

TD  
593

TD  
593

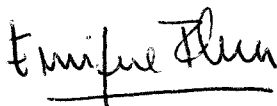
**NucA, UNA NUCLEASA DE BAJA ESPECIFICIDAD DE  
SUSTRATO DE LAS CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS  
FORMADORAS DE HETEROCISTOS**

Trabajo presentado para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas por la Licenciada  
**Alicia María Muro Pastor**



Sevilla, Septiembre de 1992

Director:



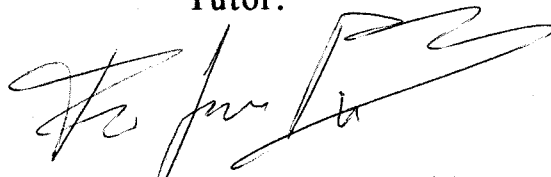
Dr. Enrique Flores García  
Investigador Científico  
del C.S.I.C.

Director:



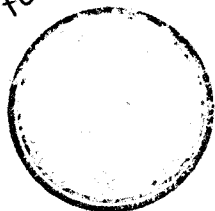
Dra. Antonia Herrero Moreno  
Colaborador Científico  
del C.S.I.C.

Tutor:



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

R. 11701



150 218  
Alena de la Torre

**A todos los que, de una u otra forma, me han ayudado a llevar a cabo este trabajo, muy especialmente a mamá, a Maribel y a Quique.**

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla y ha sido financiado mediante ayudas a la investigación concedidas por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y la Junta de Andalucía y mediante una beca del Plan de Formación de Profesorado y Personal Investigador (MEC).

A los Dres. Enrique Flores y Antonia Herrero, Directores de esta Tesis, les agradezco muy profundamente su gran dedicación e interés en el desarrollo del trabajo, así como su valiosa contribución a mi formación científica. Su amistad y apoyo han sido fundamentales en algunos periodos de especial dificultad, tanto personal como científica.

A Paco Madueño, Pepe Nieto, Ignacio Luque, Bélen Floriano y Angel Mérida, excelentes compañeros de trabajo, les agradezco el haberme iniciado en el uso de diversas técnicas y la amistad que me han dispensado. Quiero también recordar aquí a Rocio Rodriguez y José Carlos Reyes. A todos ellos, así como al resto de las "Montses y Jordis" del Instituto les agradezco el haberme rodeado de un ambiente de trabajo grato.

Al resto de los miembros del Departamento y al Director del mismo, el Prof. Miguel García Guerrero, les agradezco también su ayuda y el amable trato que me han dispensado.

Al Prof. C. Peter Wolk le agradezco el haberme acogido durante una estancia corta en su grupo de investigación del Plant Research Laboratory (Michigan State University), así como su valiosa aportación de ideas. A Todd Black, Yuping Cai, Elaine Oren, Kelly Owens, Jean-Michel Panoff y, sobre todo, Jeff Elhai, les agradezco su amable acogida y su ayuda incondicional. A Yuping y a Jeff les agradezco también que me permitieran usar plásmidos no publicados.

Por último a mi familia y, muy especialmente, a mi madre quiero agradecerle que no escatimara esfuerzos para permitirme llevar a cabo mis estudios en Ciencias. A Lourdes Garnica le agradezco igualmente el apoyo recibido en este sentido.





2.3.2. Ensayos de inhibición de la actividad desoxirribonucleasa de la proteína NucA.....	29
2.4. METODOS GENETICOS Y DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	30
2.4.1. Plásmidos, fagos y genoteca utilizados.....	30
2.4.2. Transferencia de ADN a <i>E. coli</i> mediante transformación.....	32
2.4.3. Transferencia de ADN a cianobacterias: conjugación entre <i>E. coli</i> y <i>Anabaena</i> .....	33
2.4.4. Aislamiento y análisis de ADN.....	33
2.4.4.1. Aislamiento de ADN total de cianobacterias.....	33
2.4.4.2. Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	34
2.4.4.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	35
2.4.4.4. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	35
2.4.4.5. Transferencia de ADN a filtros de nylon.....	36
2.4.4.6. Hibridación de ADN con sondas radioactivas.....	36
2.4.5. Manipulaciones enzimáticas del ADN.....	37
2.4.5.1. Restricción.....	37
2.4.5.2. Desfosforilación.....	38
2.4.5.3. Relleno de extremos cohesivos.....	38
2.4.5.4. Ligación.....	38
2.4.5.5. Marcaje radiactivo de sondas de ADN.....	39
2.4.6. Secuenciación de ADN.....	39
2.4.6.1. Obtención de deleciones seriadas.....	39
2.4.6.2. Aislamiento y desnaturalización de ADN.....	40
2.4.6.3. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea-poliacrilamida. Secado y autorradiografía de geles.....	42
2.4.7. Mutagénesis <i>in vivo</i> de fragmentos de ADN mediante el uso de un transposón defectivo.....	42
2.4.8. Obtención de mutantes <i>nucA</i> de <i>Anabaena</i> .....	44
2.5. METODOS ANALITICOS.....	45
2.5.1. Determinación de clorofila.....	45
2.5.2. Determinación de proteína.....	45
2.5.2.1. En células enteras.....	45
2.5.2.2. En muestras libres de células.....	46
2.5.3. Determinación de ADN.....	46
2.5.4. Determinaciones espectrofotométricas.....	46
2.5.5. Medidas de pH.....	47
2.5.6. Medidas de intensidades de iluminación.....	47

2.6. OTROS METODOS.....	47
2.6.1. Cromatofoco.....	47
2.6.2. Tratamiento informático de secuencias de ADN y proteínas.....	47
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
3.1. PRESENCIA DE UNA ACTIVIDAD NUCLEASA CORRESPONDIENTE A UN POLIPEPTIDO DE 29 kDa EN ALGUNAS CIANOBACTERIAS Y CARACTERIZACION DE LA MISMA EN <i>A. variabilis</i> ATCC 29413 Y <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	50
3.1.1. Presencia de una actividad nucleasa en sobrenadantes de cultivos de <i>A. variabilis</i> ATCC 29413-P9. Determinación del peso molecular de dicha nucleasa mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida.....	50
3.1.2. Presencia de una actividad nucleasa de 29 kDa en diversas estirpes de cianobacterias.....	54
3.1.3. Caracterización de la nucleasa de 29 kDa de <i>A. variabilis</i> ATCC 29413 y <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	55
3.1.3.1. Determinación del punto isoeléctrico.....	57
3.1.3.2. Sustratos susceptibles de degradación.....	57
3.1.3.3. Requerimiento por cationes divalentes.....	60
3.2. CLONACION Y MUTAGENESIS EN <i>E. coli</i> DEL GEN <i>nucA</i> , QUE CODIFICA PARA LA NUCLEASA DE 29 kDa DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	62
3.2.1. Clonación de una región de ADN conteniendo el gen <i>nucA</i> a partir de una genoteca de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	62
3.2.2. Subclonación del gen <i>nucA</i> a partir del cósmido 35G5.....	63
3.2.3. Localización del gen de la nucleasa de 29 kDa en la región de ADN clonada.....	69
3.