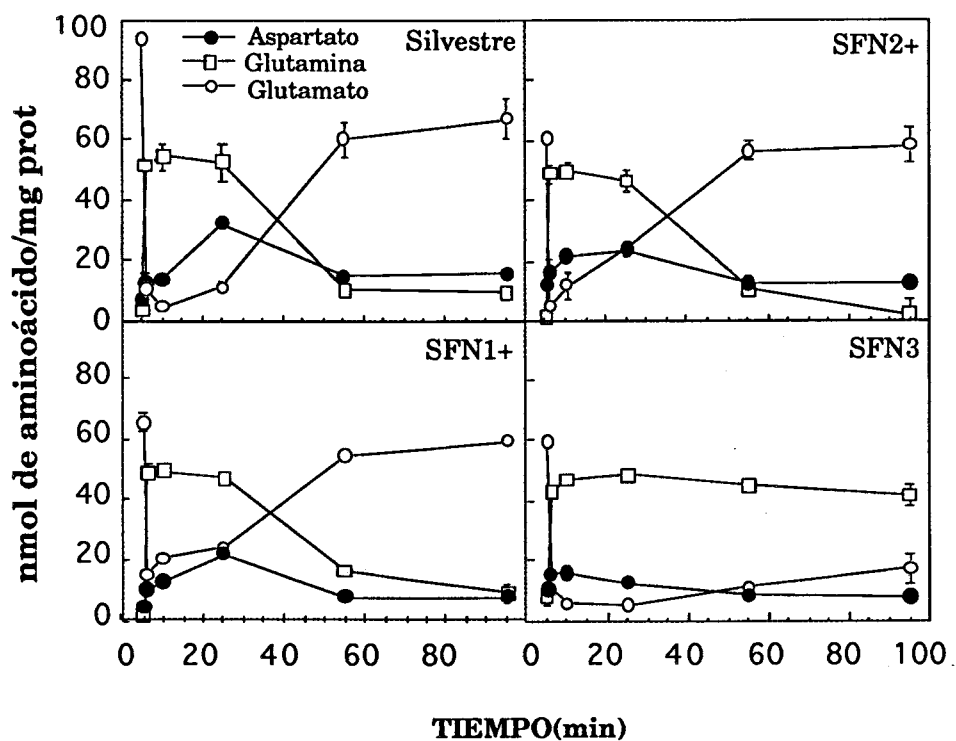
**3.5.4. Niveles intracelulares de aminoácidos y de actividad GS transferasa tras la adición de amonio en *Synechocystis* 6803 y estirpes mutantes obtenidas en este trabajo.**



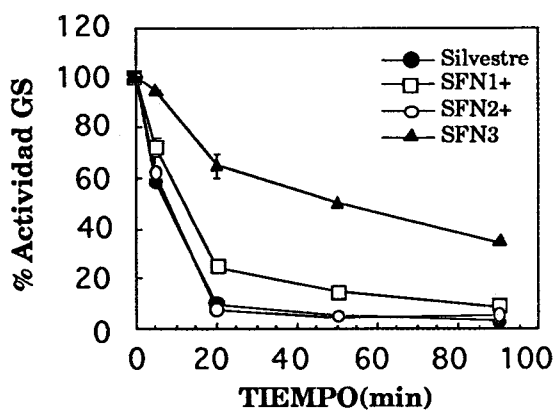
La adición de amonio a cultivos de *Synechocystis* 6803 creciendo con nitrato como fuente de nitrógeno provoca una rápido descenso de los niveles intracelulares de glutamato y un aumento paralelo de los niveles de glutamina. Esta adición provoca, por otra parte, una rápida disminución de la actividad glutamina sintetasa en este organismo (Mérida *et al.*, 1992). Para comprobar el papel de las glutamato sintetasas en este proceso se utilizaron las estirpes mutantes de cada uno de los genes *gltB* y *gltS*, SFN1+ y SFN2+ respectivamente, así como el doble mutante parcial SFN3 y la estirpe silvestre, con el fin de medir los cambios en los niveles intracelulares de los aminoácidos glutamato, glutamina y aspartato tras la adición de 1 mM de amonio a los cultivos, creciendo en nitrato.

Como se observa en la figura 28 A, los niveles iniciales de glutamato antes de la adición del amonio eran mayores en la estirpe silvestre (aproximadamente 90 nmol/mg prot.) que en las estirpes mutantes, siendo de éstas la estirpe SFN1+ (mutante de *gltB*) la que presentaba unos niveles más elevados (aproximadamente 70 nmol/mg prot.) y las estirpes SFN2+ y SFN3 niveles ligeramente inferiores (60 nmol/mg prot.). Estos valores están en concordancia con la actividad Fd-GOGAT que presentan estas estirpes, existiendo una correlación directa entre el nivel interno de glutamato y la actividad glutamato sintasa. Sin embargo, los niveles de los aminoácidos glutamina y aspartato son similares en todos los casos, si bien en el mutante SFN3 el nivel inicial de glutamina era entre 1,5-2 veces mayor. Igualmente, en todos los casos la concentración de glutamato descendió a niveles de 5-10 nmol/mg prot a los 5 minutos de la adición de amonio, al tiempo que se produjo una subida de los niveles de glutamina a unos 50 nmol/mg prot. y una subida de los niveles de aspartato a unos 20-25 nmol/mg prot., aunque en el caso de la estirpe SFN3 sólo llegaron a 10-15 nmol/mg prot.

**A**



**B**



**FIGURA 28.** Efecto de la adición de amonio sobre las concentraciones internas de glutamato, glutamina y aspártico en las estirpes silvestre, SFN1+, SFN2+ y SFN3, así como de la actividad GS transferasa.

Células de las estirpes silvestre, SFN1+, SFN2+ y SFN3 se cultivaron con nitrato como única fuente de nitrógeno y a t=0 se añadió amonio hasta una concentración de 1 mM. A los tiempos indicados se tomaron muestras para la

determinación de glutamato, glutamina y aspártico tal y como se describe en el apartado 2.7.2., panel A, o para la determinación de la actividad GS transferasa, panel B. Los datos son la media de tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar.

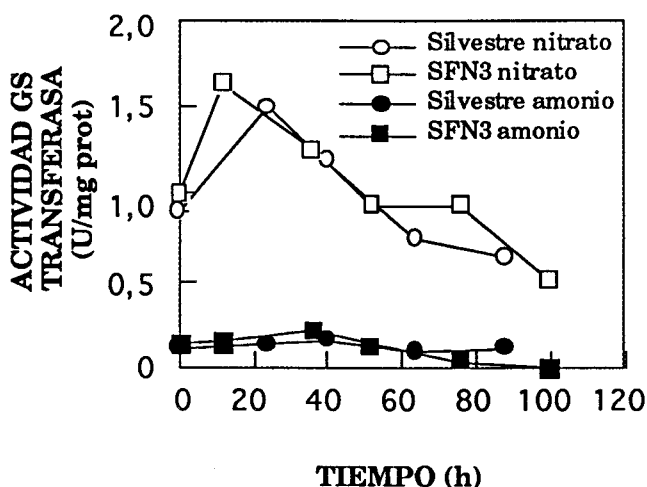
Tanto en los mutantes simples como en la estirpe silvestre, la recuperación de los niveles internos iniciales de glutamato y glutamina se produjo de forma similar, mientras que en la estirpe SFN3 esta recuperación se produjo de forma mucho más lenta, lo cual está en concordancia con una menor actividad Fd-GOGAT que llevaría a una síntesis más lenta de glutamato y una metabolización más lenta de la glutamina producida por la actividad GS.

Por otro lado, la caída de la actividad glutamina sintetasa fue prácticamente igual en las estirpes silvestre y SFN2+ y similar a SFN1+, mientras que en el caso de la estirpe SFN3 los niveles de actividad glutamina sintetasa se mantuvieron más altos y sólo llegaron a los niveles alcanzados por las otras estirpes varias horas después de la adición del amonio. Pensando que este retardo en la caída de la actividad GS en la estirpe SFN3 pudiese ser debida a una acumulación interna de 2-oxoglutarato, como consecuencia de una menor actividad Fd-GOGAT, se midieron los niveles de actividad GS tras la adición de amonio a cultivos de las estirpes silvestre y SFN3 cultivadas en medio BG11 y 5 ó 20 mM de 2-oxoglutarato durante 1, 5 y 24 horas. Los resultados de estos experimentos no mostraron diferencias significativas, aunque pudiese ser que el 2-oxoglutarato no fuese transportado al interior de las células.

### **3.5.5. Niveles de actividad GS transferasa en cultivos de *Synechocystis* 6803 y la estirpe mutante SFN3 a lo largo de la curva de crecimiento en distintas fuentes de nitrógeno.**

Como se describe en el apartado anterior, el nivel intracelular del aminoácido glutamina es mayor (1,5-2 veces) en la estirpe mutante SFN3 que en las estirpes silvestre y mutantes SFN1+ y SFN2+ (figura 28 A). Para ver si esta mayor acumulación de glutamina podía tener algún efecto sobre la actividad GS transferasa de la estirpe SFN3, se midió ésta a lo largo de la curva de crecimiento en cultivos de esta estirpe y de la estirpe silvestre de *Synechocystis* 6803 cultivadas en medio BG11 con nitrato o amonio como fuente de nitrógeno.

Como se observa en la figura 29, la actividad específica GS transferasa de las dos estirpes es similar en las distintas condiciones, lo que indica que ésta no se ve afectada por el mayor nivel intracelular de glutamina de la estirpe SFN3 ni por la disminución en el nivel de actividad Fd-GOGAT de esta estirpe.



**FIGURA 29.** Niveles de actividad GS transferasa, a lo largo del crecimiento de las estirpes silvestre y SFN3 de *Synechocystis* 6803 en distintas fuentes de nitrógeno.

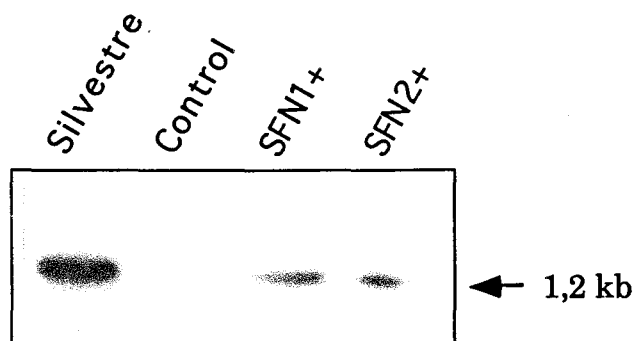
Células de las estirpes silvestre y SFN3 se inocularon a una concentración inicial de clorofia de 0,5 y 1  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, en medios BG11 conteniendo nitrato o amonio como fuente de nitrógeno. Los ensayos de la actividad GS transferasa se realizaron según se describe en 2. 2.1.

### 3.5.6. Análisis transcripcional de los genes *gltB* y *gltS*

La cantidad de los transcritos correspondientes a los genes *gltB* y *gltS* se analizaron tanto en la estirpe silvestre como en las estirpes mutantes SFN1+ y SFN2+, utilizando los distintos métodos de extracción de RNA que se indican (2.4.3). Tras la transferencia a filtros de nylon de geles de agarosa conteniendo muestras con distintas cantidades de RNAs (15, 30 y 60  $\mu\text{g}$ ) procedentes de cultivos de las estirpes indicadas, cultivadas en medio BG11, se realizaron hibridaciones usando sondas correspondientes a la totalidad de los genes *gltB* y *gltS* o sondas de regiones internas a los mismos. En ningún caso fue posible detectar hibridación con los transcritos correspondientes a estos genes.

Se hicieron experimentos de "dot-blot" en las condiciones anteriores con distintas cantidades de RNA sin que las hibridaciones dieran resultados positivos.

Para determinar si en los RNAs obtenidos estaban representados los genes *gltB* y *gltS*, se realizaron experimentos de RT-PCR usando los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la amplificación del fragmento de 1,2 kb (3.1.1) y el resultado de éstas se sometió a electroforesis en geles de agarosa. Los filtros resultantes de la transferencia de estos geles se sometieron a hibridación usando como sonda el fragmento de PCR de 1,2 kb (3.1.1), figura 30. Como puede observarse, tanto en la estirpe silvestre como en los mutantes apareció una banda de hibridación que no aparece cuando se trata el RNA con RNAasa antes de la RT-PCR (carril control).



**FIGURA 30. Detección por hibridación de los fragmentos amplificados mediante RT-PCR, usando RNA de las estirpes silvestre, SFN1+ y SFN2+ de *Synechocystis* 6803.**

El resultado de la RT-PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se transfirió a filtro de nitrocelulosa. La sonda usada para la hibridación que el fragmento de 1,2 kb obtenido por PCR (3.1.1).

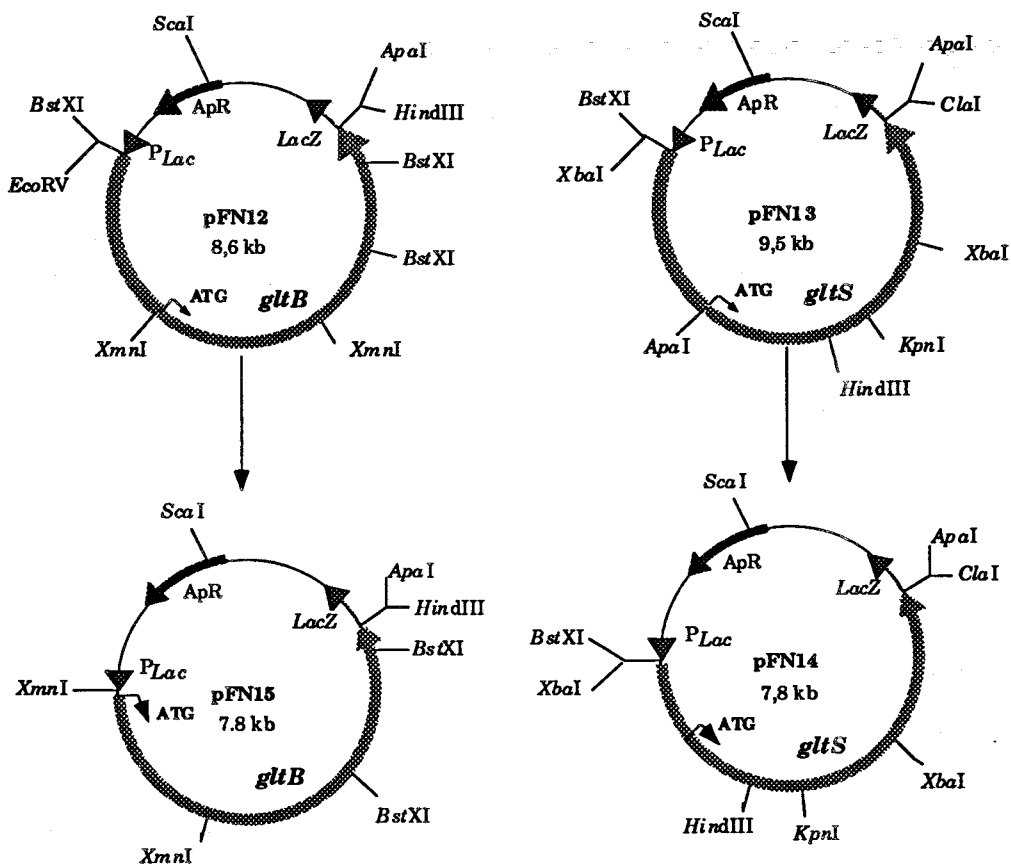
La expresión de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803 en *E. coli* tiene un gran interés para determinar la capacidad de esta bacteria de expresar y ensamblar correctamente proteínas funcionales con distintos grupos prostéticos, como son flavinas y centros sulfoférricos. Para llevar a cabo este trabajo se ha utilizado una estirpe de *E. coli* auxótrofa para glutamato, con los genes *gdhA* (que codifica la glutamato deshidrogenasa) y *gltB* (subunidad grande de la NADPH-GOGAT) inactivados y que, por tanto, carece de las actividades dependientes de NADPH, glutamato deshidrogenasa y GOGAT.

### 3.6.1. Construcciones plasmídicas usadas para la expresión de los genes *gltB* y *gltS* en *E. coli* CLR207 *RecA*.

Con objeto de expresar los genes *gltB* y *gltS* en *E. coli* se utilizaron dos construcciones distintas para cada uno de ellos, una conteniendo su propio promotor, además del promotor *PLac* del plásmido pBS utilizado para hacer las construcciones, pFN12 (*gltB*) y pFN13, (*gltS*) y otra que contenía los genes *gltB* (pFN15) y *gltS* (pFN14) bajo el control sólo del promotor *PLac* del plásmido (figura 31).

#### FIGURA 31. Construcciones plasmídicas usadas para la expresión de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803 en *E. coli*.

pFN12 y pFN15 contienen el gen *gltB* bajo el control de su propio promotor más el promotor *PLac* del plásmido pBS o bajo el control del promotor *PLac*, respectivamente. pFN13 y pFN14 contienen el gen *gltS* también bajo el control de los promotores *pLac* y el suyo propio, o bajo el control del promotor *PLac* solamente. Las flechas indican los sentidos de transcripción.



### 3.6.2. Transferencia de las distintas construcciones plasmídicas a *E. coli* CLR207 *RecA* y determinación de la actividad glutamato sintasa de las proteínas GltB y GltS recombinantes.

Las construcciones pFN12, pFN13, pFN14 y pFN15 fueron utilizadas para transformar la estirpe de *E. coli* CLR207 *RecA*. El resultado de la transformación se sembró en cajas conteniendo medio mínimo y medio rico (LB) con ampicilina y se incubó a 37 °C durante varios días. En medio mínimo no apareció ninguna colonia resultante de la transferencia de las construcciones anteriores, mientras que sí aparecieron éstas en el control llevado en paralelo con el plásmido pBG1 conteniendo el gen *gdhA* de *E. coli*. Este resultado indicaba



claramente que los genes *gltB* y *gltS* no eran capaces de restablecer la auxotrofia para el glutamato de la estirpe de *E. coli* utilizada.

De los clones cultivados en medio rico se seleccionaron las estirpes CLR-pFN12, CLR-pFN13, CLR-pFN14 y CLR-pFN15, a las que se determinó la actividad glutamato sintasa. Como se indica en la tabla 12, las estirpes de *E. coli* transformadas con las construcciones plasmídicas conteniendo los genes *gltB* y *gltS* presentaban actividad GOGAT, lo que indicaba que las proteínas GltB y GltS se expresaban y eran funcionales.

**Tabla 12. Actividad glutamato sintasa usando distintos donadores de electrones. <sup>a</sup>**

Estirpes	Actividad GOGAT (mU/mg)		
	Fd-GOGAT	MV-GOGAT	NADPH-GOGAT
CLR-pFN12 ( <i>gltB</i> )	4,5 ± 0,8	4 ± 1	nd
CLR-pFN13 ( <i>gltS</i> )	12 ± 1,0	3 ± 0,2	nd
CLR-pFN14 ( <i>gltS</i> )	204 ± 8,5	18 ± 0,2	nd
CLR-pFN15 ( <i>gltB</i> )	70 ± 6	75 ± 8	nd
SFN1+ ( <i>gltS</i> )	38 ± 6,5	7 ± 0,2	nd
SFN2+ ( <i>gltB</i> )	20 ± 2	18 ± 2	nd
CLR 207 <i>RecA</i>	nd	nd	nd
K12	nd	nd	12 ± 2

<sup>a</sup> Los ensayos de actividad glutamato sintasa se llevaron a cabo en extractos crudos de células de las estirpes de *E. coli* que se indican, cultivadas en medio LB, y de *Synechocystis* SFN1+ y SFN2+ cultivadas en medio BG1. Se usaron ferredoxina, metil-viológeno o NADPH como donadores de electrones. Los ensayos se realizaron según se describe (2.2.1.1). Los valores son la media ± error estándar de tres o cuatro medidas diferentes. nd: no detectado.

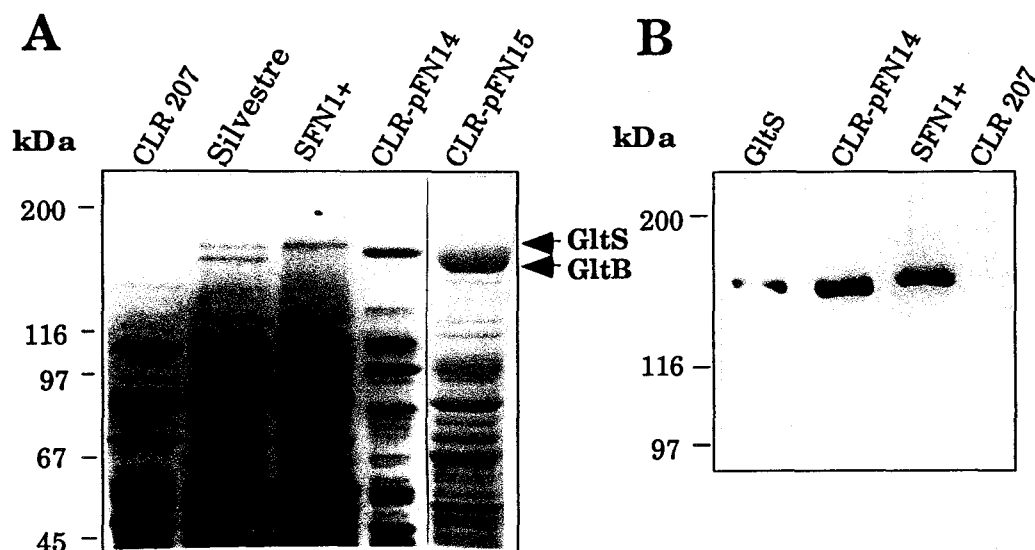
Los resultados de la tabla 12 indican que la actividad Fd-GOGAT de las estirpes CLR-pFN15 y CLR-pFN14 era entre 15-17 veces mayor que la mostrada por las estirpes CLR-pFN12 y CLR-pFN13, respectivamente, lo que sugiere que la expresión desde el promotor *PLac* es más efectiva cuando los genes están cercanos a este promotor. Por otro lado, la actividad presentada por las estirpes

CLR-pFN15 (*gltB*) y CLR-pFN14 (*gltS*) respecto a las estirpes de *Synechocystis* SFN2+ (*gltB*) y SFN1+ (*gltS*) es 3,5 y 5 veces mayor, respectivamente. La actividad GOGAT dependiente de metilviológeno de la proteína GltS es menor que la dependiente de ferredoxina, siendo ésta unas 12 veces menor en el caso de la estirpe CLR-pFN14. Por el contrario, la proteína GltB muestra una actividad muy similar con ambos donadores de electrones. No se detectó actividad dependiente de NADPH en ninguna de las estirpes utilizadas, excepto en la estirpe silvestre de *E. coli* K12, cuya GOGAT es dependiente de NADPH.

El hecho de que *E. coli* sea capaz de expresar y ensamblar correctamente las Fd-GOGATs de *Synechocystis*, pero que éstas no restauren la auxotrofia para el glutamato, sugiere que *E. coli* no posee donadores de electrones adecuados que puedan ser utilizados por estas enzimas.

### 3.6.3. Identificación del producto de expresión de los genes *gltB* y *gltS* en *E. coli*.

Extractos crudos de las estirpes CLR-pFN14, CLR-pFN15 y CLR207 *RecA*, así como las Fd-GOGATs de *Synechocystis* 6803 parcialmente purificadas se usaron para realizar una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 6%. Como se muestra en la figura 32A, en el carril de a *Synechocystis* aparecieron dos bandas de 180 y 170 kDa, correspondientes a las proteínas GltS y GltB, respectivamente, mientras que en los carriles de a CLR-pFN14 y CLR-pFN15 aparecen bandas de 175 y 165 kDa, respectivamente, que no aparecen en el carril de la estirpe CLR207 *RecA* y que consideramos que corresponden a las proteínas recombinantes GltS y GltB.



**FIGURA 32. Identificación de los productos de expresión de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803 en *E. coli*.**

A) Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 6%. Se usaron muestras conteniendo 60 µg de proteínas de preparaciones parcialmente purificadas de *Synechocystis* 6803 (silvestre), SFN1+ y SFN2+ y de extractos crudos de las estirpes CLR207 *RecA*, CLR-pFN14 y CLR-pFN15. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

B), **Inmunodetección** con anticuerpos anti Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* 6803 de GltS recombinante purificada (4 µg) y de extractos crudos de las estirpes SFN1+, CLR-pFN14 y CLR207 *RecA* (60 µg).

**3.6.4. Maduración de GltB y GltS en *E. coli*.**

La diferencia de tamaño encontrada entre las proteínas nativas y recombinantes es debida a la existencia en *E. coli* de una proteasa que reconoce la secuencia de aminoácidos CGFG de la subunidad grande de la NADPH-GOGAT, residuos 43 a 46, (Oliver *et al.*, 1987), cortándolo, de forma que queda la cisteína en la proteína madura. Esta proteasa reconoce también las secuencias CGVG de las Fd-GOGATs recombinantes residuos 37 a 40 de GltS y 43 a 46 de GltB, madurándolas igualmente. La secuenciación de la región amino-terminal de la proteína GltS recombinante (3.7.), demuestra que el primer aminoácido de esta proteína es la cisteína indicada (figura 33). Este resultado sugiere que *E. coli* madura de igual forma la proteína GltB.

Fd-*Synechocystis* GltS

**EERDACGVGFIANL**

Secuencia amino terminal de GltS

**CGVGFIANL**

**FIGURA 33. Secuencia amino terminal de GltS expresada en *E. coli*.**

Se muestran las secuencias correspondientes al sitio de maduración de GltS, así como la secuencia amino terminal determinada en la proteína recombinante.

**3.7. PURIFICACIÓN DE LA Fd-GOGAT RECOMBINANTE, GltS.**

La Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* 6803 expresada en *E. coli* se purificó con objeto de comparar sus propiedades con las de la proteína nativa, para así poder llevar a cabo un estudio físico-químico y cinético de la misma.

La purificación se llevó a cabo a partir de 18 g de células de la estirpe CLR-pFN14 recogidas mediante centrifugación y conservadas a -80 °C, como se describe (2.1.3). Las células se rompieron por tratamiento con ultrasonidos y el lisado se centrifugó a 15.000 x g, 15 min, seguido de centrifugación del

sobrenadante resultante a 40.000 x g durante 45 min. El sobrenadante de esta segunda centrifugación constituyó el extracto crudo.

La actividad glutamato sintasa presente en el extracto crudo se purificó hasta homogeneidad electroforética siguiendo las cuatro etapas de cromatografía en columna que a continuación se describen.

Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C usando tampón fosfato potásico 20 mM pH 7,5 conteniendo 2-oxoglutarato 1 mM, glutamina 1 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 1 mM (Tampón A).

### 3.7.1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

El extracto crudo se adsorbió a una columna de DEAE-celulosa (2,5 cm x 18 cm) equilibrada con el tampón A. Tras lavar la columna con 3 volúmenes de lecho de este tampón a un flujo de 60 ml/h, la elución se llevó a cabo aplicando un gradiente de NaCl 0-0,5 M en 300 ml de tampón A, a un flujo de 50 ml/h y se recogieron fracciones de 4 ml. La actividad GOGAT se eluyó en un solo pico a una fuerza iónica equivalente a 0,22-0,26 M NaCl, como se observa en la figura 34. Las fracciones con alta actividad GOGAT se mezclaron para constituir el eluato de la DEAE celulosa.

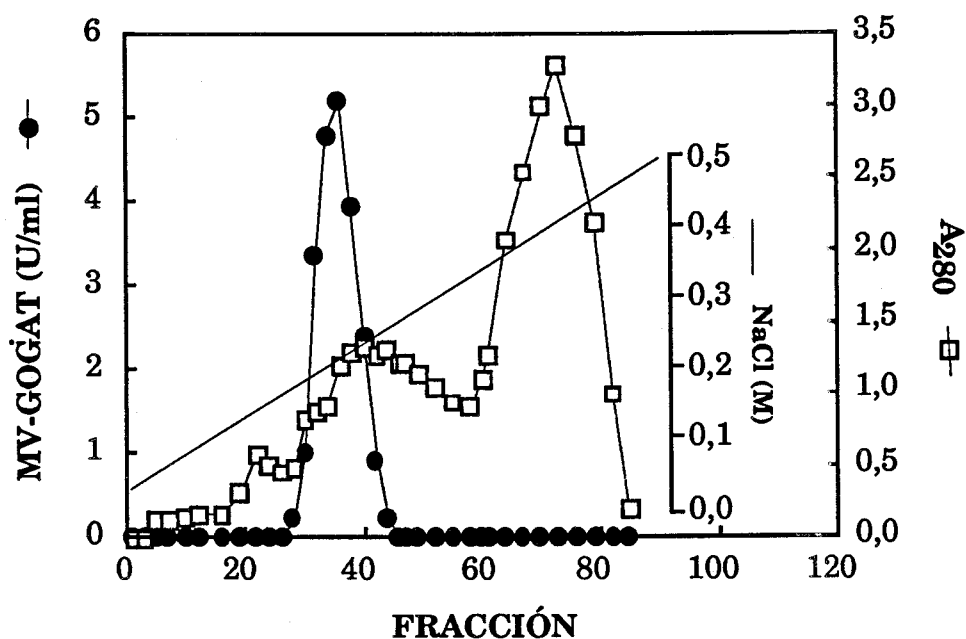


FIGURA 34. Perfil de elución de GltS recombinante en la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

Las condiciones de la cromatografía se indican en (2.3.4.1). Se aplicó a la columna un extracto crudo conteniendo 120 U de actividad MV-GOGAT.

El rendimiento de esta etapa fue del 107 % de la actividad inicial, probablemente por reactivación de la enzima o por una mayor actividad de ésta debida a la fuerza iónica del eluato. El factor de purificación fue de 3,1 veces, consiguiéndose, además, la eliminación de la ferredoxina endógena que podía interferir en etapas posteriores.

### 3.7.2. Filtración en gel Ultrogel AcA 34.

El eluato de la DEAE-celulosa se sometió a precipitación con sulfato amónico al 60% de saturación. El sedimento obtenido se resuspendió en 9 ml totales con tampón A y se sometió a filtración en una columna de gel Ultrogel AcA 34 (intervalo de fraccionamiento 20.000-350.000; LKB) de 2,5 cm x 91 cm equilibrada en tampón A. El flujo utilizado durante la cromatografía fue de 20 ml/h, recogándose 90 fracciones de 5 ml, contados a partir del volumen vacío (130 ml). La actividad GOGAT apareció como un único pico entre las fracciones 15 y 27 (figura 35).

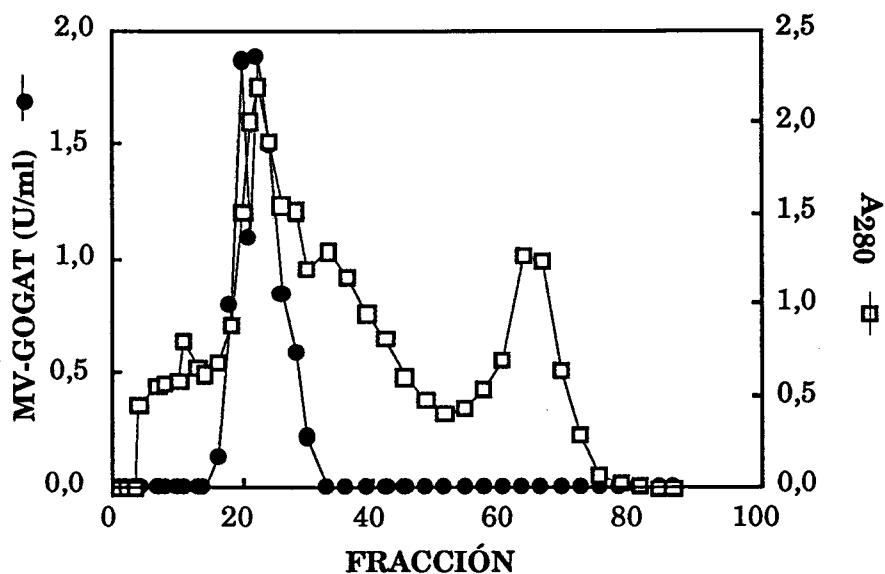


FIGURA 35. Perfil de elución de GltS recombinante en la cromatografía de filtración en gel Ultrogel AcA34.

Las condiciones de la cromatografía se indican en (2.3.4.2). Se aplicó a la columna una preparación procedente de la cromatografía en DEAE-celulosa que contenía 130 U de actividad MV-GOGAT.

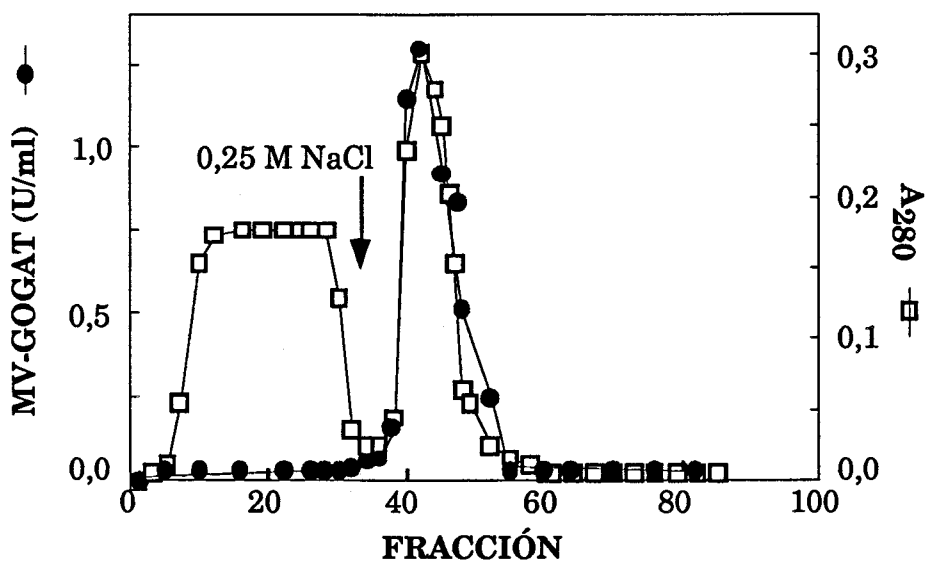
Al final de esta etapa se recuperó el 55% de la actividad inicial con un factor de purificación de 3 veces.

### **3.7.3. Primera cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.**

El gel de ferredoxina-Sefarosa se preparó utilizando ferredoxina de *Synechocystis* 6803 purificada a partir de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pCK1 conteniendo el gen *petF* (2.3.2).

El eluato de la filtración en gel con actividad GOGAT (68 ml) se aplicó a una columna de ferredoxina-Sefarosa (2 cm x 6,5 cm) equilibrada a un flujo de 18 ml/h con tampón A justo antes de su uso ya que el 2-mercaptoetanol contenido en este tampón parece provocar una decoloración progresiva del gel y como consecuencia, disminuye la capacidad de fijar glutamato sintasa (Marqués, 1988). Se recogieron fracciones de 3 ml desde la aplicación de la muestra y se siguió toda la cromatografía por la absorbancia del eluato a 280 nm. Tras lavar el lecho con unos 5 volúmenes de tampón A, a igual flujo, comenzó a decaer la absorbancia de las fracciones eluidas, las cuales contienen, aproximadamente, el 95 % de la proteína total de la muestra aplicada (figura 36).

En este momento se suplementó el tampón A con NaCl 0,25 M, consiguiéndose la elución de toda la glutamato sintasa, con un rendimiento del 54,5 % sobre la actividad inicial y un factor de purificación de 4,3 veces respecto a la cromatografía anterior.

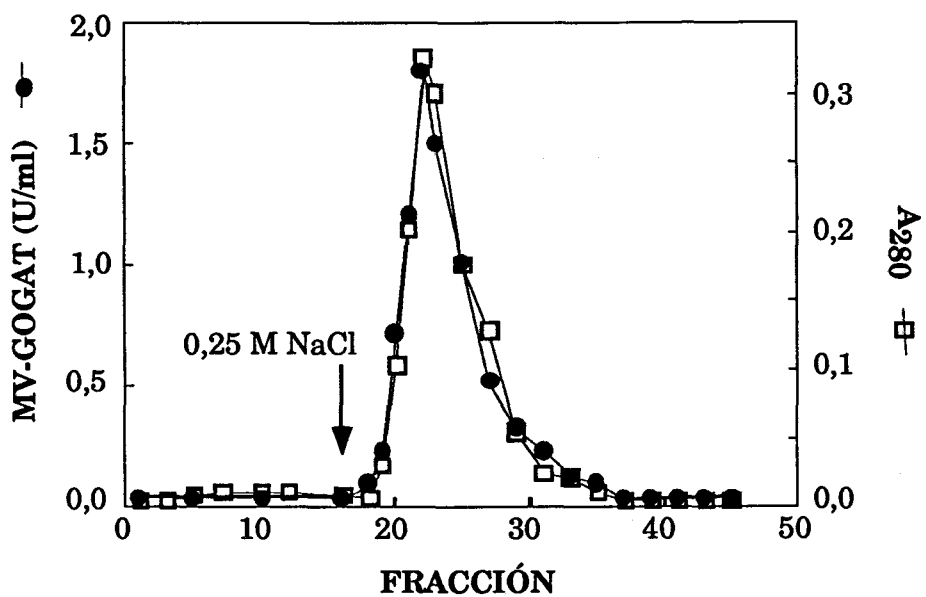


**FIGURA 36. Perfil de elución de GltS recombinante en cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.**

Las condiciones de la cromatografía se indican en (2.3.4.3). Se aplicó a la columna una preparación procedente de la cromatografía de filtración en gel conteniendo 66 U de actividad MV-GOGAT.

#### **3.7.4. Segunda cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.**

Las fracciones conteniendo actividad GOGAT se mezclaron y precipitaron con sulfato amónico al 60% de saturación. El sedimento se resuspendió en un volumen final de 5 ml con tampón A y se desaló en una columna de filtración en gel Sephadex G-25 (2,5 cm x 10 cm). El eluato se aplicó nuevamente a la columna de la cromatografía anterior, en las mismas condiciones, lavándose con 3 volúmenes de columna para eliminar las proteínas no unidas específicamente. La elución se llevó a cabo según se describe en el apartado anterior. El resultado de esta cromatografía (figura 37) supuso un rendimiento del 52 % de la actividad sobre la actividad GOGAT inicial y una purificación de 2,4 veces.

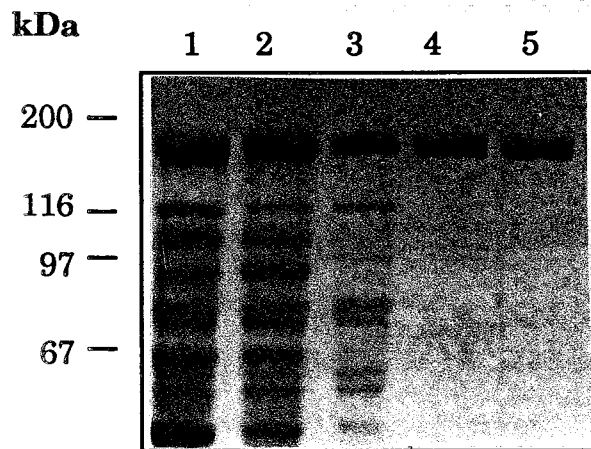


**FIGURA 37. Perfil de elución de GltS recombinante en segunda cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa.**

Las condiciones de la cromatografía se indican en (2.3.4.3). Se aplicó a la columna una preparación procedente de la primera cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina Sefarosa conteniendo 65 U de actividad MV-GOGAT.

Muestras correspondientes a los distintos pasos de purificación se sometieron a electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 6%, figura 38.





**FIGURA 38. Patrones electroforéticos de proteínas de las etapas de la purificación de la GltS recombinante.**

Electroforesis desnaturizante en SDS de las muestras procedentes de cada paso de purificación. Calle 1, extracto crudo (50  $\mu\text{g}$ ); calle 2, eluato de la DEAE-celulosa (25  $\mu\text{g}$ ); calle 3, eluato de la filtración en gel (15  $\mu\text{g}$ ); calle 4, eluato de la primera cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa (5  $\mu\text{g}$ ); calle 5, GltS purificada procedente del eluato de la segunda columna de afinidad (2  $\mu\text{g}$ ).

En la tabla 13 se resumen los resultados de la purificación de GltS de *Synechocystis* 6803 expresada en *E. coli* tras las cuatro etapas descritas en los apartados anteriores.

La recuperación final del proceso fue del 52 % respecto a la actividad inicial del extracto crudo, alcanzándose una purificación de 98,6 veces. La actividad específica de la preparación final, GltS pura a homogeneidad electroforética, fue de 36,6 U/mg proteína, como se indica en la tabla 13.

**Tabla 13. Purificación de la Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* 6803 expresada en *E. coli* <sup>a</sup>.**

Etapa	prot. (mg)	Act. (U)	Act. esp. (U/mg prot)	Recup. (%)	Purif. (veces)
Extracto crudo	2394	890	0,37	100	1
DEAE-celulosa	829	957	1,15	107	3,1
Filtración en gel Ultrogel AcA 34	140	490	3,50	55	9,4
1 <sup>a</sup> Fd-Sefarosa	32,5	488	15,0	55	40,4
2 <sup>a</sup> Fd-Sefarosa	12,6	462	36,7	52	98,6

<sup>a</sup>Material inicial: 18 g de peso fresco. Se muestra la actividad dependiente de ferredoxina.

### 3.8. PURIFICACIÓN DE LA Fd-GOGAT, GltS, DE *Synechocystis* 6803.

La Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* 6803 fue purificada parcialmente con objeto de comparar algunas de sus propiedades físico-químicas con las de la correspondiente proteína expresada en *E. coli*.

Para llevar a cabo la purificación se partió de 6,5 g de células de la estirpe SFN1+ (mutante para el gen *gltB*) congeladas a -80 °C. Estas células se resuspendieron en tampón A (apartado 3.7.) y el extracto se preparó como se indica (3.7).

A lo largo de la purificación se determinó la actividad Fd-GOGAT, para evitar así la interferencia que la ferredoxina endógena pudiera provocar sobre la actividad MV-GOGAT, al menos en extracto y durante la cromatografía en DEAE-celulosa.

El extracto crudo, con una actividad Fd-GOGAT total de 4,6 U, se adsorbió a una columna de DEAE-celulosa (6 cm x 1 cm) y se lavó ésta con 6 volúmenes de lecho de tampón, tras lo cual se eluyó la actividad Fd-GOGAT como pico único con un gradiente de 0-0,5 M NaCl en 40 ml de tampón A. Las fracciones conteniendo esta actividad (entre 0,2-0,3 M NaCl) constituyeron el eluato de la DEAE-celulosa, con una actividad total de 6 U. Este paso de cromatografía supuso una recuperación del 130% y una purificación de 2 veces (tabla 14) respecto a la actividad inicial.

**Tabla 14. Purificación parcial de la Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* 6803<sup>a</sup>.**

<b>Etapa</b>	<b>Prot. (mg)</b>	<b>Act. (U)</b>	<b>Act. esp. (mU/mg prot)</b>	<b>Recup. (%)</b>	<b>Purif. (veces)</b>
<b>Extracto crudo</b>	140	4,6	33	100	1
<b>DEAE-celulosa</b>	86	6,0	70	130	2,1
<b>Fd-Sefarosa</b>	2,1	3,2	1520	70	46,4

<sup>a</sup>Material inicial: 6,5 g de peso fresco.

El eluato de la DEAE-celulosa se precipitó con sulfato amónico al 60% de saturación y el sedimento se resuspendió en un volumen final de 2 ml totales con tampón A, tras lo cual se aplicó a una columna de Sephadex G25 (1,5 cm x 10 cm). La muestra, se aplicó posteriormente a una columna de ferredoxina-Sefarosa (1 cm x 6 cm) a un flujo de 12 ml/h, en las condiciones que se indican (2.7.3). La elución de la actividad Fd-GOGAT se llevó a cabo usando una solución de 0,25 M NaCl en tampón A, apareciendo ésta como único pico. Tras la cromatografía, se obtuvo una actividad total Fd-GOGAT de 3,2 U, con un rendimiento del 70% y una purificación de 46,4 veces (tabla 14).

### 3.9. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS Fd-GOGATs, GltS, DE *Synechocystis* 6803 NATIVA Y EXPRESADA EN *E. coli*.

#### 3.9.1. Tamaño y estructura molecular.

Como se ha descrito en la introducción, las Fd-GOGATs están constituidas por una única subunidad con una masa molecular que oscila entre 160 y 180 kDa. La masa molecular de las proteínas GltS nativas y recombinantes se determinó mediante filtración en gel, como se describe en (2.3.4.4).

GltS nativa	178 ± 4,5 kDa
GltS recombinante	173 ± 5,0 kDa

El número de subunidades se determinó a partir de la electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida al 6%. Como se muestra en la figura 32, la masa molecular determinada para las proteínas recombinante y nativa fue de 175 kDa y 180 kDa, respectivamente, lo que indica que la proteína GltS es un monómero. La diferencia de tamaño entre ambas proteínas es debida, como se explicó en el apartado 3.6.4, a la maduración de la proteína GltS en *E. coli* como resultado de la acción de una proteasa específica que reconoce una secuencia de aminoácidos en la zona amino termina,l tanto de GltS como de la subunidad grande de su propia NADPH-GOGAT.

#### 3.9.2. Constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).

Con objeto de estudiar la afinidad de las proteínas GltS nativa y recombinante por sus distintos sustratos y comparar éstas para determinar la similitud entre ambas proteínas, se realizaron ensayos seriados variando la concentración del sustrato estudiado en cada caso, manteniendo el resto de ellos en exceso para no limitar la reacción. Los resultados obtenidos se interpretaron tras realizar representaciones de Lineweaver-Burk ( $1/[S]$  frente a  $1/v$ ) y de Woolf-Augustinsson-Hofstee ( $v$  frente a  $v/[S]$ ), en el caso de la glutamina y la ferredoxina y representación de Cleland (Cleland, 1970) en el caso del 2-oxoglutarato, debido a que este sustrato resulta inhibitor al aumentar su concentración por encima de 1 mM .

Como se muestra en la tabla 15, los valores de las  $K_m$  para cada uno de los sustratos son muy similares en ambas enzimas y están en el intervalo de los valores calculados para la Fd-GOGAT, GltS, de la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Marqués *et al.*, 1992).

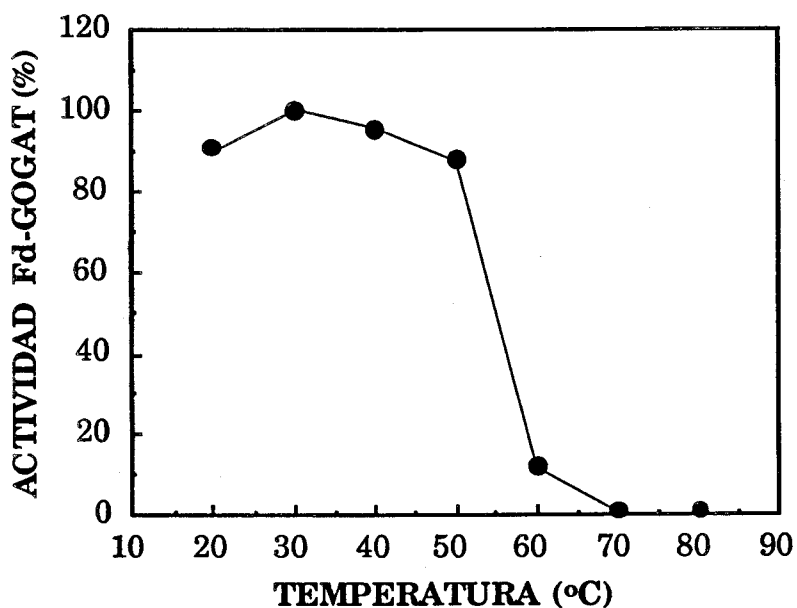
**Tabla 15. Constantes de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de las Fd-GOGATs, GltS, nativa y recombinante de *Synechocystis* 6803.**

	$K_m$ aparente		
	Ferredoxina ( $\mu$ M)	Glutamina (mM)	2-oxoglutarato (mM)
GltS nativa	3,5	2,5	0,5
GltS recombinante	4,5	2,2	0,6

Los valores similares de las  $K_m$  para cada uno de los sustratos, tanto de la proteína nativa como recombinante, así como la actividad específica de la proteína GltS purificada a partir de *E. coli* (36,6 U/mg prot), similar a la actividad específica de la Fd-GOGAT de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 (35 U/mg prot), y el hecho de que los anticuerpos generados contra la proteína recombinante reconocían la correspondiente proteína nativa, sugieren que ambas proteínas son muy similares y que, por tanto, la proteína recombinante podía ser utilizada para llevar a cabo el resto de estudios físico-químicos y espectrales de la Fd-GOGAT, así como para realizar mutagénesis dirigida de residuos implicados en la unión de los distintos cofactores o de residuos que puedan afectar a la actividad o estructura de la misma.

### **3.9.3. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la actividad Fd-GOGAT.**

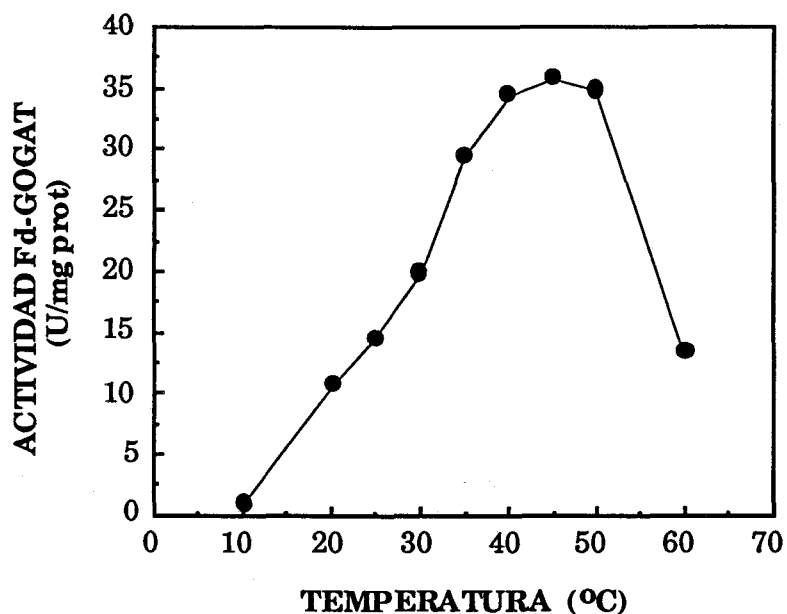
La figura 39 muestra el perfil de inactivación térmica de la Fd-GOGAT, GltS de *Synechocystis* 6803 expresada en *E. coli*, tras 20 min de incubación a las temperaturas que se indican. Como puede observarse, la temperatura media de inactivación (temperatura a la que permanece el 50% de la actividad Fd-GOGAT tras 20 min de tratamiento) fue de 55 °C, lo que indica que esta enzima no es muy termorresistente.



**FIGURA 39. Inactivación térmica de la Fd-GOGAT, Glts recombinante.**

Se muestra el porcentaje de actividad, respecto al valor inicial, que se observó tras 20 min de incubación a la temperatura correspondiente. El 100% de actividad corresponde a 360 mU (10  $\mu$ g de proteína por ensayo).

En la figura 40 se muestra el efecto de la temperatura de ensayo sobre la actividad Fd-GOGAT de una fracción purificada de la misma. La temperatura óptima obtenida es de 45 °C, disminuyendo la actividad a temperaturas superiores a este valor, probablemente por desnaturalización de la enzima.



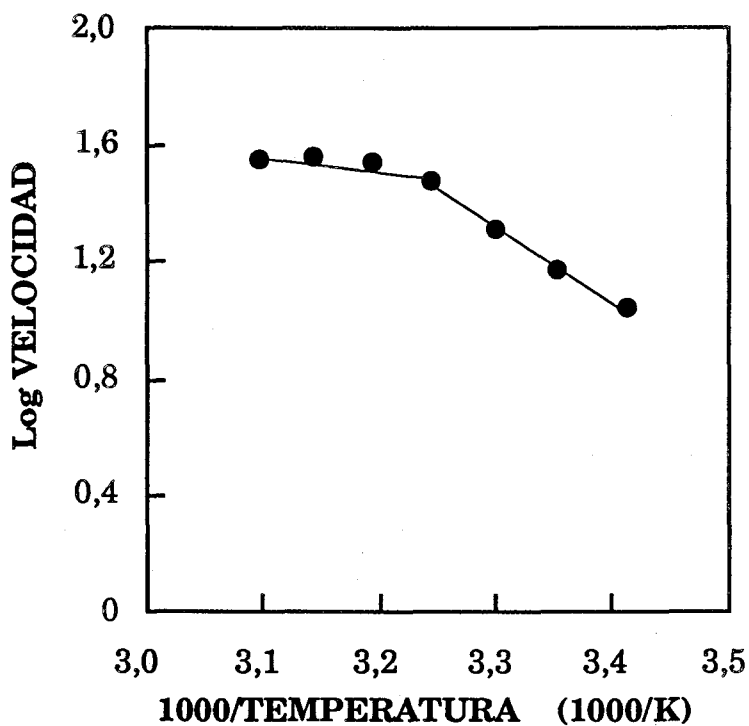
**FIGURA 40. Determinación de la temperatura óptima de ensayo de GltS recombinante.**

Se muestra la actividad que se observó tras 10 min de ensayo a la temperatura correspondiente usando 10 µg de proteína por ml de ensayo.

A partir de los valores obtenidos para el cálculo de la temperatura óptima, se realizó la representación de Arrhenius correspondiente a las velocidades determinadas a cada temperatura (figura 41). Los valores obtenidos se ajustaron a dos rectas ( $r^2_A = 0,997$  y  $r^2_B = 0,908$ ) y a partir de las ecuaciones de las rectas de regresión A y B se calcularon las energías de activación ( $E_a$ ) correspondientes, utilizando para ello la siguiente fórmula:

$$E_a = \frac{R \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot \ln(V_2/V_1)}{(T_2 - T_1)}$$

Los valores de  $E_a$  obtenidos son de 49,4 kJ/mol y 8,9 kJ/mol, respectivamente.



**FIGURA 41. Determinación de la energía de activación ( $E_a$ ) de la GltS recombinante.**

Representación de Arrhenius de los datos de la figura 40.

#### 3.9.4. Velocidad máxima y número de recambio.

A partir de la representación de dobles recíprocos de los valores obtenidos en los ensayos de actividad de la proteína purificada (10  $\mu\text{g}$  por ensayo), en los que se variaron las concentraciones de ferredoxina manteniendo a saturación el resto de sustratos necesarios para la reacción, se ha calculado la velocidad máxima de la enzima GltS.

$$V_{\text{máx}} = 420 \mu\text{M min}^{-1}$$



A partir de la velocidad máxima y teniendo en cuenta que en la reacción enzimática catalizada por la GOGAT se forman 2 moléculas de glutamato por cada molécula de glutamina utilizada, el número de recambio calculado es:

$$K_p = 3,2 \cdot 10^3 \text{ min}^{-1}$$

### 3.9.5. Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad Fd-GOGAT.

En la tabla 16 se muestra el resultado de los estudios de inhibición llevados a cabo con la proteína GltS. Como puede observarse, tanto el DON como la azaserina provocan una inhibición de la actividad enzimática, si bien el DON es un inhibidor bastante más potente. Cuando se utiliza DON, éste provoca una inhibición prácticamente total de la actividad Fd-GOGAT a concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , siendo a esta misma concentración de azaserina la actividad del 38%. El MSX, inhibidor de la glutamina sintetasa sólo provoca una inhibición de la actividad enzimática cuando se utiliza a concentraciones mayores de 1 mM.

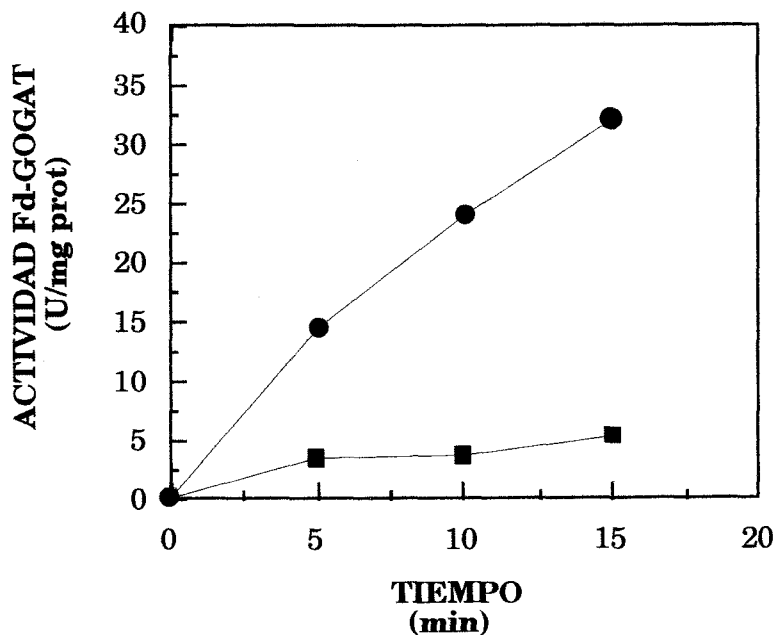
**Tabla 16. Efecto de diversos inhibidores sobre la actividad Fd-GOGAT de la enzima GltS<sup>a</sup>.**

INHIBIDOR	CONCENTRACIÓN (mM)	% ACTIVIDAD Fd-GOGAT
---	---	100
DON	0,05	0,1
	0,5	0,0
AZASERINA	0,05	38,5
	0,5	10,7
MSX	1	100
	5	55

<sup>a</sup>Las condiciones de ensayo son las estándar descritas (2.2.1), pero incluyendo en la mezcla de ensayo los inhibidores utilizados a las concentraciones indicadas. El 100 % de actividad corresponde a 100 mU.

### 3.9.6. Determinación de la actividad Fd-GOGAT de GltS recombinante con NADPH y ferredoxina:NADP<sup>+</sup> óxidoreductasa (FNR).

Como se observa en la figura 42, cuando se utiliza como donador de electrones para GltS la ferredoxina reducida mediante FNR y por NADPH, la actividad Fd-GOGAT es bastante menor que la observada usando el sistema estándar en el que la ferredoxina es reducida con ditionito. Este mismo hecho ocurre con la Fd-GOGAT de *Synechococcus* 6301, probablemente porque el ensayo utilizado no es realmente una réplica de la reacción que ocurre *in vivo* en el interior de las células.



**FIGURA 42. Determinación de la actividad Fd-GOGAT de GltS utilizando FNR.**

Los ensayos se realizaron según se describe en (2.2.2.1.3), usando 5  $\mu$ g de enzima purificada. Los círculos indican el ensayo estándar y los cuadrados, el ensayo con FNR.

### 3.10. ANÁLISIS DE GRUPOS PROSTÉTICOS Y ESTUDIOS ESPECTROSCÓPICOS DE GltS RECOMBINANTE.

La proteína GltS recombinante se utilizó para llevar a cabo un análisis de cofactores y una determinación de los espectros de absorción de la misma, tanto con la enzima oxidada como reducida.

#### 3.10.1. Espectros de absorción de la GltS recombinante.

El espectro de absorción de la proteína GltS se muestra en la figura 43. Como se observa, GltS es una flavoproteína típica con picos a 280, 370 y 436 nm y hombros a 418 y 468 nm. Éstos pueden considerarse resultado de las interacciones hidrofóbicas de la flavina con la apoproteína y son similares a los determinados en la Fd-GOGAT de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992). La relación de absorbancias  $A_{280}/A_{436}$ , presenta un valor de 4.

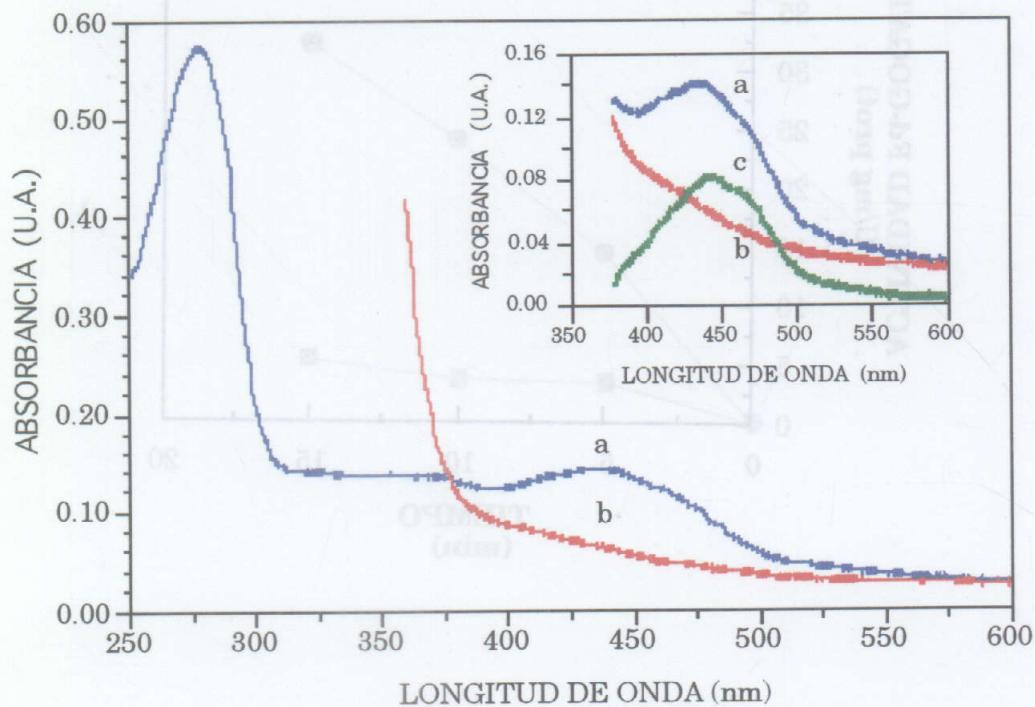


FIGURA 43. Determinación de la actividad Fd-GOGAT de GltS utilizando FNR.

#### FIGURA 43. Espectros de absorción de GltS recombinante.

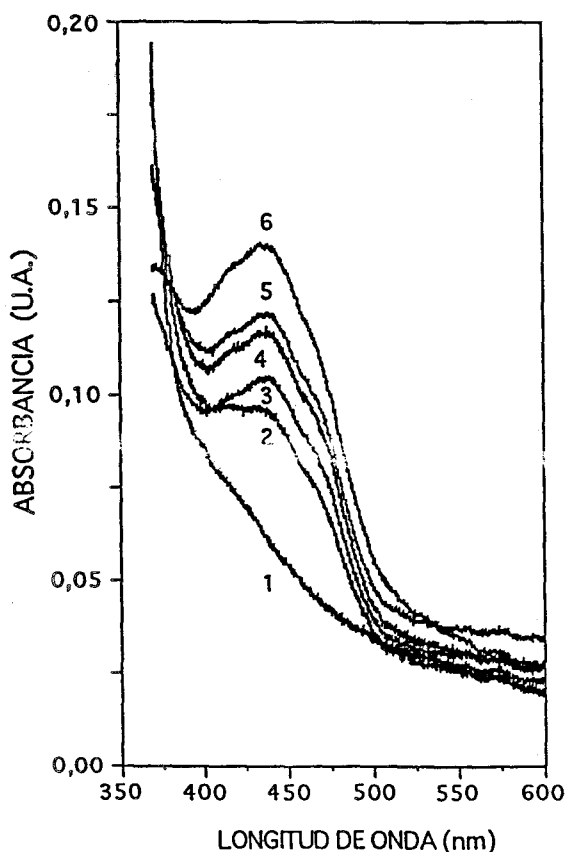
Se utilizó una preparación de GltS (5  $\mu$ M), en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,5. En azul se muestra el espectro oxidado, trazo a. En rojo, el espectro tras reducir la muestra con un exceso de ditionit, trazo b y en verde, el espectro oxidado menos reducido, trazo c.



Cuando se añadió a la solución conteniendo la proteína GltS un exceso de ditionito, manteniendo la anaerobiosis mediante gaseo con argón, se observó una disminución de la absorbancia en el espectro correspondiente a la región de longitudes de ondas visibles, con una desaparición del pico de 436 nm, figura 43, trazo b. Se muestra también en esta figura el espectro oxidado menos reducido de GltS (trazo c).

### 3.10.2. Reoxidación con 2-oxoglutarato de la GltS reducida con ditionito.

La preparación de GltS reducida con un exceso de ditionito (figura 43 trazo b), se trató con alícuotas de una solución de 2-oxoglutarato 50 mM. Tras cada incremento de 0,25 mM de la solución se realizó un espectro de la muestra para comprobar la reoxidación de la misma. Como se muestra en la figura 44, la adición de 1 mM de 2-oxoglutarato fue suficiente para obtenerse de nuevo el máximo de 436 nm correspondiente a la flavina de la enzima oxidada. Estos resultados confirman el papel catalítico de este grupo prostético en la reacción catalizada por la Fd-GOGAT. Cuando el mismo experimento se realizó añadiendo glutamina desde una solución 50 mM, no se consiguió recuperar el pico correspondiente a 436 nm.



**FIGURA 44. Reoxidación de la GltS recombinante, con 2-oxoglutarato.**

Una preparación de GltS (5  $\mu$ M), en tampón fosfato potásico 10 mM pH 7,5 fue reducida con un exceso de ditionito, en cristales (trazo 1) y posteriormente reoxidada mediante la adición de alícuotas de una solución 50 mM de 2-oxoglutarato. Los trazos 2-5 corresponden a los espectros obtenidos tras la adición sucesiva de alícuotas de 2-oxoglutarato a concentraciones finales de 0,25, 0,5, 0,75 y 1 mM. El trazo número 6 corresponde a la proteína oxidada.

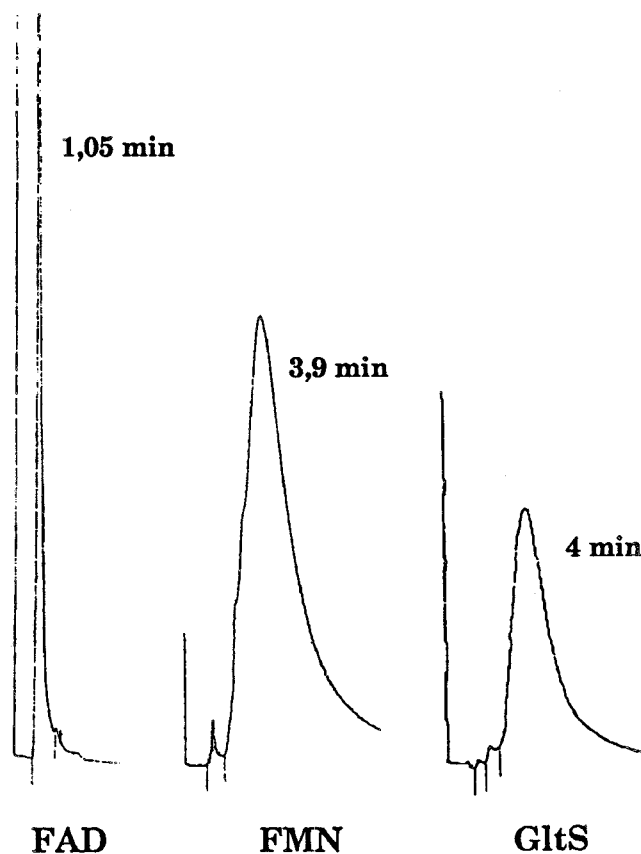
**3.10.3. Análisis de flavinas.**

La Fd-GOGAT de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 posee solamente FMN como grupo prostético flavínico (Marqués *et al.*, 1992), y no FAD y FMN como ha sido descrito en el caso de la Fd-GOGAT de algunas plantas, como la de espinaca (Hirasawa y Knaff, 1991). Sin embargo, recientemente se ha revisado esta afirmación, quedando establecida la existencia en espinaca de una única flavina (FMN), en lugar de las dos que habían sido descritas (Hirasawa *et al.*, 1996).

Para la extracción de los componentes flavínicos de GltS utilizamos los métodos de hervido y precipitación con tricloroacético en frío, tal y como se describe (2.3.12). Para ello, se usaron fracciones alícuotas de GltS, a concentraciones de 50 y 30  $\mu$ M, y tras el tratamiento se obtuvo un sobrenadante de color amarillo que se analizó mediante HPLC, utilizando FMN (100  $\mu$ M) y FAD (10 y 100  $\mu$ M) como patrones. Como se muestra en la figura 45, solamente se obtuvo un pico de flavinas cuyo tiempo de retención correspondía con el del FMN. A partir del área del pico de los distintos patrones de FMN analizados, a concentración 100  $\mu$ M, se calcularon las concentraciones de FMN presentes en las muestras procedentes de las extracciones realizadas con GltS. Con estos valores y teniendo en cuenta la concentración de GltS usada en cada caso, se determinó una estequiometría:

$$\text{FMN/GltS} = 0,985 \pm 0,075$$

lo que indica que hay una única molécula de FMN por cada molécula de GltS.



**FIGURA 45. Identificación de los componentes flavínicos de GltScombinante.**

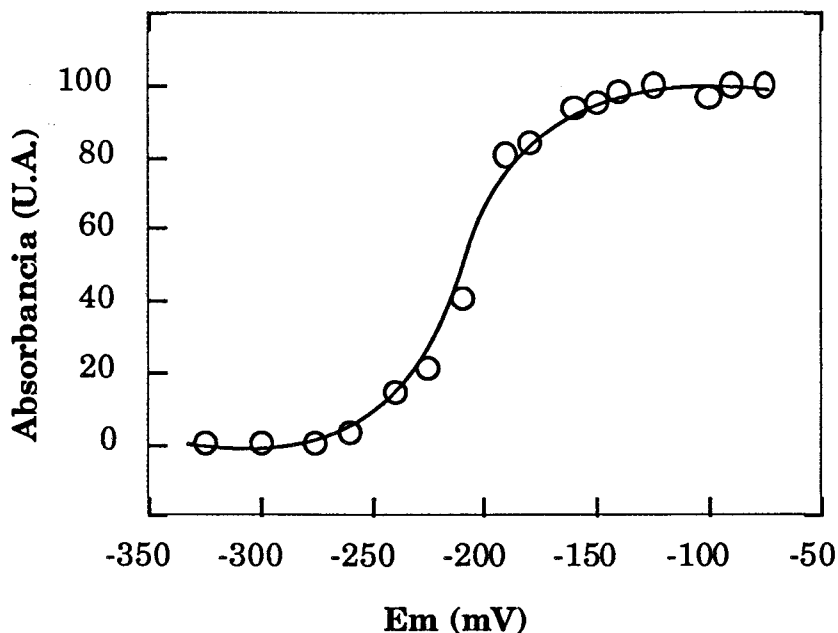
La extracción se realizó por el método de hervido, ebullición se describ en e (2.3.12). Los números indican los tiempos de retención de un patrón de FAD (10  $\mu\text{M}$ ) y otro de FMN (100  $\mu\text{M}$ ), así como de una muestra obtenida tras la extracción de una preparación de GltS 50  $\mu\text{M}$ .

#### **3.10.4. Titulación redox de GltS recombinante.**

Muestras de 3 y 5  $\mu\text{M}$  de GltS se utilizaron para determinar el potencial redox del grupo flavínico, mediante técnicas espectrofotométricas. Para ello, se

determinaron los cambios de potencial redox y de absorbancia a 445 nm, utilizando ditionito sódico como reductor y ferricianuro potásico como oxidante, en presencia de los mediadores de óxido-reducción apropiados.

El resultado de una titulación se muestra en la figura 46. A partir de los datos de varias titulaciones, se calculó un potencial de óxido-reducción  $E_m = -200 \pm 21$  y  $n=2$  calculado según la ecuación de Nernst. Estos resultados son muy similares a los obtenidos para la Fd-GOGAT de espinacas (Hirasawa *et al.*, 1992; 1996).



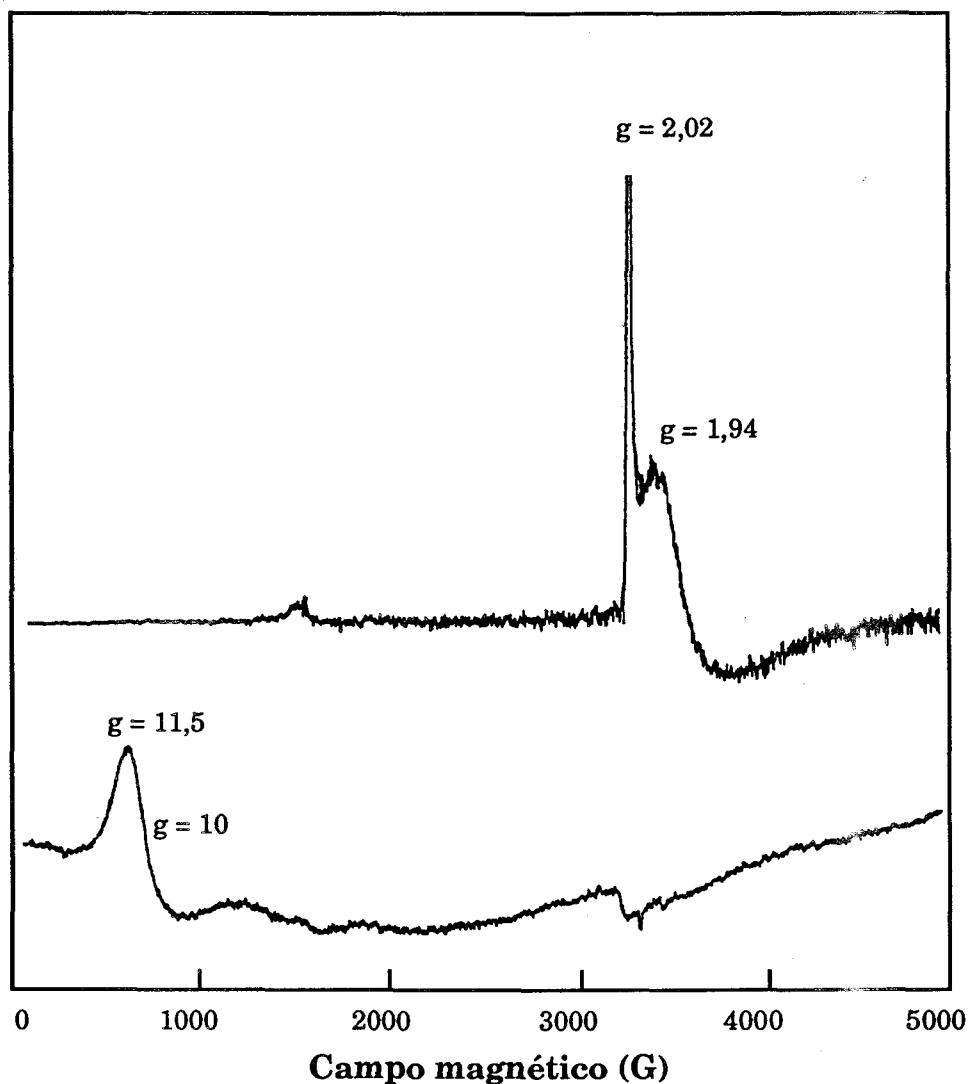
**FIGURA 46. Determinación del potencial redox de la GltS recombinante.**

La mezcla de reacción contenía 5  $\mu\text{M}$  de GltS en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7 y 2  $\mu\text{M}$  de cada uno de los siguientes mediadores: 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, antraquinona-2-sulfonato y bencil viológeno. La reducción de la se determinó siguiendo sus cambios de absorbancia a 445 nm.

### 3.10.5. Determinación del centro sulfoférrico de la GltS recombinante, mediante espectroscopía de resonancia paramagnética del electrón (EPR).

En la figura 47 se muestran los espectros de EPR de GltS oxidada y reducida con ditionito sódico. Los resultados claramente indican la presencia de

un centro  $[3\text{Fe-4S}]^+$  por molécula, con valores de  $g$  de 2,02 y 1,94 para la proteína oxidada y de  $g$  de 11,5 y 10 en estado reducido. La especie oxidada presenta una señal de relajación rápida ( $S=1/2$ ), más rápida que en otros centros  $[3\text{Fe-4S}]$ , aunque esto es difícil de observar por encima de 18K. Estos resultados son similares a los previamente publicados para la Fd-GOGAT de espinacas

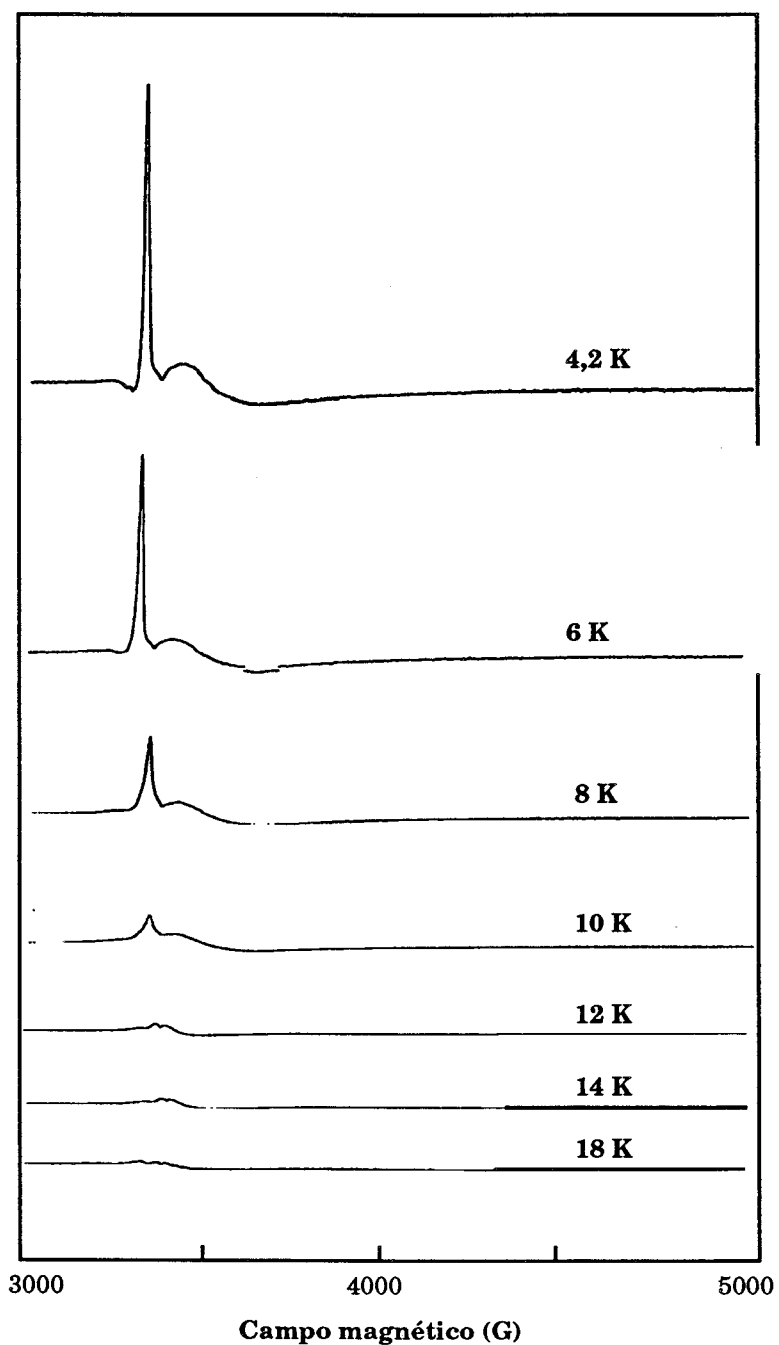


**FIGURA 47. Espectro de EPR de GltS recombinante, oxidado y reducido .**

El panel superior muestra la señal de EPR de la proteína oxidada, y el inferior, el de la proteína reducida con ditionito sódico (pH 8). Los espectros se realizaron a 4,2 K y 8 mW.



La señal de EPR es fuertemente dependiente de temperatura, como se ha descrito previamente de otros centros [3Fe-4S] (Gayda *et al.*, 1982; Vanoni *et al.*, 1992). La figura 48, muestra los espectros obtenidos a temperaturas comprendidas entre 4,2 K y 18 K y en condiciones no saturantes.



**FIGURA 48. Dependencia de la temperatura del espectro de EPR de la GltS recombinante.**

Se realizaron espectros de muestras de GltS a temperaturas comprendidas entre 4,2 K y 18 K. En todos los casos la modulación de la amplitud fue 5 Gauss .

**3.11. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE DISTINTOS DONADORES DE ELECTRONES CON GltS**

Se ha sugerido previamente la existencia de un sitio de unión a ferredoxina en todas las proteínas ferredoxina-dependientes. Las evidencias para la existencia de esta zona provienen de experimentos inmunológicos en los que anticuerpos frente a FNR de *Spinacia oleracea* reconocen la Fd-GOGAT y la Fd-nitrito reductasa, NIR, de esta misma planta, pero no cuando éstas están unidas a ferredoxina (Hirasawa *et al.*, 1989). Resultados similares se obtuvieron con anticuerpos contra la Fd-GOGAT de *Chlamydomonas reinhardtii*, los cuales reconocen también a la NIR de la misma especie e inhiben específicamente las reacciones dependientes de ferredoxina catalizadas por estas enzimas.

**3.11.1. Determinación de la actividad glutamato sintasa de GltS dependiente de ferredoxinas y flavodoxina.**

La enzima GltS recombinante, así como la proteína nativa, fueron utilizadas para llevar a cabo determinaciones de la actividad GOGAT dependiente de ferredoxina de células vegetativas (PetF), ferredoxina de heterocistos (FdxH) y flavodoxina. Como se muestra en la tabla 17, GltS sólo presenta actividad dependiente de ferredoxina, si bien en el caso de la proteína recombinante existe algo de actividad dependiente de ferredoxina de heterocistos. En ningún caso se observó actividad dependiente de flavodoxina.

**Tabla 17. Actividad GOGAT dependiente de ferredoxinas o flavodoxina. .**

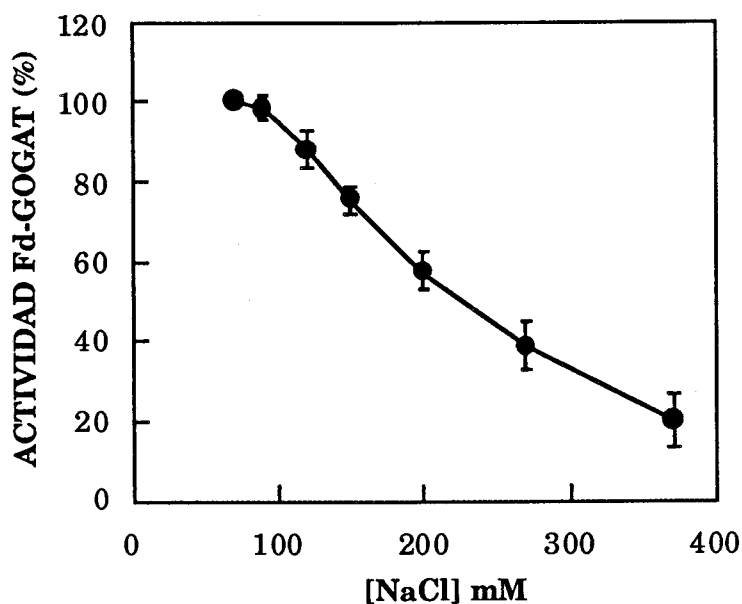
	Actividad GOGAT (%)	
	GltS recombinante	GltS nativa
<b>PetF</b>	100	100
<b>FdxH</b>	9 ± 6	nd
<b>Flavodoxina</b>	nd	nd

<sup>a</sup> La actividad GOGAT se determinó como se indica (2.2.1), utilizando ferredoxina de *Synechocystis* 6803 (PetF) y ferredoxina de heterocistos de *Anabaena* 7120 (FdxH), a concentración 10  $\mu$ M y flavodoxina de *Anabaena* 7119 a concentraciones 10 y 30  $\mu$ M. nd: no detectado. El 100 % de actividad de las proteínas recombinante y nativa es 1,4 U/mg prot y 168 mU/mg prot.

### 3.11.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad Fd-GOGAT de GltS.

Se ha descrito que la formación de complejos entre la ferredoxina y enzima que la utilizan como reductor, como FNR, NIR y NAR (Fd-nitrato reductasa) se estabiliza por interacciones electrostáticas (Hurley *et al.*, 1993; Hirasawa *et al.*, 1994; Schmitz y Böhme, 1995). Por otro lado, en espinaca, la modificación química de los grupos carboxilos de la superficie de la ferredoxina provoca una disminución de la afinidad y de la transferencia de electrones a la GOGAT (Hirasawa *et al.*, 1986). Efectos similares han sido observados con la FNR y NIR de plantas superiores (Knaff e Hirasawa, 1991). Esta hipótesis fue verificada recientemente mediante estudios de interacción entre ferredoxinas mutadas de cianobacterias y FNR, NIR y NAR (Hurley *et al.*, 1993, 1994; Schmitz y Böhme, 1995).

El efecto de la fuerza iónica sobre la actividad Fd-GOGAT fue estudiada llevando a cabo ensayos de actividad en los que se incrementó progresivamente la concentración de NaCl a la mezcla de reacción (figura 49). Como se observa, cuando la fuerza iónica aumenta, la transferencia de electrones a la GOGAT disminuye y como consecuencia, la actividad Fd-GOGAT, como es común en los sistemas estudiados en los que las interacciones electrostáticas influyen en la formación del complejo entre la ferredoxina y las enzimas dependientes de ferredoxinas.

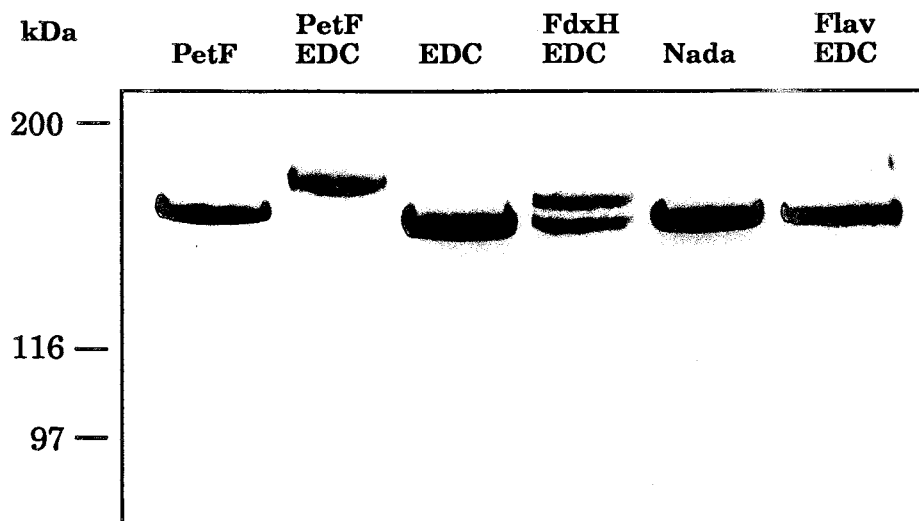


**FIGURA 49. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad Fd-GOGAT de la proteína GltS recombinante.**

El 100 % de la actividad corresponde a 5 U/mg prot. Se usó 10  $\mu$ M de ferredoxina.

### 3.11.3. Formación de complejos entre la GltS recombinante y distintos donadores de electrones.

Para el entrecruzamiento se utilizó EDC, una carbodiimida soluble en agua que hace reaccionar grupos carboxilos con grupos aminos que estén muy próximos. Para llevar a cabo la unión entre GltS, PetF, FdxH y flavodoxina, se utilizaron preparaciones de GltS a concentración 4,5  $\mu$ M y se incubaron en presencia de 4 mM de EDC y 35  $\mu$ M de cada uno de los donadores. Como se muestra en la figura 50, GltS forma un complejo con la ferredoxina, PetF, en estequiometría 1:1, a diferencia de lo descrito previamente para la Fd-GOGAT de espinacas con una estequiometría de 2:1 (Hirasawa *et al.*, 1991). En esta misma figura puede observarse la formación de un complejo entre GltS y FdxH, aunque éste no ocurre al 100% usando el mismo tiempo de incubación que con PetF. Por el contrario, no parece haber entrecruzamiento entre GltS y flavodoxina, aunque la banda de formación del complejo que aparece puede ser debida a unión inespecífica.

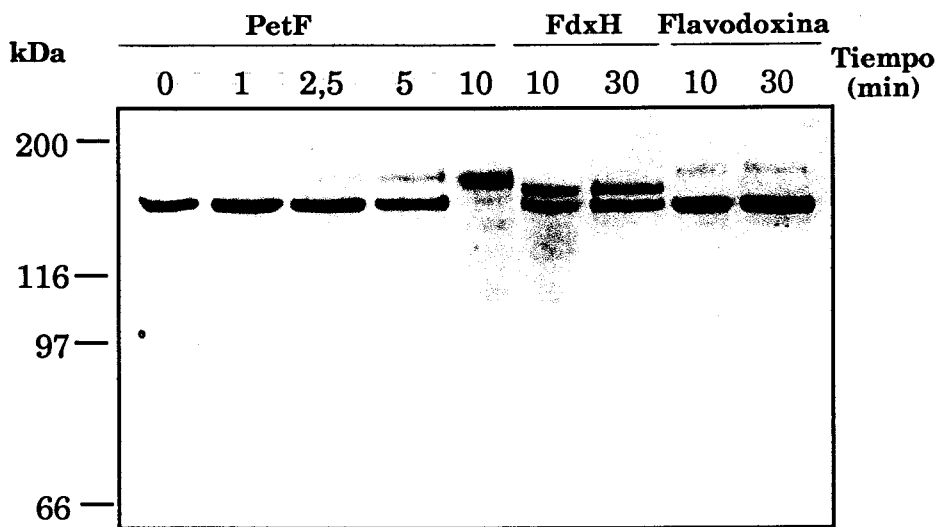


**FIGURA 50. Formación de complejos entre GltS y ferredoxinas o flavodoxina.**

Preparaciones de GltS parcialmente purificadas se incubaron en presencia de EDC con  $35 \mu\text{M}$  de los distintos donadores de electrones. A tiempo inicial y tras 10 min de incubación se tomaron muestras que se sometieron a electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 6%.

Para comprobar que la estequiometría de formación del complejo era 1:1 y que la formación de éste entre FdxH y flavodoxina con GltS no estaba limitada por el tiempo de incubación, se procedió a realizar de nuevo el entrecruzamiento tomando muestras a distintos tiempos (figura 51). Esta figura indica que efectivamente la estequiometría de formación del complejo es la indicada, habiéndose formado el 100% de éste entre PetF y GltS a los 10 min, mientras que incubaciones a 10 min y 30 min, en el caso de FdxH y flavodoxina, no aumentaron el entrecruzamiento de éstas con GltS.

Estos resultados, junto con las actividades medidas para estos con de electrones, sugieren que GltS es muy específica para ferredoxinas tipo PetF.



**FIGURA 51. Cinética de entrecruzamiento entre GltS y los distintos donadores de electrones.**

Preparaciones de GltS parcialmente purificadas se incubaron en presencia de EDC con 35  $\mu$ M de los distintos donadores de electrones. A los tiempos indicados se tomaron muestras que se sometieron a electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 6%.

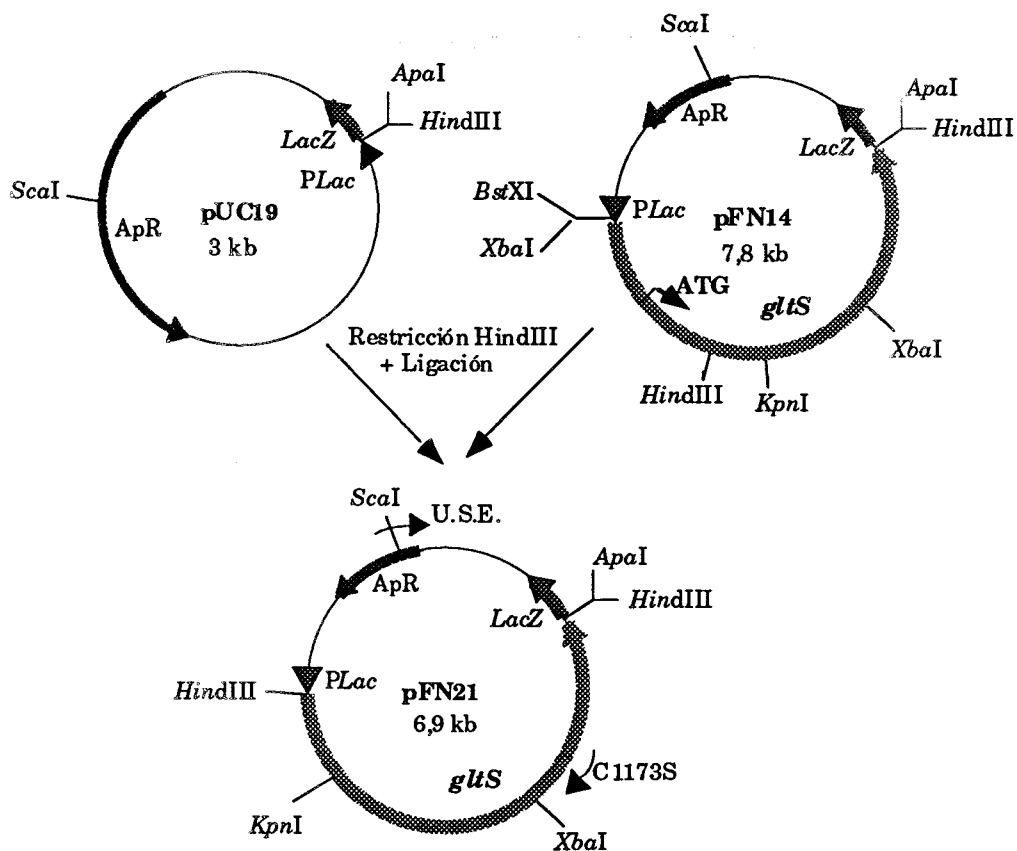
### 3.12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DEL CENTRO SULFOFÉRRICO DE GltS

La caracterización llevada a cabo con GltS purificada a partir de *E. coli*, así como su comparación con la correspondiente proteína nativa purificada a partir de la estirpe SFN1+, ponían de manifiesto la similitud existente entre ambas proteínas. Ésto nos permitirá utilizar la proteína recombinante para hacer los estudios de mutagénesis dirigida.

El primer intento llevado a cabo consistió en el cambio del residuo de Cys 1173, correspondiente al dominio implicado en la unión del centro sulfoférrico por un residuo de Ser. Para llevar a cabo esta mutagénesis se utilizó el oligonucleótido:

**C1173S            5' AAACCCGGGCCATAATGGAACCTTC 3'**

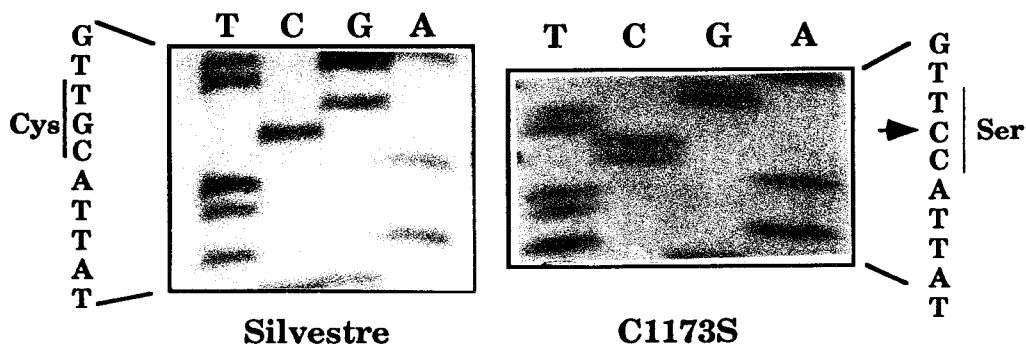
Utilizando este oligonucleótido y el suministrado por el fabricante, U.S.E., (Pharmacia, Suecia), que provoca el cambio del sitio de restricción *ScaI* del plásmido por *MluI*, se llevó a cabo el proceso de mutagénesis tal y como se describe (2.6), usando para ello el plásmido pFN21 (figura 52) que contiene un fragmento *HindIII* de 3,9 kb incluyendo parte del gen *gltS* de *Synechocystis* 6803.



**FIGURA 52. Proceso de construcción del plásmido pFN21 utilizado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida.**

Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes. C1173S es el oligonucleótido utilizado para cambiar el residuo de Cys por Ser, en el caso de GltS y nucleótidos U.S.E. es el oligo que cambia el sitio de restricción *ScaI* por *MluI*.

Una vez llevado a cabo el proceso de mutagénesis, se analizaron algunos de los clones aparecidos por restricción con la enzima *MluI*. Se aislaron los plásmidos procedentes de dos de estos clones y se secuenciaron, conteniendo uno de ellos la mutación introducida (figura 53).



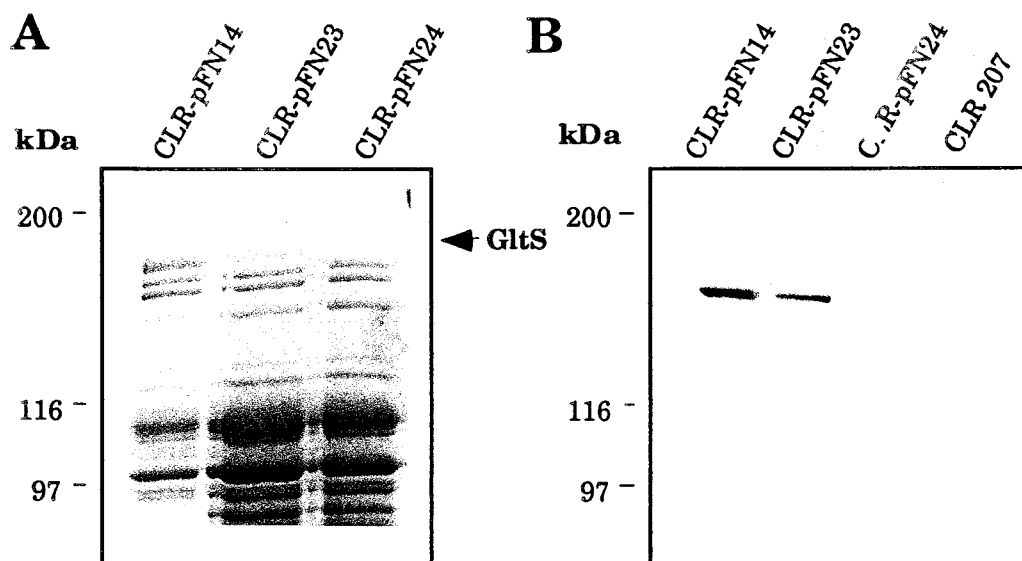
**FIGURA 53. Secuenciación de la zona correspondiente a los nucleótidos que codifican la Cys 1173 de GltS.**

La flecha indica el cambio de nucleótido introducido para conseguir la sustitución de la Cys 1173 por Sser, en la proteína GltS.

A este plásmido se le llamó pFN22 y a partir él se aisló el fragmento *Hind*III de 3,9 kb conteniendo parte del gen *gltS* e incluyendo la mutación. Este fragmento se utilizó para llevar a cabo una ligación con el plásmido pFN14, sobre el cual se pretendía reemplazar el fragmento nativo por el mutado. Tras transformar con la mezcla de ligación la estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$ , a algunos de los clones obtenidos se le extrajeron los plásmidos y se analizaron por restricción para determinar si el fragmento mutante ligado se había insertado en la orientación adecuada (pFN23) o al contrario del sentido de transcripción del gen *gltS* (pFN24).

Los plásmidos pFN23 y pFN24 fueron usados para transformar la estirpe de *E. coli* CLR207 *RecA*, obteniéndose las estirpes CLR-pFN23 y CLR-pFN24. La actividad Fd-GOGAT medida para estas estirpes no fue detectable, pero sin embargo, la estirpe CLR-pFN23 expresaba la proteína GltS mutante, como se observó por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida o por inmunodetección, en un extracto crudo libre de células de la mencionada estirpe, mientras que no lo expresaba la estirpe CLR-pFN24 (figura 54).





**FIGURA 54. Detección de la proteína GltS obtenida por mutagénesis dirigida del centro sulfoférrico.**

A) Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 6% con 40  $\mu$ g de proteínas de extractos crudos de cada una de las estirpes indicadas.

B) Inmunodetección de las proteínas GltS usando anticuerpos anti-GltS recombinante. Se cargaron 40  $\mu$ g de proteína por carril.

Estos resultados claramente indican que la mutación en la C1173 implicada en la unión del centro sulfoférrico provoca una pérdida de actividad de la enzima, probablemente debido a que esta mutación impide el correcto ensamblaje del centro [3Fe-4S] y demuestra que esta agrupación es requerida para la transferencia de electrones entre la ferredoxina y el 2-oxoglutarato.

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de las ferredoxina glutamato sintasas de cianobacterias, tanto desde el estudio de sus genes estructurales y análisis de sus secuencias, como desde un punto de vista bioquímico y fisiológico.

La expresión en *E. coli* de las Fd-GOGATs, GltB y GltS, de *Synechocystis* sp. PCC 6803, ha permitido analizar y comparar éstas con las correspondientes proteínas nativas, lo que en el futuro nos permitirá analizar el estudio de residuos implicados en la unión de los distintos cofactores de las Fd-GOGATs, así como en su actividad y estructura, mediante mutagénesis dirigida, estudios que se han iniciado en el presente trabajo.

## **4. DISCUSIÓN**

El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de las ferredoxina glutamato sintasas de cianobacterias, tanto mediante el estudio de sus genes estructurales y el análisis de sus secuencias, como desde un punto de vista bioquímico y fisiológico.

La expresión en *E. coli* de las Fd-GOGATs, GltB y GltS, de *Synechocystis* sp. PCC 6803, ha permitido comprobar su similitud con las correspondientes proteínas nativas, lo que en el futuro nos permitirá completar el estudio, ya iniciado, de residuos implicados en la unión de los distintos cofactores de las Fd-GOGATs, así como en su actividad y estructura mediante mutagénesis dirigida.

#### 4.1. EXISTENCIA DE DOS GENES PARA Fd-GOGATs (*gltB* Y *gltS*) EN *Synechocystis* 6803

Al iniciar el presente estudio, el conocimiento acerca de los genes que codificaban glutamato sintasas era muy limitado, si bien era bastante más amplio desde el punto de vista bioquímico.

Se ha descrito la existencia de dos tipos de glutamato sintasas en plantas superiores y algas, uno que utiliza piridín nucleótidos [NAD(P)H-GOGAT] y otro, ferredoxina [Fd-GOGAT] como donador de electrones (Suzuki y Gadal, 1984). Ambos tipos de glutamato sintasas parecen estar localizados en los plastos, encontrándose las Fd-GOGATs en los cloroplastos (Lea y Miflin, 1974; Suzuki y Gadal, 1982; Botella *et al.*, 1988) y las NADH-GOGATs en tejidos no fotosintéticos, como raíz (Suzuki *et al.*, 1984) y nódulos (Anderson *et al.*, 1989; Chen y Cullimore, 1989; Gregerson *et al.*, 1993). NADH-GOGAT se ha localizado también en levaduras (Cogoni *et al.*, 1995). En el caso de bacterias, solamente existen NADPH-GOGAT (Miller y Stadman, 1972; Hemmilä y Mäntsälä, 1974; Igeño *et al.*, 1993), excepto en cianobacterias, donde se han localizado sólo Fd-GOGAT (Marqués *et al.*, 1992). Recientemente se ha descrito la existencia de Fd-GOGAT y NADH-GOGAT en la cianobacteria *Plectonema boryanum* (Okuhara *et al.*, en preparación). En el caso de plantas superiores se han clonado cDNAs completos y parciales de genes nucleares de Fd-GOGATs, *gltS*, (Sakakibara *et al.*, 1991; Ávila *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1995) y NADH-GOGAT (Gregerson *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1995). También han sido clonados los genes que codifican la Fd-GOGAT, *glsF*, en las algas rojas *Antithamnion sp.* y *Porphyra purpurea*. El gen *glsF* está localizado en los cloroplastos, a diferencia de los de plantas que aparecen ya en el núcleo (Valentin *et al.*, 1993; Reith y Munholland, 1995). Los genes de la NADH-GOGAT de *S. cerevisiae* (Cogoni *et al.*, 1995) y de las dos subunidades de las NADPH-GOGATs de *E. coli* y *A. brasilense*, *gltD* y *gltB* (Oliver *et al.*, 1987; Pelanda *et al.*, 1993) han sido igualmente clonados.

El hecho de que en la cianobacteria *Synechococcus* 6301 se hubiese localizado una única enzima con actividad Fd-GOGAT y que en el caso de plantas y algas se hubiese descrito un único gen para esta proteína, hacía suponer, igualmente, la existencia de un único gen de glutamato sintasa en la cianobacteria *Synechocystis* 6803.

Basándonos en las secuencias, conocidas en el momento de iniciar este trabajo, de la Fd-GOGAT de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991) y de la subunidad grande (subunidad  $\alpha$ ) de la NADPH-GOGAT de *E. coli* (Oliver *et al.*, 1987), se seleccionaron oligonucleótidos correspondientes a dos zonas de residuos conservadas en las mismas y se amplificó, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un fragmento de DNA de *Synechocystis* 6803 de 1,2 kb. El análisis de este fragmento, mediante enzimas de restricción, demostró que el DNA amplificado era, al menos, la suma de dos fragmentos de 1,2 kb, lo que indicaba la posibilidad de dos genes de glutamato sintasas en *Synechocystis* 6803.

El uso de estos fragmentos de 1,2 kb como sondas para hibridación con DNA genómico, nos permitió clonar los dos genes de las glutamato sintasas de *Synechocystis* 6803, similares en tamaño, pero bien distintos tanto a nivel de secuencias de nucleótidos como de secuencias de aminoácidos y mapas de restricción.

La obtención por PCR de los dos fragmentos de 1,2 kb comprendidos entre los dos oligonucleótidos, fue posible dado que las correspondientes secuencias de aminoácidos están perfectamente conservadas en las dos enzimas de *Synechocystis* 6803 y en el resto de glutamato sintasas.

#### **4.2. ANÁLISIS DE LOS GENES *gltB* Y *gltS* Y DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS CORRESPONDIENTES, GltB Y GltS**

Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos que contenían los genes *gltB* y *gltS* revelaron la existencia de dos fases abiertas de lectura de 4650 pb y 4674 pb, respectivamente, que codificarían proteínas de 168.964 Da y 170.208 Da.

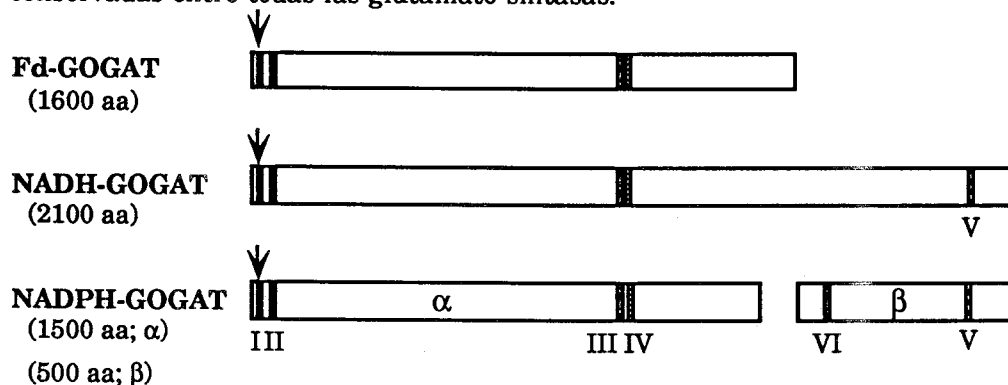
Ambos genes presentan dos posibles codones de iniciación de la traducción precedidos por posibles secuencias de unión de ribosomas (Fig. 9 y 11). En ninguno de los casos se ha determinado el promotor de los mismos, si bien en las zonas 5' aparecen secuencias que podrían ser reconocidas como promotores.

La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *gltB* y *gltS* mostraron una identidad entre ellas del 44,3 %, muy similar a la identidad basal encontrada entre todas las glutamato sintasas (Tabla 7). La

identidad de GltB con el resto de glutamato sintasas disponibles en las bases de datos, oscila entre el 41 y el 45%, siendo con la NADH-GOGAT de la cianobacteria *P. boryanum* esta identidad del 78 %; con alfalfa, del 55,2% y con la NADH-GOGAT de *S. cerevisiae* del 50,8%. En el caso de GltS, la mayor identidad se observa con las Fd-GOGATs (57-67%), siendo su identidad con el resto del orden de 42-45%. Los datos mostrados, indican claramente que la identidad entre GltS y las Fd-GOGATs es similar a la de GltB y las NADH-GOGATs. Estos datos y el hecho de que se haya localizado una enzima con actividad Fd-GOGAT y otra con actividad NADH-GOGAT en la cianobacteria *P. boryanum* y el que la identidad existente entre esta Fd-GOGAT y GltS sea del 67 % mientras la de la NADH-GOGAT y GltB es del 78 %, sugieren que GltB pudiera ser realmente una enzima dependiente de NAD(P)H.

En el caso de *P. boryanum* la NADH-GOGAT está compuesta por dos subunidades, una grande y otra pequeña, siendo ésta última similar a las subunidades pequeñas de las NADPH-GOGATs bacterianas y a la zona carboxilo terminal de las NADH-GOGATs de levaduras y plantas (figura 15). Los genes estructurales para estas dos subunidades están separados por unos 100 pb en esta cianobacteria, como ocurre con los correspondientes a las dos subunidades de las NADPH-GOGATs bacterianas, los cuales parecen haberse fusionado en el caso de las NADH-GOGATs de levaduras y plantas. Sin embargo, en *Synechocystis* 6803, el análisis de una región de DNA de 3 kb, tanto hacia la zona 3í como hacia la 5í del gen *gltB* (Tabata, comunicación personal), no muestra la existencia del gen correspondiente a esta subunidad pequeña, si bien no puede descartarse que pudiese localizarse en otra zona del genomio de esta cianobacteria.

En la Fig. 55 se muestra un esquema detallado de las distintas regiones conservadas entre todas las glutamato sintasas.



**Fig. 55. Posición relativa de las regiones conservadas entre las glutamato sintasas.**

- I.- Dominio glutamina amido transferasa tipo *purF*.
- II.- Dominio glutamina amido transferasa tipo *trpG*.
- III.- Dominio de unión de FMN.
- IV.- Sitio de unión del centro [3Fe-4S].
- V.- Zona de unión de NADH o NADPH.
- VI.- Zona de unión de FAD.

La flecha indica la Cys implicada en la maduración de la enzima.

En la Fig. 16 (3.2.2.) se muestra un dominio de unión de glutamina en las glutamato sintasas GltB y GltS, en la zona amino terminal, similar al de otras GOGATs y al de las amido transferasas tipo *pur-F* (Mei y Zalkin, 1989; Pelanda *et al.*, 1993). Igualmente, una segunda región similar a este dominio de unión de glutamina en las amido transferasas tipo *trp-G* aparece también en todas las GOGATs (Mei y Zalkin, 1989; Pelanda *et al.*, 1993). Las glutamina amido transferasas son familias de enzimas que utilizan el grupo amido de la glutamina para la biosíntesis de algunos aminoácidos, purinas y pirimidinas, coenzimas folato y nicotinamida y glucosamina 6-P y se engloban en los tipos *trp-G* y *pur-F*. En las glutamina amido transferasas tipo *pur-F* existe una Cys conservada implicada en la catálisis que aparece en la zona amino-terminal y que en las de tipo *trp-G* se encuentra entre los aminoácidos 84-91 según la enzima (Mei y Zalkin, 1989; 1990). Sin embargo, esta Cys implicada en la liberación del grupo amido de la glutamina sólo aparece en la región más amino terminal en el caso de las GOGATs, lo que sugiere que el dominio glutamina amido transferasa de las glutamato sintasas es tipo *pur-F*. Esta Cys parece ser también un sitio específico reconocido por una proteasa, dando lugar a una glutamato sintasa madura. Este es el caso de la subunidad  $\alpha$  en bacterias (Oliver *et al.*, 1987), la Fd-GOGAT de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991) y la NADH-GOGAT de *S. cerevisiae* (Cogoni *et al.*, 1995). Igualmente, las proteínas GltB y GltS de *Synechocystis* 6803 expresadas en *E. coli* son maduradas en este organismo, debido a la acción específica de esta proteasa, la cual reconoce en estas proteínas la secuencia de aminoácidos CGVGF (Fig. 33, apartado 3.6.4) madurándolas y permaneciendo la Cys en la proteína madura.

El dominio de unión del cofactor FMN aparece en la zona carboxi-terminal de las glutamato sintasas y presenta bastantes residuos idénticos a esta misma región del flavocitocromo  $b_2$  de *S. cerevisiae* (Chapman *et al.*, 1991), conteniendo dos residuos, Asp y Lys/Arg, implicados en la unión de la cadena ribitol. Una secuencia similar a una zona de unión de FAD aparece en la región más carboxi-terminal de estas proteínas, conteniendo regiones ricas en Gly que parecen ser parte de una estructura supersecundaria  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  (Wierenga *et al.*, 1985; Karplus *et al.*, 1991). Sin embargo, ni la Fd-GOGAT de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et*

*al.*, 1992), ni GltS de *Synechocystis* 6803 (apartado 3.10.1), ni la Fd-GOGAT de espinacas (Hirasawa *et al.*, en prensa), así como tampoco la subunidad  $\alpha$  de la NADPH-GOGAT de *A. brasilense* (Vanoni *et al.*, 1996) poseen FAD como grupo prostético, lo que hace suponer que esta región no está implicada en la unión de esta flavina en las glutamato sintasas.

Estudios de estructura mediante rayos X revelan que el centro [3Fe-4S] de la FdII de *Desulfovibrio gigas* y la FdI de *A. videlandii* están coordinados por 3 Cys, con un espaciamiento característico (Knaff *et al.*, 1991). Un espaciamiento similar, CX<sub>5</sub>CX<sub>4</sub>C, ha sido localizado en todas las glutamato sintasas (Fig. 16, apartado 3.2.5), así como en las enzimas fumarato reductasa de *E. coli* y succinato deshidrogenasa de *B. subtilis*, las cuales contienen también un centro [3Fe-4S] (Johnson *et al.*, 1989; Monodori *et al.*, 1992).

Como se ha comentado en el apartado 3.2.6, en todas las secuencias de glutamato sintasas existe una región fuertemente conservada, con una identidad mayor del 60 % y que presenta 19 residuos de Gly conservados, sugiriendo una conformación característica de la enzima en esta región, pues como ha sido comentado anteriormente, las regiones ricas en Gly están implicadas en la formación de estructuras supersecundarias  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  en otras flavoproteínas (Wierenga *et al.*, 1985; Karplus *et al.*, 1991). En esta zona aparece una secuencia de 20 aminoácidos conservados, LISPPPHDIIYSIEDLAQLI que presenta un único cambio en algunas de las glutamato sintasas analizadas y podría ser considerada una huella de glutamato sintasas que permitiera una conformación característica de estas enzimas, ya que al llevar a cabo una búsqueda de homología con esta región, permitiéndolo un único cambio, en todas las bases de datos, sólo se encuentran glutamato sintasas.

Existen dos regiones ricas en Gly en las subunidades  $\beta$  de las NADPH-GOGATs de *A. brasilense* y *E. coli*, que parecen ser zonas de unión de FAD y del piridín nucleótido (Pelanda *et al.*, 1993). En el caso de la NADH-GOGAT de alfalfa, la región de unión de NADH se encuentra localizada en la zona carboxi-terminal, comprendiendo 5 aminoácidos conservados entre las posiciones 1974 y 1990 (Gregerson *et al.*, 1993) y que parecen ser críticos para la unión del NADH en enzimas que utilizan este cofactor (Scrutton *et al.*, 1990) (figura 15).

Existe una región que comprende 15-16 aminoácidos bastante conservados en todas las Fd-GOGATs, excepto en GltB de *Synechocystis* 6803 (3.2.6). Esta zona presenta residuos de Hys y Lys que podrían estar implicados en la interacción con las diversas ferredoxina, puesto que residuos cargados negativamente en la ferredoxina interaccionan con residuos cargados positivamente de enzimas ferredoxina dependientes. (Hurley *et al.*, 1993, 1994).

Un estudio filogenético, usando el paquete informático PHYLIP, muestra la existencia de tres grupos definidos de glutamato sintasas, uno que incluye

todas las Fd-GOGATs y GltS de *Synechocystis*, otro que incluye a GltB y las NADH-GOGATs y un tercer grupo que comprende las NADPH-GOGATs bacterianas (figura 21).

El análisis de la existencia de los genes *gltB* y *gltS* en distintos grupos de cianobacterias indica que *gltS* está presente en todos ellos, mientras que *gltB* sólo se encuentra en *Synechocystis* 6308 y en *Pseudoanabaena* 6903. Recientemente se ha descrito la existencia de ambos genes en la cianobacteria *P. boryanum* (Okuhara *et al.*, en preparación).

A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta que la identidad basal entre todas las GOGATs es de aproximadamente el 42 %, se sugiere un origen común de los distintos tipos de glutamato sintasas. Los datos mostrados indican que *gltS* y *gltB* están en la misma línea evolutiva que los genes para Fd-GOGATs y NADH-GOGATs, respectivamente. El hecho de que los genes de las Fd-GOGATs de las algas rojas *Antithamnion* sp. y *Porphyra purpurea* estén localizados en los cloroplastos (Reith *et al.* 1993; Valentin *et al.*, 1993), mientras que los que codifican Fd-GOGATs de plantas se encuentran en el núcleo (Sakakibara *et al.*, 1991; Nalbantoglu *et al.*, 1994), sugiere que las glutamato sintasas fueron inicialmente codificadas en los plastos en eucariotas fotosintéticos y que a lo largo de la evolución se han transferidos al núcleo, como ocurre con otros genes fotosintéticos.

#### **4.3. GENERACIÓN DE MUTANTES DE LOS GENES *gltB* Y *gltS* Y PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS GLUTAMATO SINTASA DE *Synechocystis* 6803**

La existencia en *Synechocystis* 6803 de dos enzimas con actividad glutamato deshidrogenasa (Florescio *et al.*, 1987; Chávez y Candau, 1991), así como la obtención de mutantes de glutamato sintasa en *E. coli* (Mattaj *et al.*, 1982) y *A. brasilense* (Kumar y Ghosh, 1993), sugerían la posibilidad de obtención de mutantes de *Synechocystis* 6803 sin actividad glutamato sintasa.

El hecho de que aunque se hayan conseguido mutantes simples de los genes *glnA* y *glnN* de esta misma cianobacteria, (Reyes y Florescio, 1994), no se ha podido obtener ninguno con actividad nula de glutamina sintetasa, al igual que no se han conseguido mutantes totales del gen *icd* en este mismo organismo (Muro-Pastor *et al.*, 1996), hace suponer que los niveles de glutamina y 2-oxoglutarato y, por tanto, la relación carbono/nitrógeno (C/N), son un punto clave en la regulación de la asimilación del nitrógeno y como consecuencia, sería difícil obtener mutantes carentes de actividad GOGAT, por el desbalanceo que se produciría en la relación C/N.

Se generaron mutantes simples de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803, SFN1+/- (*gltB*) y SFN2+/- (*gltS*), los cuales presentaban las versiones



inactivadas de estos genes totalmente segregadas y mostraban un crecimiento similar al de la estirpe silvestre. La actividad Fd-GOGAT de la estirpe SFN1+ fue aproximadamente el 75% de la actividad de la estirpe silvestre, resultado de la enzima GltS, mientras que la actividad de SFN2+ fue del 45% (Tabla 9). Los resultados muestran que ambos genes se expresan en la estirpe silvestre de *Synechocystis* 6803 y que las correspondientes proteínas son funcionales, siendo la actividad Fd-GOGAT medida en esta estirpe la suma de la actividad de ambas enzimas.

En ningún caso se detectó actividad dependiente de NADH o NADPH, lo que hizo suponer que estos genes codificaban dos Fd-GOGATs distintas y que la enzima codificada por *gltS* parecía ser más activa. Sin embargo, la existencia de una NADH-GOGAT en la cianobacteria *P. boryanum* con una identidad del 78% con GltB (Okuhara *et al.*, en preparación), sugieren que esta enzima pudiera ser, en realidad, una NADH-GOGAT. En este sentido es interesante destacar que la relación de la actividad Fd-GOGAT/MV-GOGAT de GltS y GltB son totalmente distintas, sugiriendo una muy baja especificidad de GltB por la ferredoxina, aunque la diferencia de actividad Fd-GOGAT de las dos enzimas de *Synechocystis* puede ser resultado de la no optimización del ensayo Fd-GOGAT para ambas enzimas, ya que usamos el ensayo puesto a punto para la actividad Fd-GOGAT de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1989).

Por otro lado, los datos indican que ninguno de los dos genes es esencial cuando se expresa el otro, de manera que ambas enzimas pueden suplirse en su actividad en la estirpe *Synechocystis* 6803.

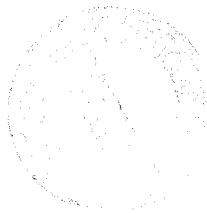
No se ha descrito la existencia de ningún mutante auxótrofo de glutamato en cianobacterias. En el caso de *Synechocystis* 6803, la obtención de esta estirpe, si fuese posible, requeriría, probablemente, la inactivación de los dos genes de las GDHs y los dos de las GOGATs, si el papel fisiológico de las GDHs es el de producción de glutamato, como ocurre en *E. coli*. Abordamos la inactivación de los dos genes de glutamato sintetas intentado obtener un mutante doble *gltB, gltS* y suponiendo que las enzimas GDHs sería capaces de producir el glutamato necesario para el crecimiento de *Synechocystis* 6803. Para ello, sobre la estirpe SFN1+ (mutante de *gltB*), se intentó inactivar el gen *gltS*. Todos los transformantes obtenidos seguían presentando actividad Fd-GOGAT debido a la presencia de cromosomas con la copia silvestre del gen *gltS* y cromosomas con la copia inactivada, ya que las cianobacterias son organismos poliploides con 12-15 cromosomas iguales por célula (Labarre *et al.*, 1989). Los intentos de conseguir un mayor número de cromosomas con el gen *gltS* inactivado, mediante el incremento de la concentración del antibiótico utilizado, no permitieron una segregación mayor al 50%.

Cuando algunos de los transformantes se cultivaron en medios con amonio, con amonio más glutamato o con amonio más 2-oxoglutarato (para favorecer la actividad GDH), así como con los aminoácidos glutamato o arginina como única fuente nitrogenada, fácilmente transportados por la alta afinidad de sus transportadores (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990), no se consiguió aumentar la segregación de cromosomas con el gen *gltS* inactivado. Hay que indicar que, a diferencia de lo que ocurre en *Anabaena* 7120 en que el medio de cultivo con 2-oxoglutarato aumentaba la segregación del gen *icd* inactivado, lo que sugiere que este cetoácido debe ser transportado al interior celular (Muro-Pastor *et al.*, en prensa), no se sabe si en *Synechocystis* 6803 se transporta este compuesto, con lo cual no podemos asegurar que no sea posible conseguir un aumento de la segregación del gen *gltS* inactivado si se favorece la actividad glutamato deshidrogenasa.

La imposibilidad de obtener un mutante doble de los genes *gltB* y *gltS* podría deberse a la toxicidad de la glutamina que se acumula cuando se corta la ruta GS-GOGAT a nivel de la glutamato sintasa, pues como se observa en la figura 28, el mutante SFN3 presenta niveles intracelulares de glutamina mayores que los mutantes simples o la estirpe silvestre, mientras que la actividad GS y, por tanto, la síntesis de glutamina, no varía con respecto al organismo silvestre (figura 29).

Las cianobacterias, al igual que los organismos fotosintéticos (Mifflin y Lea, 1980), utilizan como ruta principal para la asimilación de amonio, la ruta GS-GOGAT, la cual tiene como rendimiento neto la producción de una molécula de glutamato.

En *Synechocystis* 6803 existen, además de las glutamato sintasas, dos enzimas con actividad glutamato deshidrogenasa, si bien su contribución a la formación de glutamato no parece ser importante en la asimilación de amonio (Chávez *et al.*, 1995). Otras enzimas implicadas en la asimilación de amonio en *Synechocystis* 6803, como son GSI, GSIII e IDH, presentan una modulación de su actividad, así como de la transcripción de los genes correspondientes en función de la disponibilidad de la fuente de nitrógeno. En este sentido, la actividad GS, tanto correspondiente a las enzimas GSI como GSIII, es bastante menor en crecimiento con amonio como fuente nitrogenada que con nitrato, y se induce en ausencia de dicha fuente (Reyes y Florencio, 1994). También la actividad IDH es menor en células cultivadas en amonio, aunque esta disminución no es tan acusada y aumenta en carencia de nitrógeno, igual que ocurre a nivel de la transcripción del gen *icd* (Muro-Pastor *et al.*, en prensa). Sin embargo, no se ha observado modulación de la actividad GOGAT en función de la disponibilidad de la fuente nitrogenada, así como tampoco cambio en los niveles de proteína. Este



resultado difiere de los anteriormente observados en la cianobacteria *Synechococcus* 6301, cuya actividad Fd-GOGAT se induce, aunque no fuertemente, en condiciones de privación de la fuente de nitrógeno (Marqués, 1988).

En otros organismos fotosintéticos, como como el alga unicelular *M. braunii*, la actividad NADH-GOGAT aumenta en carencia de nitrógeno (Vigara, 1995), así como la actividad Fd-GOGAT y la transcripción del gen correspondiente en el caso de hojas de maíz (Suzuki *et al.*, 1996), observándose también cuando éstas se iluminan (Sakakibara *et al.*, 1991). Se ha descrito una inducción por luz de la expresión del gen de la Fd-GOGAT de hojas (GLU1) de *Arabidopsis* (Lam *et al.*, 1995), así como regulación de la actividad, de la síntesis de proteína y de los niveles de RNAm de la NADH-GOGAT de nódulos de alfalfa (Gregerson *et al.*, 1993) y acumulación de la proteína, aumento de la actividad y del RNAm de la Fd-GOGAT de plántulas de pino que han crecido en oscuridad respecto a las cultivadas en luz (García-Gutiérrez *et al.*, 1995).

Todos estos resultados sugieren que las glutamato sintetas de la cianobacteria *Synechocystis* 6803 no se regulan por la disponibilidad de fuente nitrogenada, probablemente por la existencia de una regulación compleja a nivel de la enzima GSI y del gen correspondiente, *glnA*, que serían el punto clave en la regulación de la incorporación de amonio a esqueletos carbonados en esta cianobacteria.

Los estudios de regulación transcripcional de los genes *gltB* y *gltS* de *Synechocystis* 6803 ayudarían a clarificar el papel fisiológico de estas enzimas, si bien todos los intentos por visualizar los transcritos correspondientes, usando distintos métodos de extracción de RNA, han dado resultados negativos. Gracias al uso de la PCR a partir de cDNAs retrotranscritos desde una muestra de RNA (RT-PCR), se ha conseguido amplificar fragmentos internos a los genes *gltB* y *gltS* desde estas preparaciones de RNA, lo que indica que los transcritos de estos genes están presentes en estas preparaciones y que deber ser muy poco abundantes.

#### **4.5. EXPRESIÓN DE LAS Fd-GOGATs DE *Synechocystis* 6803, EN *E. coli***

La utilización de la estirpe de *E. coli* CLR207 *REcA*, mutante para los genes que codifican la subunidad grande de la NADPH-GOGAT (*gltB*) y la GDH (*gdhA*) y, por tanto, auxótrofa para glutamato, supone una herramienta idónea para la búsqueda, por complementación, de genes que codifiquen proteínas capaces de catalizar la síntesis de este compuesto. Esta estirpe se ha utilizado, en nuestro grupo, para clonar el gen *gdhA* de la cianobacteria *Synechocystis* 6803 (Chávez *et al.*, 1995), que codifica la NADPH-GDH, enzima que fue capaz de

restablecer la auxotrofia de la estirpe de *E. coli*, indicando, además, que puede tener *in vivo* una función anabólica.

Los intentos de complementación de esta estirpe, utilizando los distintos plásmidos que contenían los genes *gltB* y *gltS* bajo su propio promotor o bajo el control del promotor *Plac*, fueron infructuosos en todos los medios probados. Sin embargo, sí se expresaron las proteínas GltB y GltS, determinándose en extractos de los diferentes cultivos, actividad GOGAT dependiente de ferredoxina. Estos resultados indican que las proteínas expresadas son funcionales, pero que *E. coli* no posee un donador adecuado capaz de transferir los electrones a las GOGATs recombinantes y, además, que *E. coli* es capaz de producir correctamente estas proteínas dependiente de ferredoxina y de ensamblar adecuadamente el centro sulfoférrico, [3Fe-4S], y la flavina, FMN, cofactores necesarios para el funcionamiento de la enzima.

Se ha descrito la expresión en *E. coli* de proteínas funcionales conteniendo centros sulfoférricos, tal es el caso de las ferredoxinas, PetF, de *Synechocystis* 6803 (Schmitz *et al.*, en preparación), *Anabaena* 7120 (Böhme y Haselkorn, 1989) y espinacas (Aliverti *et al.*, 1995), así como la ferredoxina de heterocistos de *Anabaena* 7120 (Böhme y Haselkorn, 1989), las cuales contienen un centro [2Fe-2S]. Algunas flavoproteínas como las ferredoxina-NADPH oxidorreductasas de espinacas (Aliverti *et al.*, 1994) y *Anabaena variabilis* (Schmitz, 1996), que contienen FMN, han sido también correctamente expresadas en *E. coli*. Recientemente, la subunidad  $\beta$  de la NADPH-GOGAT de *A. brasilense* ha sido expresada también en *E. coli*, determinándose en ésta la existencia de una molécula de FAD (Vanoni *et al.*, 1996), así como la subunidad  $\alpha$  de este mismo organismo (Curti *et al.*, 1996).

Sin embargo, no tenemos hasta el momento evidencias de la correcta expresión en *E. coli* de proteínas conteniendo FMN y un centro [3Fe-4S] que no sean las glutamato sintasas de *Synechocystis* 6803. Además, ésta es la primera vez que una GOGAT de un organismo fotosintético ha sido expresada en esta bacteria.

Los resultados mostrados en este trabajo indican que las proteínas GltB y GltS de *Synechocystis* 6803 expresadas en *E. coli* son maduradas en esta bacteria, al igual que ocurre con la subunidad grande de su propia NADPH-GOGAT (Oliver *et al.*, 1987), con la Fd-GOGAT de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991) o con la NADH-GOGAT de *S. cerevisiae* (Cogoni *et al.*, 1995). Esta maduración es debida al reconocimiento de una secuencia de aminoácidos (CGVG), por un proteasa, cortando el enlace peptídico entre la Cys y el aminoácido anterior y permaneciendo ésta en la proteína madura. Los datos del tamaño, calculados por la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida con SDS, de GltB y GltS

nativas y recombinantes, el tamaño calculado por filtración en gel de las proteínas GltS y la secuenciación del extremo amino terminal de GltS recombinante, claramente demuestran que estas proteínas son maduras en *E. coli*, mientras que en *Synechocystis* 6803 no parece existir esta proteasa.

Los datos de actividad de estas enzimas en cultivos de *E. coli*, determinados por ensayos con ferredoxina y metil viológeno, el hecho de que los anticuerpos generados contra la proteína GltS recombinante reconozcan a la proteína nativa y los datos bioquímicos, indican claramente que las proteínas recombinantes son similares a las correspondientes proteínas nativas. Este resultado es de gran interés, pues nos permite utilizar este sistema para obtener grandes cantidades de proteínas para realizar estudios de estructura-función en proteínas mutadas, obtenidas por mutagénesis dirigida.

#### **4.6. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS Fd-GOGATs, GltS, DE *Synechocystis* 6803 NATIVA Y RECOMBINANTE**

La Fd-GOGAT, enzima característica de organismos fotosintéticos ha sido purificada y caracterizada en plantas superiores como espinaca (Hirasawa y Knaff, 1991), maíz (Sakakibara *et al.*, 1991), arroz (Suzuki *et al.*, 1984) y tomate (Ávila *et al.*, 1987), en las algas verdes *C. reinhardtii* (Galván *et al.*, 1984) y *M. braunii* (Vigara, 1995), así como en la cianobacteria *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992).

La cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa ha sido empleada en las purificaciones de Fd-GOGATs realizadas en algas, plantas y cianobacterias y ha sido descrita como fundamental en la separación de las proteínas con actividad dependiente de ferredoxina y NADH en las algas *C. reinhardtii* (Márquez *et al.*, 1984) y *M. braunii* (Vigara, 1995) y plantas (Matoh *et al.*, 1980; Wallsgrove *et al.*, 1982; Ávila *et al.*, 1984; Storey y Reporter, 1987). En todos los casos, esta cromatografía ha dado muy buenos resultados y en nuestras purificaciones ha permitido una reactivación de la enzima, probablemente por la alta fuerza iónica presente en el eluato (aproximadamente 250 mM NaCl) y, si bien no ha supuesto un paso de purificación muy importante (2-3 veces), ha permitido concentrar la actividad glutamato sintasa y eliminar la ferredoxina que podía interferir en la unión de la glutamato sintasa nativa a la Fd-Sefarosa.

En el caso de la purificación de GltS recombinante, la cromatografía de filtración en gel Ultrogel AcA34 fue de gran utilidad, debido a la masa molecular de la GOGAT (175 kDa), lo que permitió una purificación total de 17 veces, aunque la recuperación fue solamente del 55%.

Como pasos de afinidad se utilizaron geles de ferredoxina-Sefarosa, los cuales han sido descritos como adsorbentes idóneos para enzimas dependientes

de ferredoxina, como son la Fd-nitrito reductasa (Ida, 1977), la Fd-nitrato reductasa (Manzano *et al.*, 1978; Candau, 1979) y, en concreto, para la purificación de las Fd-GOGATs de distintas procedencias (Suzuki y Gadal, 1982; Galván *et al.*, 1984; Hirasawa y Tamura, 1984; Marqués *et al.*, 1992; Vigara, 1995). En nuestros procesos de purificación, la cromatografía de afinidad en ferredoxina-Sefarosa ha permitido la obtención de preparaciones puras de GltS recombinantes, con una purificación total de 99 veces y un rendimiento del 52%. En el caso de la GltS nativa, sólo se realizó un paso de cromatografía de afinidad, a diferencia de los dos realizados con la proteína recombinante o la Fd-GOGAT de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992), pero la purificación, respecto del paso anterior (DEAE-celulosa), fue de unas 25 veces, con un rendimiento total del 70%.

El objeto de la purificación de la proteína nativa fue el obtener preparaciones semipurificadas que nos permitieran determinar los valores de Km para los distintos sustratos y comparar éstas con las de la proteína recombinante. La actividad específica de ésta, en relación a la de la proteína purificada desde *E. coli*, indica que haría falta purificar unas 25 veces más respecto a la cromatografía de afinidad, para obtener preparaciones puras de esta enzima. Teniendo en cuenta que el material de partida para la purificación de GltS nativa fue sólo de 6,5 g de peso fresco de células de la estirpe SFN1+, una purificación de esta enzima a partir de una cantidad de material inicial mayor, requeriría incluir algún otro paso de purificación anterior a la cromatografía de afinidad en ferredoxina-Sefarosa, con el fin de tener una preparación más enriquecida en esta enzima.

La actividad específica de la proteína GltS recombinante purificada es de 36,6 U·mg prot<sup>-1</sup>, similar a la obtenida con las Fd-GOGATs de *Synechocystis* 6803, 31 U·mg prot<sup>-1</sup> (Marqués *et al.*, 1992), arroz, 36 U·mg prot<sup>-1</sup> (Suzuki y Gadal, 1982) y espinacas, 36 U·mg prot<sup>-1</sup> (Tamura *et al.*, 1980), mientras que se han determinado valores inferiores para las Fd-GOGATs de *M. braunii*, 16 U·mg prot<sup>-1</sup> (Vigara, 1995), cebada, 15 U·mg prot<sup>-1</sup> (Márquez *et al.*, 1988) y *C. reinhardtii*, 16,5 U·mg prot<sup>-1</sup> (Gotor *et al.*, 1990).

Como se ha comentado anteriormente, el peso molecular calculado para la proteína recombinante es menor que para la proteína nativa, aproximadamente 5 kDa (175 kDa frente a 180 kDa). La secuenciación del extremo amino terminal de la proteína, indica claramente que ésta se madura en *E. coli*, liberándose 37 aminoácidos del extremo amino, siendo el primer residuo secuenciado una Cys. Esta maduración no parece ocurrir en *Synechocystis* 6803, a juzgar por esta diferencia de tamaño. A lo largo de las purificaciones de la Fd-GOGAT de la cianobacteria *Synechococcus* 6301 se observaban dos bandas de proteínas con

actividad glutamato sintasa que migraban a distinta altura en electroforesis no desnaturizante. Estas bandas se observaban también en geles en presencia de SDS, con una diferencia en sus pesos moleculares de un 3% (aproximadamente unos 5 kDa). Aunque se sugirió la posibilidad de que la banda de menor tamaño fuese resultado de proteólisis inespecífica de la proteína original, por actividad de proteasas no inhibidas totalmente por el PMSF utilizado en las purificaciones, es probable que en realidad se tratase de la forma madura de la proteína, resultado de la acción de la mencionada proteasa.

Las Fd-GOGATs, GltS, recombinante y nativa son altamente específicas para sus sustratos, glutamina y 2-oxoglutarato, como donador y aceptor, respectivamente, del grupo amino, para la síntesis de glutamato. La especificidad para la ferredoxina es igualmente alta y su actividad con metil viológeno muy baja, coincidiendo con lo descrito para las Fd-GOGATs de *C. reinhardtii* (Galván *et al.*, 1984) y *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992). Los valores de Km obtenidos para los distintos sustratos son muy similares en las proteínas nativa y recombinante, lo que indica, junto con el reconocimiento de ambas por los anticuerpos generados contra la proteína recombinante purificada, que ambas enzimas son muy similares.

Las características espectroscópicas observadas de la Fd-GOGAT, GltS, recombinante, muestran la presencia de flavina como grupo prostético en la preparación enzimática. Esta preparación mostró máximos de absorción a 280, 380 y 436 nm y hombros a 418 y 468 nm (figura 43). El espectro de absorción es similar a los publicados de las Fd-GOGATs de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992), *C. reinhardtii* (Márquez, 1985), *M. braunii* (Vigara, 1995) y espinacas (Hirasawa y Tamura, 1984), así como de las NADPH-GOGATs descritas. La adición de 2-oxoglutarato a una preparación previamente reducida con ditionito sódico, permite la recuperación del espectro típico de flavoproteína oxidada, indicando que el grupo prostético flavínico es funcional durante la catálisis, resultado similar al descrito con la Fd-GOGAT de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992). Sin embargo, cuando a una preparación de GltS reducida con ditionito se le añade glutamina, no se consigue la recuperación del espectro de la proteína oxidada, demostrando además, que la reoxidación usando 2-oxoglutarato no se debe a la presencia de trazas de oxígeno en la solución.

El análisis del grupo prostético flavínico extraído de la proteína por distintos métodos, muestra la presencia de FMN en estequiometría 1:1 y no de FAD. Este resultado es similar al descrito para las Fd-GOGATs de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992) y espinacas (Hirasawa *et al.*, en prensa), así como para la subunidad  $\alpha$  de la NADPH-GOGAT de *A. brasilense* (Vanoni *et al.*, 1996), pero difiere de lo descrito para la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii* (Márquez *et al.*, 1986), que muestra la presencia de los dos tipos de flavina. Sin embargo, el hecho

es que aunque previamente se había descrito la presencia de FAD en la Fd-GOGAT de espinacas (Hirasawa y Tamura, 1984), una reevaluación de estos datos indica que la única flavina presente en esta enzima es FMN, lo que probablemente ocurra también en la Fd-GOGAT de *C. reinhardtii*.

Únicamente se han descrito los potenciales de óxido-reducción de los grupos FMN y [3Fe-4S] de la Fd-GOGAT de espinacas, determinados midiendo cambios de absorbancia, usando ditionito sódico como reductor y ferricianuro potásico como oxidante (sólo para FMN) o por técnicas de voltametría cíclica (Hirasawa y Tamura, 1992; Hirasawa *et al.*, en prensa). Usando la primera técnica se determinó un potencial  $E_m = -180 \pm 10$  mV y  $n = 2$  (transferencia de dos electrones), calculado por la ecuación de Nernst, mientras que por voltametría se determinó que ambos grupos eran isopotenciales, con  $E_m = -200 \pm 25$  mV. Nuestros resultados, determinados midiendo cambios de absorbancia del pico correspondiente al FMN, muestran un valor  $E_m = -200 \pm 21$  mV y  $n = 2$ , muy similar a lo determinado para la Fd-GOGAT de espinacas.

El análisis de EPR de los centros sulfoferricos de GltS, muestra la presencia en esta enzima de un centro  $[3Fe-4S]^{+1,0}$ . Resultados similares han sido descritos para las NADPH-GOGATs de *E. coli* (Rendina, 1980), *A. vinelandii* (Peisach *et al.* 1979), *B. subtilis* (Matsuoka y Kimura, 1986) y *A. brasilense* (Vanoni *et al.* 1996) y para las Fd-GOGATs de espinacas (Knaff *et al.* 1991) y *C. reinhardtii* (Márquez, 1985). En todos estos casos, así como en el del centro [3Fe-4S] de la fumarato reductasa de *E. coli* (Johnson *et al.*, 1988) los espectros de EPR, a baja temperatura, muestran un pico a  $g = 2,01-2,03$  para las proteínas oxidadas y una relajación rápida ( $S = 1/2$ ). Cuando estos centros son reducidos desde  $[3Fe-4S]^{+1}$  a  $[3Fe-4S]^0$ , desaparecen las señales anteriores y aparece una señal de EPR  $g = 11,5-13$  y  $S = 2$ . La señal de EPR para GltS oxidada es fuertemente dependiente de temperatura, como ha sido descrito anteriormente para otras proteínas (Gayda *et al.*, 1982; Vanoni *et al.*, 1996).

Los parámetros cinéticos de la Fd-GOGAT, GltS, son muy similares a los descritos para otros organismos, si bien en el caso de algas como *M. braunii* y *C. reinhardtii* el valor de  $K_m$  para la ferredoxina es mayor que en el resto de Fd-GOGATs. La temperatura óptima de la enzima es algo superior a la de otros organismos,  $45^\circ\text{C}$  y la temperatura de inactivación,  $55^\circ\text{C}$ . Estos valores nos permiten calcular dos valores de energía de activación,  $49,4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  y  $8,94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , indicando un mecanismo de reacción en dos pasos. La existencia de dos energías de activación se ha descrito también para la Fd-GOGAT de *Synechococcus* 6301 (Marqués, 1988) y *M. braunii* (Vigara, 1995).

Tanto la azaserina como el DON, análogos estructurales de la glutamina, son fuertes inhibidores de las Fd-GOGATs, como se ha descrito para



*Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992), algas verdes (Galván *et al.*, 1984; Vigara, 1995), espinacas (Hirasawa y Tamura, 1984) y maíz (Matoh *et al.*, 1979), siendo el efecto del DON mucho más potente.

#### **4.7. INTERACCIÓN ENTRE LA Fd-GOGAT, GltS, DE *Synechocystis* 6803 Y PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ELECTRONES**

Se han realizado estudios de interacción de la Fd-GOGAT, GltS, con proteínas transportadoras de electrones, como son ferredoxinas de células vegetativas y de heterocistos de *Anabaena* 7120 y flavodoxina de *Anabaena* 7119, usando una carbodiimida (EDC), agente activador de grupos carboxilos que hacen reaccionar éstos con grupos aminos que estén próximos. Existen evidencias, obtenidas por modificación química (Hirasawa y Knaff, 1993; Vigara, 1995), que sugieren que grupos cargados negativamente de las ferredoxinas interaccionan con grupos positivos de las glutamato sintasas y que existe una zona común de unión de las ferredoxinas con proteínas dependientes de ferredoxina, como queda bien demostrado para la FNR y NIR de diversos organismos (Zanetti *et al.*, 1979; Knaff e Hirasawa, 1991; Medina *et al.*, 1992; Hirasawa *et al.*, 1993). Esta hipótesis ha sido confirmada recientemente por estudios de mutagénesis dirigida en ferredoxinas cianobacterianas, demostrando que una zona de las ferredoxinas, incluyendo el centro [2Fe-2S] y los residuos E94 y F65, está implicada en la transferencia de electrones a FNR, NIR, NAR y GOGAT (Hurley *et al.*, 1993; 1994; Schmitz y Böhme, 1995; Schmitz *et al.*, en preparación).

La transferencia de electrones desde la ferredoxina a GltS decrece marcadamente al aumentar la fuerza iónica, como ocurre en sistemas en los que la formación de complejos se ve influida por fuerzas electrostáticas (Hurley *et al.*, 1993; Hirasawa *et al.*, 1994; Schmitz y Böhme, 1995).

Nuestros resultados muestran la formación de un complejo entre la Fd y GltS, con estequiometría 1:1, habiéndose formado totalmente a los 10 min de incubación en presencia de EDC. Estos resultados difieren de los previamente publicados para la formación del complejo entre la Fd y la Fd-GOGAT de espinacas que mostraban una estequiometría 2:1 (Hirasawa *et al.*, 1992).

En el caso de la Fd-GOGAT de *M. braunii*, se ha detectado la formación mayoritaria del complejo de unión a ferredoxina (1:1), si bien, aparece una banda menor del complejo covalente 2:1 (Vigara, 1995). La formación de un complejo minoritario 2:1 ha sido descrita entre la Fd y la FNR de *Anabaena* 7119 (Pueyo *et al.*, 1992), las cuales forman un complejo minoritario con estequiometría 1:1, cuando la ferredoxina supera seis veces la concentración de FNR. En el caso de *M. braunii* se ha utilizado una relación Fd:GOGAT de 17:1, lo que podría estar influyendo en la producción de un complejo 2:1. En nuestro caso, no se ha

detectado nunca la formación de este segundo complejo, aunque la concentración de ferredoxina utilizada fue de aproximadamente 8 veces mayor.

A diferencia de los resultados obtenidos con la Fd-GOGAT de *M. braunii* (Vigara, 1995), no observamos más que la formación de un complejo minoritario con flavodoxina, con estequiometría 1:1 y la cantidad de éste no varía al aumentar el tiempo de incubación con EDC.

Cuando usamos ferredoxina de heterocistos de *Anabaena* 7120, FdxH, se forma un complejo con estequiometría 1:1, que si bien es mayoritario con respecto al complejo formado con flavodoxina, no aumenta con incubaciones superiores a 10 min con EDC.

Estos resultados, junto a las actividades medidas usando estos 3 donadores de electrones, indican que GltS es muy específica para la ferredoxina de células vegetativas, no pudiendo la flavodoxina sustituir a ésta como donador de electrones.

#### 4.8. OBTENCIÓN DE MUTANTES DEL CENTRO SULFOFÉRRICO

Los trabajos realizados para la obtención de mutantes del centro sulfoférrico de la Fd-GOGAT, van encaminados a clarificar la participación en la coordinación del centro [3Fe-4S] de las tres cisteínas determinadas como tales, así como el efecto de estas mutaciones sobre la actividad de la enzima.

En el caso de las glutamato sintasas, se han identificado 3 Cys, con un espaciamiento CX<sub>5</sub>CHX<sub>3</sub>C, que parecen ser las encargadas de la coordinación del centro [3Fe-4S] (Pelanda *et al.*, 1992; este trabajo). Éstas se alinean con Cys similares de las enzimas fumarato reductasa de *E. coli* y succinato deshidrogenasa de *B. subtilis*, las cuales contienen también un centro [3Fe-4S] (Johnson *et al.*, 1989; Manodori *et al.*, 1992).

Sin embargo, la participación de la tercera Cys en la coordinación de este centro no ha quedado demostrada hasta el momento. Estudios comparativos de las secuencias de fumarato reductasas con succinatos reductasas, 8Fe-ferredoxinas (2 centros [4Fe-4S]) y 7Fe-ferredoxinas (un centro [3Fe-4S] y otro [4Fe-4S]) de distintos orígenes, así como estudios espectroscópicos y de mutagénesis dirigida, parecen indicar que la tercera Cys no sería la indicada, sino una más alejada de las otras dos (Manodori *et al.*, 1992; Cecchini *et al.*, 1995).

En el caso de la fumarato reductasa de *E. coli*, enzima formada por 4 subunidades, unida a membrana y sintetizada durante el crecimiento anaeróbico con fumarato, que se reduce a succinato, como acceptor terminal de electrones, estudios espectroscópicos revelan la presencia de tres tipos de centros Fe-S: centro 1, [2Fe-2S]; centro 2, [4Fe-4S] y centro 3, [3Fe-4S] (Johnson *et al.*, 1988). Esta

enzima puede catalizar la oxidación del succinato a fumarato en un 30-40 %, en relación a la reducción del fumarato. Por estudios de EPR y por mutagénesis dirigida se ha sugerido que las C-148,-151,-154 y-214 unirían el centro [4Fe-4S], mientras que las C-158, -204 y -210 unirían el centro [3Fe-4S] (Cecchini *et al.*, 1995), de tal manera que en ambos casos, una de las tres Cys que coordina el centro estaría alejada de las otras. Mutaciones de las C-204, -210, correspondiente al centro [3Fe-4S] y -214, del centro [4Fe-4S], producen cambios en la fumarato reductasa, provocando pérdida casi total de la actividad y no permitiendo el crecimiento en condiciones anaeróbicas. Estudios de EPR han demostrado que en ninguno de los mutantes se unen ni el centro [3Fe-4S], ni el [4Fe-4S] (Manodori *et al.*, 1992). Sin embargo, un cambio de la V207 por Cys, provoca la pérdida del centro [3Fe-4S] y la aparición de un centro [4Fe-4S], con una pérdida del 50 % de la actividad y de la capacidad de crecer (Manodori *et al.*, 1992). Estos resultados no demuestran cuáles son los residuos específicos que unen cada centro, aunque sí sugieren, junto con la comparación de secuencias, que el espaciamiento CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>C...C es necesario para coordinar el centro [4Fe-4S], si bien la posición de la Cys más alejada no queda bien determinada. Mutantes de esta misma enzima en los que la P159, contigua a la C158 (sugerida en la coordinación del centro [3Fe-4S]) es cambiada por H o Q, dan proteínas que no provocan cambio alguno en el crecimiento de *E. coli* ni en la actividad, cuando el cambio es P → H, pero sí llevan a la formación de un complejo que funciona normalmente como fumarato reductasa, pero que inhibe el crecimiento aeróbico de *E. coli* en condiciones en que se necesita una succinato deshidrogenasa funcional. Análisis por EPR muestran la presencia del centro [3Fe-4S] en las proteínas mutantes (Cecchini *et al.*, 1995), lo que indica la importancia de los residuos cercanos al centro sulfoférrico para el normal funcionamiento de succinato deshidrogenasa y fumarato reductasa.

Durante el crecimiento anaeróbico de *E. coli*, con dimetilsulfóxido (DMSO) como oxidante respiratorio, se desarrolla una cadena respiratoria terminada por un proteína de unión a membrana, la dimetil sulfóxido reductasa (DMSO-reductasa), la cual contiene 4 centros [4Fe-4S] (Rothery y Weiner, 1991). Se ha sugerido un espaciamiento CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>C como implicado en la coordinación del centro en esta enzima. La comparación de esta secuencia con las de aminoácidos de la nitrato reductasa de *E. coli*, la cual contiene un centro [3Fe-4S] y varios centros [4Fe-4S], muestra la presencia de una zona similar, con espaciamiento CX<sub>5</sub>CX<sub>3</sub>C, que parece estar implicada en la unión del centro [3Fe-4S] en la subunidad que transfiere los electrones (NarH). Cambios por diversos aminoácidos de la segunda Cys del espaciamiento mostrado para la DMSO reductasa, con objeto de crear un espaciamiento idéntico al de la subunidad NarH de la nitrato reductasa de *E. coli*, provocan el cambio del centro [4Fe-4S] por [3Fe-

4S] en todas las proteínas mutantes, como se demuestra por EPR (Rothery y Weiner, 1991). Estos resultados demuestran que el espaciamento CX<sub>5</sub>CX...C es necesario para la coordinación del centro [3Fe-4S], pero no queda demostrada la localización del último residuo de Cys sugerido en esta coordinación.

Los trabajos que estamos realizando con la Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* 6803, en la que las tres Cys de la secuencia CX<sub>5</sub>CX<sub>4</sub>C, sugeridas para la coordinación del centro [3Fe-4S], son sustituidas por Ser, pueden ayudarnos a determinar tanto la participación de estos residuos como el espaciamento necesario en la coordinación del mencionado centro. Los resultados obtenidos hasta el momento claramente indican que el cambio de la Cys 1173 por Ser (equivalente a la primera Cys del espaciamento indicado), provoca una pérdida de la actividad GOGAT de la enzima, lo que sugiere que no se produce el ensamblaje a ésta del centro sulfoférrico, aunque es necesario purificar y caracterizar la enzima para tener resultados concluyentes.

Los trabajos que estamos realizando con la Fd-GOGAT, GltS, de *Synechocystis* 6803, en la que las 3 Cys de la secuencia CX<sub>5</sub>CX<sub>4</sub>C sugeridas para la coordinación del centro [3Fe-4S] son cambiados por S, pueden ayudarnos a determinar tanto la participación de estos residuos como el espaciamento necesario, en la coordinación del mencionado centro. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el cambio de la C1173 por S (equivalente a la primera Cys del mencionado espaciamento) provoca una pérdida de actividad de la proteína mutante, lo que sugiere que esta Cys está implicada en el ensamblaje del centro sulfoférrico a GltS.

## **5. CONCLUSIONES**

1. La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 contiene dos genes de glutamato sintasas, *gltB* y *gltS*, los cuales presentan un tamaño de 4640 y 4674 pb respectivamente, y codifican proteínas de 168900 Da y 170200 Da. El análisis de la comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de estos genes con el resto de las glutamato sintasas disponibles indica que ambos genes pertenecen a grupos filogenéticos distintos.

2. Se han obtenido estirpes mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 de los genes *gltB* y *gltS* mediante inserción de genes de resistencia a antibióticos. Estos mutantes presentan un crecimiento similar a la estirpe silvestre, indicando que ninguno de ellos es esencial si el otro se expresa y muestran actividad glutamato sintasa dependiente de ferredoxina, no habiéndose detectado actividad dependiente de piridín nucleótidos. En estas estirpes se han detectado los polipéptidos correspondientes a GltB y GltS, los cuales presenta un tamaño de 170 kDa y 180 kDa, respectivamente. No se ha conseguido, sin embargo, obtener mutantes carentes de actividad Fd-GOGAT, lo que sugiere la esencialidad de la actividad glutamato sintasa.

3. Las enzimas GltB y GltS no presentan modulación de su actividad por el tipo o la disponibilidad de la fuente de nitrógeno, a diferencia de lo que ocurre a la otra enzima de la ruta GS-GOGAT, glutamina sintetasa, la cual muestra una regulación compleja, tanto a nivel de la expresión del gen *glnA*, como a nivel de actividad enzimática.

4. Se han expresado los genes *gltB* y *gltS* en la estirpe de *E. coli* auxótrofa para glutamato CLR207 *RecA*. Estas proteínas no restablecen la auxotrofia de dicha estirpe, aunque muestran actividad glutamato sintasa dependiente de ferredoxina. El hecho de que estas proteínas recombinantes sean funcionales, indican que *E. coli* es capaz de expresar correctamente las proteínas GltB y GltS y ensamblarle los grupos prostéticos (FMN y centro sulfoférico) necesarios para su actividad. La imposibilidad de restablecer la auxotrofia para el glutamato sugiere que esta bacteria no posee un donador de electrones adecuado para la actividad enzimática de GltB y GltS.

5. Las proteínas recombinantes presentan una masa molecular, calculada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, de aproximadamente 5 kDa menos que las proteínas nativas, debido a la maduración que ocurre en esta bacteria por la acción de una proteasa que reconoce una secuencia específica en la zona amino terminal, al igual que ocurre con su propia NADPH-GOGAT, como ha sido demostrado mediante la

determinación de la secuencia amino terminal de la proteína GltS. Anticuerpos generados contra la GltS recombinante purificada reconocen a la proteína nativa, lo que indica que éstas son muy similares.

6. Se ha purificado a homogeneidad electroforética la proteína GltS recombinante. Sus valores de  $K_m$  para la ferredoxina, glutamina y 2-oxoglutarato son muy similares a los calculados para la proteína nativa, lo que corrobora la similitud entre ambas proteínas.

7. El análisis de los grupos prostéticos de la proteína GltS recombinante muestra la presencia de una molécula de FMN por molécula de enzima y de un centro [3Fe-4S], determinado mediante EPR. La titulación potenciométrica, mediante cambios de absorbancia, del grupo flavínico, ha permitido calcular un potencial de óxido-reducción  $E_m$  de  $-200 \pm 25$  mV y  $n=2$ .

8. Mediante mutagénesis dirigida del gen *gltS* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se ha obtenido una proteína GltS mutante, en la que se ha reemplazado una de las Cys implicadas en la unión del centro sulfoférico por Ser. Esta proteína ha sido expresada correctamente en la estirpe de *E. coli* CLR207 *RecA* y aunque presenta el tamaño adecuado, no muestra actividad Fd-GOGAT, probablemente porque el centro [3Fe-4S] no se ensambla a ésta.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**



Aliverti, A, Corrado, ME, y Zanetti, G (1994) Involvement of lysine-88 of spinach ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase in the interaction with ferredoxin. FEBS Lett **343**: 247-250.

Aliverti, A, Hagen, WR, y Zanetti, G (1995) Direct electrochemistry and EPR spectroscopy of spinach ferredoxin mutants with modified electron transfer properties. FEBS Lett **368**: 220-224.

Anderson, M, Vance, C, Heichel, G, y Miller, S (1989) Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. Plant Physiol **90**: 351-358.

Anderson, SL, y McIntosh, L (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: a blue-light-requiring process. J Bacteriol **173**: 2761-2767.

Andrews, P (1965) The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem J **96**: 595-606.

Ausubel, F, Brent, R, Kingston, R, Moore, D, Seidman, J, Smith, J, y Struhl, K (1992) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.

Ávila, C, Botella, J, Cánovas, F, Núñez de Castro, I, y Valpuesta, V (1987) Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*. Plant Physiol **85**: 1036-1039.

Ávila, C, Cánovas, FM, Núñez de Castro, Y, y Valpuesta, V (1984) Separation of two forms of glutamate synthase in leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Biochem Biophys Res Commun **122**: 1125-1130.

Ávila, C, Márquez, A, Pajuelo, P, Cannell, M, Wallsgrave, R, y Forde, B (1993) Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferredoxin-dependent glutamate synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme. Planta **189**: 475-483.

Benny, A, y Boland, M (1977) Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules. Purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupin nodules. Eur J Biochem **79**: 355-362.

Birnboim, HC, y Doly, J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl Acids Res **7**: 1513-1523.

Böhme, H, y Haselkorn, R (1989) Expression of *Anabaena* ferredoxin genes in *Escherichia coli*. Plant Mol Biol **12**: 667-672.

Botella, J, Verbelen, J, y Valpuesta, V (1988) Immunocytolocalization of ferredoxin-GOGAT in cells of green leaves and cotyledons of *Lycopersicon esculentum*. Plant Physiol **87**: 255-257.

Bottin, H, y Lagoutte, B (1992) Ferredoxin and flavodoxin from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Biochim Biophys Acta **1101**: 48-56.

Boyer, H, y Roulland-Dussoix, D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41: 459-472.

Bradford, M (1979) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Buchanan, JM (1973) The amidotransferases. *Adv Enzymol* 39: 91-183.

Burger-Wiersma, T, y Post, AF (1989) Functional analysis of the photosynthetic apparatus of *Prochlorothrix hollandica* (Prochlorales), a chlorophyll *b* containing prokaryote. *Plant Physiol* 91: 770-774.

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

Candau, P (1979) Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.

Candau, P, Manzano, C, y Losada, M (1976) Bioconversion of light energy into chemical energy through reduction with water of nitrate to ammonia. *Nature* 262: 715-717.

Carlberg, I, y Nordlund, S (1991) Purification and partial characterization of glutamate synthase from *Rhodospirillum rubrum* growth under nitrogen-fixing conditions. *Biochem J* 279: 151-154.

Carlberg, I, y Nordlund, S (1991) Purification and partial characterization of glutamate synthase from *Rhodospirillum rubrum* grown under nitrogen-fixing conditions. *Biochem J* 279: 151-154.

Cecchini, G, Sices, H, Schröder, Y, y Gunsalus, P (1995) Aerobic inactivation of fumarate reductase from *Escherichia coli* by mutation of the [3Fe-4S]-quinone binding domain. *J Bacteriol* 177: 4587-4592.

Cleland, WW (1970) The enzymes, 3rd edn. En: Boyer PD (eds) vol 2, pp. 1-65, Academic Press 3rd, NY.

Cogoni, C, Valenzuela, L, González-Halphen, D, Olivera, H, Macino, G, Ballario, P, y González, A (1995) *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like High-Molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol* 177: 792-298.

Cohen-Kupiec, R, Gurevitz, M, y Zilberstein, A (1993) Expression of *glnA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is initiated from a single *nif* like promoter under various nitrogen conditions. *J Bacteriol* 175: 7727-7731.

Cullimore, JV, y Sims, AP (1981) Occurrence of two forms of glutamate synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 20: 597-600.

Chapman, S, White, S, y Reid, G (1991) Flavocytochrome b<sub>2</sub>. *Adv Inorg Chem* **36**: 257-301.

Chauvat, F, De Vries, L, Van der Ende, A, y Van Arkel, G (1986) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol Gen Genet* **204**: 185-191.

Chauvat, F, De Vries, L, Van der Ende, A, y Van Arkel, GA (1986) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol Gen Genet* **204**: 165-191.

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

Chávez, S, Reyes, JC, Florencio, FJ, y Candau, P (1995) The NADP-glutamate dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: cloning, transcriptional analysis and disruption of the *gdhA* gene. *Plant Mol Biol* **28**: 173-188.

Chen, F, y Cullimore, J (1988) Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* **88**: 1411-1417.

Chen, F, y Cullimore, J (1989) Localization of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* **179**: 441-447.

Deng, y Nicholoff (1992) *Anal Biochem* **200**: 81.

Devereux, J, Haerberli, P, y Smithies, O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl Acids Res* **12**: 387-395.

Díaz, A, Navarro, F, Hervás, M, Navarro, JA, Chávez, S, Florencio, FJ y De la Rosa, MA (1994) Cloning and correct expression in *E. coli* of the *petJ* gene encoding cytochrome c<sub>6</sub> from *Synechocystis* 6803. *FEBS Lett* **347**: 173-177.

Douglas, SE, y Turner, S (1991) Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. *J Mol Evol* **33**: 267-273.

Elhai, J, y Wolk, C (1988) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**: 119-138.

Elmorjani, K, Liotenberg, S, Houmard, J, y Tandeau du Marsac, N (1992) Molecular characterization of the gene encoding glutamine synthetase in the cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601. *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 1296-1302.

Faeder, EJ, y Siegel, LM (1973) A rapid micromethod for determination of FMN and FAD in mixtures. *Anal Biochem* **53**: 332-336.

Felsenstein, J (1989) PHYLIP: Phylogeny Inference Package. *Cladistics* **5**: 164-166.

Florencio, F, Maruqés, S, y Candau, P (1987) Identification and characterization of glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Lett* **223**: 37-41.

Florencio, FJ, y Ramos, JL (1985) Purification and characterization of glutamine synthetase from the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **838**: 39-48.

Flores, E, Guerrero, MG, y Losada, M (1980) Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. *Arch Microbiol* **128**: 137-144.

Flores, E, Guerrero, MG, y Losada, M (1983) Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **722**: 408-416.

Flores, E, y Herrero, A (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En: Bryant DA (eds) *The molecular Biology of the Cyanobacteria*, pp. 487-517, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Flores, E, y Muro-Pastor, AM (1990) Mutation and kinetic analysis of basic amino acid transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* **154**: 521-527.

Frías, JE, Floren, E, y Herrero, A (1994) Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol Microbiol* **14**: 823-832.

Frías, JE, Mérida, A, Herrero, A, Martín-Nieto, J, y Flores, E (1993) General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. *J Bacteriol* **175**: 5710-5713.

Galván, F, Márquez, A, y Vega, J (1984) Purification and molecular properties of ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **162**: 180-187.

García-Gutiérrez, A, Cantón, FR, Gallardo, F, Sánchez-Jiménez, F, y Cánovas, FM (1995) Expression of ferredoxin-dependent glutamate synthase in dark-grown pine seedlings. *Plant Mol Biol* **27**: 115-128.

Gayda, JP, Bertrand, P, y Theodule, F (1982) Three iron cluster in iron-sulfur proteins: an EPR study of the exchange interactions. *J Chem Phys* **77**: 3387-3391.

Giovannoni, SJ, Turner, S, Olsen, GJ, Barns, S, Lane, DJ, y Pace, NR (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol* **170**: 3584-3592.

Gotor, C, M, M-RJ, Márquez, AJ, y Vega, JM (1990) Functional properties of ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* **29**: 711-717.

Gray, MW (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Gen* **5**: 294-299.



Gregerson, R, Miller, S, Twary, S, Gantt, J, y CP, V (1993) Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *Plant Cell* 5: 215-226.

Grigorieva, G, y Shestakov, S (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol Lett* 13: 367-370.

Guerrero, MG, y Lara, C (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. En: Fay P, y Baalen CV (eds) *The Cyanobacteria*, pp. 163-186, Elsevier Science Publisher, Amsterdam.

Guerrero, MG, Vega, JM, y Losada, M (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol* 32: 169-204.

Gupta, M, y Carr, NG (1981) Detection of glutamate synthase in heterocysts of *Anabaena* sp. strain 7120. *J Bacteriol* 148: 980-982.

Häger, K, Danneberg, G, y Bothe, H (1983) The glutamate synthase in heterocysts of *Nostoc muscorum*. *FEMS microbiol Lett* 17: 179-183.

Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.

Hanahan, D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. En *DNA cloning*. vol 1, (D. M. Glover) IRL Press, Oxford.

Hayakawa, T, Yamaya, T, K, K, y Ojima, K (1992) Purification, characterization, and immunological properties of NADH-dependent glutamate synthase from rice cell cultures. *Plant Physiol* 98: 1317-1322.

Hemmilä, I, y Mäntsälä, P (1978) Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J* 173: 45-52.

Henikoff, S (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28: 351-359.

Hirasawa, M, Best, JH, y Knaff, D (1993) The effect of lysine- and arginine-modifying reagents on spinach ferredoxin:nitrite oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 1140: 304-312.

Hirasawa, M, Chang, K-T, y Knaff, D (1991) The interaction of ferredoxin and glutamate synthase: crosslinking and immunological studies. *Arch Biochem Biophys* 286: 171-177.

Hirasawa, M, Chang, K-T, Morrow, KJJ, y Knaff, DB (1989) Circular dichroism, binding and immunological studies on the interaction between ferredoxin and glutamate synthase. *Biochim Biophys Acta* 977: 150-156.

Hirasawa, M, Hurley, JK, Z., S, Tollin, G, y Knaff, D Redox and kinetic studies of spinach glutamate synthase. *Arch Biochem Biophys* (en prensa).

Hirasawa, M, y Knaff, D (1991) Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1056**: 93-125.

Hirasawa, M, Robertson, D, Ameyibor, E, Johnson, M, y Knaff, D (1992) Oxidation-reduction properties of the ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaf. *Biochim Biophys Acta* **1100**: 105-108.

Hirasawa, M, Robertson, DE, Ameyibor, E, Johnson, MK, y Knaff, D (1992) Oxidation-reduction properties of the ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaf. *Biochim Biophys Acta* **1100**: 105-108.

Hirasawa, M, y Tamura, G (1984) Flavin and iron-sulfur containing ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaves. *J Biochem* **95**: 983-994.

Hirasawa, M, Tollin, G, Salomon, Z, y Knaff, D (1994) Transient kinetic and oxidation-reduction studies of spinach ferredoxin:nitrite oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* **1185**: 336-345.

Hiyatake, y Kitaoka (1981)

Holmes, DS, y Quigley, M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197.

Hurley, JK, Cheng, H, Xia, B, Markey, JL, Medina, M, Gómez-Moreno, C, y Tollin, G (1993) An aromatic amino acid is required at position 65 in *Anabaena* ferredoxina for rapid electron transfer to ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase. *Am Chem Soc* **115**:

Hurley, JK, Medina, M, Gómez-Moreno, C, y Tollin, G (1994) Further characterization by site-directed mutagenesis of the protein-protein interface in the ferredoxin/ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase system from *Anabaena*: requirement of a negative charge at position 94 in ferredoxin for rapid electron transfer. *Arch Biochem Biophys* **312**: 480-486.

Ida, S (1977) Purification to homogeneity of spinach nitrite reductase by ferredoxin-sepharose chromatography. *J Biochem* **82**: 915-918.

Igeño, M, Caballero, F, y Castillo, F (1993) Molecular and kinetic characterization of glutamate synthase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. *J Gen Microbiol* **139**: 2921-2929.

Johnson, M, Kowal, A, Morningstar, J, Oliver, M, Whittaker, K, Gunsalus, R, Ackerll, B, y Cecchini, G (1988) Subunit location of the iron sulfur clusters in fumarate reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **263**: 14732-14738.

Jovin, T, Chrambach, A, y Naughton, MA (1964) Apparatus for preparative temperature regulated polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **9**: 351-364.

Karplus, P, Daniels, M, y Herriott, J (1991) Atomic structure of ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* **251**: 60-66.

Kendall, AC, Wallsgrave, RM, Hall, NP, Turner, J, y Lea, PJ (1986) Carbon and nitrogen metabolism in barlei (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* **168**: 316-323.

Knaff, D, Hirasawa, M, Ameyibor, E, Fu, W, y Johnson, M (1991) Spectroscopic evidence for a [3Fe-4S] cluster in spinach glutamate synthase. *J Biol Chem* **266**: 15080-15084.

Knaff, DB, y Hirasawa, M (1991) Ferredoxin-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1056**: 93-125.

Kotani, H, Tanaka, A, Kaneko, T, y Sato, S (1995) Assignment of 82 known gene clusters on the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *DNA research* **2**: 133-142.

Koziol, J (1970) Fluorometric analyses of riboflavin and its coenzymes. *Methods Enzymol* **18b**: 253-285.

Labarre, J, Chauvat, F, y Thuriaux, P (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J Bacteriol* **171**: 3449-3457.

Labarre, J, Thuriaux, P, y Chauvat, F (1987) Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. *J Bacteriol* **169**: 4668-4673.

Laemmli, U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lam, H, Coschigano, K, Schultz, C, Melo-Oliveira, R, Tjaden, G, Oliveira, I, Ngai, N, Hsieh, M, y Coruzzi, G (1995) Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 887-898.

Lara, C, Romero, JM, y Guerrero, MG (1987) Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol* **169**: 4376-4378.

Lea, P, y Mifflin, B (1974) Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* **251**: 614-616.

Light, DR, Walsh, C, y Marletta, MA (1980) Analytical and preparative HPLC separation of flavins and falvin analog coenzymes. *Anal Biochem* **109**: 87-93.

Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, y Randall, RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

Luque, I, Flores, E, y Herrero, A (1993) Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant Mol Biol* **21**: 1201-1205.

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

- Luque, I, Herrero, A, Flores, E, y Madueño, F (1992) Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol Gen Genet* **232**: 7-11.
- Mandal, AK, y Ghosh, S (1993) Isolation of a glutamate synthase (GOGAT)-Negative pleiotropically N utilization-defective mutant of *Azospirillum brasilense*: cloning and partial characterization of GOGAT structural gene. *J Bacteriol* **175**: 8024-8029.
- Manodori, A, Cecchini, G, Schroder, I, Gunsalus, R, MT, W, y Johnson, M (1992) [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Escherichia coli* fumarate reductase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **31**: 2703-2712.
- Manzano, C, Candau, P, Gomez-Moreno, C, Relimpio, AM, y Losada, M (1976) Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*. *Mol Cell Biochem* **10**: 161-169.
- Manzano, C, Candau, P, y Guerrero, M (1978) Affinity chromatography of *Anacystis nidulans* ferredoxin-nitrate reductase and NADP<sup>+</sup> reductase on reduced ferredoxin-sepharose. *Anal Biochem* **90**: 408-412.
- Markwell, MA, Haas, SM, Bieber, LL, y Tolbert, NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**: 206-210.
- Marqués, S (1988) Estudios sobre la vía de Asimilación de amonio en cianobacterias. Glutamato sintetasa de *Synechococcus* 6301. Tesis, Universidad de Sevilla, España.
- Marqués, S, Florencio, F, y Candau, P (1992) Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur J Biochem* **206**: 69-77.
- Marqués, S, Florencio, FJ, y Candau, P (1989) Ammonia assimilating enzymes from cyanobacteria: *in situ* and *in vitro* assay using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **180**: 152-157.
- Márquez, A, F, G, y Vega, J (1984) Purification and characterization of the NADH-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci Lett* **34**: 305-314.
- Márquez, AJ (1985) Biosíntesis de glutamato en *Chlamydomonas reinhardtii*. Purificación y propiedades de las enzimas con actividad glutamato sintasa. Tesis Doctoral Universidad de Sevilla.
- Márquez, AJ, Ávila, C, Forde, BG, y Wallsgrave, RM (1988) Ferredoxin-glutamate synthase from barley leaves: a rapid purification and partial characterization. *Plant Physiol Biochem* **26**: 645-651.
- Márquez, AJ, Gotor, C, Romero, LC, Galván, F, y Vega, JM (1986) Ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Studies of the glutamate synthase activities. *Int J Biochem* **18**: 531-535.



Matín-Figueroa, E, Navarro, F, Candau, P, y Florencio, FJ (1995) Cloning of the *gltS* gene from *Anabaena* 7120 coding for the ferredoxin-dependent glutamate synthase. Third European Workshop on the molecular biology of cyanobacteria. Sevilla.

Matoh, T, Ida, S, y Takahashi, E (1980) Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L). *Plant Cell Physiol* 21: 1461-1474.

Matoh, T, Suzuki, F, y Ida, S (1979) Corn leaf glutamate synthase: purification and properties of the enzyme. *Plant Cell Physiol* 20: 1329-1340.

Matsuoka, K, y Kimura, K (1986) Glutamate synthase from *Bacillus subtilis* PCI 219. *J Biochem* 99: 1087.

Mattaj, IW, McPherson, MJ, y Wootton, JC (1982) Localisation of a strongly conserved section of coding sequence in glutamate dehydrogenase genes. *FEBS Lett* 147: 21-25.

McKinney, G (1941) Absorption of light by chlorophyll solution. *J Biol Chem* 140: 315-322.

Medina, M, Méndez, E, y Gómez-Moreno, C (1992) Lysine residues on ferredoxin-NADP<sup>+</sup> reductase from *Anabaena* sp. PCC 7120 involved in substrate binding. *FEBS Lett* 298: 25-28.

Meeks, JC, Wolk, CP, Lockau, W, Schilling, N, Shaffer, PW, y Chien, WS (1978) Pathways of assimilation of [<sup>13</sup>N]N<sub>2</sub> and <sup>13</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by cyanobacteria with and without heterocysts. *J Bacteriol* 134: 125-130.

Meeks, JC, Wolk, CP, Thomas, J, Lockau, W, Shaffer, PW, Austin, MA, Chien, WS, y Galonsky, A (1977) The pathways of assimilation of <sup>13</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J Biol Chem* 252: 7894-7900.

Mei, B, y Zalkin, H (1990) Amino-terminal deletions define a glutamine amide transfer domain in glutamine phosphoribosylpyrophosphate and other *purF*-type amidotransferases. *J Bacteriol* 172: 3512-3514.

Mei, B, y Zalkin, H (1989) A cysteine-histidine-aspartate catalytic triad is involved in glutamine amide transfer function in *purF*-type glutamine amidotransferases. *J Biol Chem* 264: 16613-16619.

Meissner, PS, Sisk, WP, y Berman, ML (1987) Bacteriophage 1 cloning system for the construction of directional cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 4171.

Mérida, A, Candau, P, y Florencio, FJ (1991a) Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium. *J Bacteriol* 173: 4095-4100.

Mérida, A, Candau, P, y Florencio, FJ (1991b) *In vitro* reactivation of *in vivo* ammonium-inactivated glutamine synthetase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 780-786.

- Mérida, A, Flores, E, y Florencio, F (1992) Regulation of *Anabaena* sp. strain 7120 glutamine synthetase activity in a *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 derivative strain bearing the *Anabaena glnA* gene and a mutated host *glnA* gene. *J Bacteriol* 174: 6550-6554.
- Mérida, A, Leurentop, L, Candau, P, y Florencio, FJ (1990) Purification and properties of glutamine synthetase from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain PCC 7601. *J Bacteriol* 172: 4732-4735.
- Miflin, B, y Lea, P (1980) Ammonia assimilation. En: BJ M (eds) *The Biochemistry of Plants*, 5, pp. 169-202, Academic Press, New York/London.
- Miller, R, y Stadtman, E (1972) Glutamate synthase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 247: 7407-7419.
- Mitsui, A, Kumazawa, S, Takahashi, A, Ikemoto, H, Cao, S, y Arai, T (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* 323: 720-722.
- Mohamed, A, y Jansson, C (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* 13: 693-700.
- Montesinos, ML, Herrero, A, y Flores, E (1995) Amino acid transport system required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *J Bacteriol* 177: 3150-3157.
- Morand, LZ, Holland, R, y Krogmann, DW (1994) En: Bryant A (eds) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp. 381-407, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Morden, CW, y Golden, SS (1991) Sequence analysis and phylogenetic reconstruction of the genes encoding the large and small subunits of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the chlorophyll *b*-containing prokaryote *Prochlorothrix hollandica*. *J Mol Evol* 32: 379-395.
- Muro-Pastor, MI, y Florencio, FJ (1992) Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* 203: 99-105.
- Muro-Pastor, MI, y Florencio, FJ (1994) NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: purification and characterization of the enzyme and cloning, sequencing, and disruption of the *icd* gene. *J Bacteriol* 176: 2718-2726.
- Muro-Pastor, MI, Reyes, JC, y Florencio, FJ (1996) The NADP<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J Bacteriol* 178:
- Nalbantoglu, B, Hirasawa, M, Moomaw, C, Nguyen, H, Knaff, D, y Allen, R (1994) Cloning and sequencing of the gene encoding spinach ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Biochim Biophys Acta* 1183: 557-561.

Needleman, SB, y Wunsch, CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* **48**: 443-453.

Ohmori, M, Ohmori, K, y Strotmann, H (1977) Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch Microbiol* **114**: 225-229.

Oliver, G, Gosset, G, Sanchez-Pescador, R, Lozoya, E, Ku, L, Flores, N, Becerril, B, Valle, F, y Bolivar, F (1987) Determination of the nucleotide sequence for the glutamate synthase structural genes of *Escherichia coli* K-12. *Gene* **60**: 1-11.

Omata, T, Andriesse, X, y Hirano, A (1993) Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Gen Genet* **236**: 193-202.

Pearce, J, Leach, CK, y Carr, NG (1969) The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol* **55**: 371-378.

Pearson, W, y Lipman, D (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2444-2448.

Peisach, J, Beinert, H, Emptage, MH, Mims, WB, Fee, JA, Orme-Johnson, WH, Rendina, AR, y Orme-Johnson, NR (1983) *J Biol Chem* **258**: 13014-13016.

Pelanda, R, Vanoni, M, Perego, M, Piubelli, L, Galizzi, A, Curti, B, y Zanetti, G (1993) Glutamate synthase genes of the diazotroph *Azospirillum brasilense*. *J Biol Chem* **268**: 3099-3106.

Penefsky, HS (1977) Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **252**: 2891-2899.

Pueyo, JJ, y Gómez-Moreno, C (1993) Interaction of flavodoxin with cyanobacterial thylakoids. *Photosynth Res* **38**: 35-59.

Pueyo, JJ, Sancho, J, Edmonson, DE, y Gómez -Moreno, C (1992) Complex formation between ferredoxin and ferredoxin:NADP<sup>+</sup> reductase from *Anabaena* PCC 7119: cross-linking studies. *Arch Biochem Biophys* **294**: 367-372.

Rai, AN, Rowell, P, y Stewar, WDP (1982) Glutamate synthase activity of heterocysts and vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* kÿtz. *J Gen Microbiol* **128**: 2203-2205.

Razquin, P, Schmitz, S, Fillat, MF, Peleato, ML, y B\_hme, H (1994) Transcriptional and translational analysis of ferredoxin and flavodoxin under iron and nitrogen stress in *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Bacteriol* **176**: 7409-7411.

Reith, M, y Munholland, J (1993) A high resolution gene map of the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea*. *Plant Cell* **5**: 465-475.

Reith, M, y Munholland, J (1995) Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* Chloroplast genome. *Plant Mol Biol Reporter* **13**: 333-335.

Rendina, AR, y Orme-Johnson, WH (1978) Glutamate synthase: on the kinetic mechanism of the enzyme from *E. coli* W. *Biochemistry* **17**: 5388.

Reyes, JC (1994) La glutamina sintetasa de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803: regulación de la expresión de los genes *glnA* y *glnN*. Tesis doctoral. Univ Sevilla.

Reyes, JC, Crespo, JL, García-Domínguez, M, y Florencio, FJ (1995) Electron transport control glutamine synthetase activity in the facultative heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **109**: 899-905.

Reyes, JC, y Florencio, F (1994) A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Bacteriol* **176**: 1260-1267.

Reyes, JC, y Florencio, FJ (1995) Electron transport controls transcription of the glutamine synthetase gene (*glnA*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **27**: 789-799.

Reyes, JC, y Florencio, FJ (1995) A novel mechanism of glutamine synthetase inactivation by ammonium in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Involvement of an inactivating protein. *Febs Lett* **367**: 45-48.

Rippka, R, Deruelles, J, Waterbury, J, Hedman, M, y Stainer, R (1979) Generics assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**: 1-61.

Rodríguez, R, Lara, C, y Guerrero, MG (1992) Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Kinetic and energetic aspects. *Biochem J* **282**: 639-643.

Romero, JM, Coronil, T, Lara, C, y Guerrero, MG (1987) Modulation of nitrate uptake in *Anacystis nidulans* by the balance between ammonium assimilation and CO<sub>2</sub> fixation. *Arch Biochem Biophys* **256**: 578-584.

Romero, JM, Flores, E, y Guerrero, MG (1985) Inhibition of nitrate utilization by amino acids in intact *Anacystis nidulans* cells. *Arch Microbiol* **142**: 1-5.

Romero, LC, Gotor, C, Márquez, AJ, Forde, BJ, y Vega, JM (1988) Antigenic similarities between ferredoxin-dependent nitrite reductase and glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **957**: 152-157.

Rothery, R, y Weiner, JH (1991) Alteration of the iron-sulfur cluster composition of *Escherichia coli* dimethyl sulfoxide reductase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **30**: 8296-8305.

Rubio, LM; Herrero, A y Flores, E (1996) A cyanobacterial *narB* gene encodes a ferredoxin-dependent nitrate reductase. *Plant Mol Biol* **30**: 845-850.

Sakakibara, H, Watanabe, M, Hase, T, y Sugiyama, T (1991) Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. *J Biol Chem* **266**: 2028-2035.

Sambrook, J, Fritsch, E, y T, M (1989) Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, New York .

Sanger, F, Nicklen, S, y Coulson, A (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467.

Scrutton, NS, Berry, A, y Perham, RN (1990) Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. Nature 343: 38-43.

Schmitz, S, y Böhme, H (1995) Amino acid residues involved in functional interaction of vegetative cell ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 with ferredoxin:NADP reductase, nitrite reductase and nitrate reductase. Biochim Biophys Acta 1231: 335-341.

Schmitz, S, Navarro, F, Kutzki, C, Florencio, FJ, y Böhme. Glutamate 94 of [2Fe-2S]-ferredoxins is important for efficient electron transfer to ferredoxin-glutamate synthase (GltS) from *Synechocystis* sp. PCC 6803. (enviado a Biochem Biophys Acta).

Shapiro, BM, y Stadtman, ER (1970) Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). Methods Enzymol 17: 910-922.

Sherman, L, Bricker, T, Guikema, J, y Pakrasi, H (1987) The protein composition of the photosynthetic complexes from the cyanobacterial thylakoid membrane. En: Fay P, y Baalen CV (eds) The cyanobacteria, pp. 1-33, Elsevier, Amsterdam.

Smillie, RM, y Entsch, B (1971) Phytoflavin. Methods Enzymol 23a: 504-514.

Somerville, CW, y Ogren, WL (1980) Inhibition of photosynthesis in Arabidopsis mutants lacking leaf glutamate synthase activity. Nature 286: 257-259.

Stanier, RY, y Cohen-Bazire, G (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. Ann Rev Microbiol 31: 225-274.

Storey, R, y Reporter, M (1978) Amino acid metabolism in developing soybean (*Glycine max*): glutamate synthase in the cotyledons. Can J Bot 56: 1349-1356.

Suzuki, A, Burkhart, W, y Rothstein, S (1996) Nitrogen effects on the induction of ferredoxin-dependent glutamate synthase and its mRNA in maize leaves under the light. Plant Sci 114: 83-91.

Suzuki, A, y Gadal, P (1982) Glutamate synthase from rice leaves. Plant Physiol 69: 848-852.

Suzuki, A, y Gadal, P (1984) Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and other organisms. Physiol Veg 22: 471-486.

Suzuki, A, Oaks, A, Jacquot, J, Vidal, J, y Gadal, P (1984) An electron transport system in maize roots for reactions of glutamate synthase and nitrite reductase. Physiological and immunological properties of the electron carrier and pyridine nucleotide reductase. Plant Physiol 78: 374-378.

- Suzuki, I, Horie, N, Sugiyama, T, y Omata, T (1995) Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation. *J Bacteriology* **177**: 290-296.
- Suzuki, I, Sugiyama, T, y Omata, T (1993) Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reductase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol* **34**: 1311-1320.
- Trotta, PP, Platzer, KEB, Haschemeyer, RH, y Meister, A (1974) Glutamine binding subunits of glutamate synthase and partial reactions catalyzed by this glutamine amidotransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 4607-4611.
- Turner, NE, Robinson, SJ, y Haselkorn, R (1983) Different promoters for the *Anabena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. *Nature* **306**: 337-342.
- Valentin, K, Kostzewa, M, y Zetsche, K (1993) Glutamate synthase is plastid-encoded in a red alga: implications for the evolution of glutamate synthases. *Plant Mol Biol* **23**: 77-85.
- Vanoni, M, Curti, B, y Zanetti, G (1991) Glutamate synthase. En: Muller F (eds) *Chemistry and Biochemistry of Flavoproteins*, vol III, pp. 309-317, Walter De Gruiter, Berlin.
- Vanoni, MA, Accornero, P, Carrera, G, y Curti, B (1994) The pH-dependent behavior of catalytic activities of *Azospirillum brasilense* glutamate synthase and iodoacetamide modification of the enzyme provide evidence for a catalytic Cys-His ion pair. *Arch Biochem Biophys* **309**: 222-230.
- Vanoni, MA, Edmonson, DE, Zanetti, G, y Curti, B (1992) Characterization of the flavins and the iron-sulfur centers of glutamate synthase from *Azospirillum brasilense* by absorption, circular dichroism, and electron paramagnetic resonance spectroscopies. *Biochemistry* **31**: 4613-4623.
- Vanoni, MA, Verzotti, E, Zanetti, G, y Curti, B (1996) Properties of the recombinant b subunit of glutamate synthase. *Eur J Biochem* **236**: 937-946.
- Vega-Palas, MA, Flores, E, y Herrero, A (1992) NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belong to the Crp family of bacterial regulators. *Mol Microbiol* **6**: 1853-1859.
- Vega-Palas, MA, Madueño, F, Herrero, A, y Flores, E (1990) Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **172**: 643-647.
- Vidal, J, Godbillon, G, y Gadal, P (1980) Recovery of active, highly purified phosphoenolpyruvate carboxylase from specific immunoadsorbent column. *FEBS Lett* **118**: 31-34.

Vigara, F (1995) Propiedades físico-químicas e inmunológicas de la ferredoxina-glutamato sintasa y nitrito reductasa del alga eucariótica *Monoraphidium braunii*. Tesis doctoral. Univ Sevilla.

Vioque, A (1992) Analysis of the gene encoding the RNA subunit of the ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res* 20: 6331-6337.

Wallsgrave, RM, Lea, PJ, y Miflin, BJ (1982) The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* 154: 473-476.

Weathers, PJ, y Allen, MM (1978) Variations in short term products of inorganic carbon fixation in exponential and stationary phase cultures of *Aphanocapsa* 6308. *Arch Microbiol* 116: 231-234.

Wei, TF, Ramasubramanian, TS, Pu, F, y Golden, JW (1993) *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 *bifA* gene encoding a sequence-specific DNA-binding protein cloned by in vivo transcriptional interference selection. *J Bacteriol* 175: 4025-4035.

Wierenga, R, De Maeyer, M, y Hol, W (1985) Interaction of pyrophosphate moieties with  $\alpha$ -helices in dinucleotide binding protein. *Biochemistry* 24: 1346-1357.

Woese, CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-171.

Wolfe, GR, Cunningham, FX, Durnford, D, Green, BR, y Gantt, E (1994) Evidence for a common origin of chloroplast with light-harvesting complex of different pigmentation. *Nature* 367: 566-568.

Wolk, CP (1982) Heterocysts. En: Carr NG, y Whitton BA (eds) *The biology of cyanobacteria*, pp. 359-386, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Zehnacker, C, Becker, T, Suzuki, A, Carrayol, E, Caboche, M, y Hirel, B (1992) Purification and properties of tobacco ferredoxin-dependent glutamate synthase, and isolation of corresponding cDNA clones. Light-inducibility and organ-specificity of gene transcription. *Planta* 187: 266-274.

Francisco N. Navarro Gómez  
Estado de los elementos sintomas de la cianobacteria  
Synechocystis sp. PCC 6803

APTO CON LAUDO POR

UNANIMIDAD

23

Septiembre

96

Hurtado

[Signature]

[Signature]

[Signature]

A. Vique

[Signature]



500698128

FBI ETD / 350

698/28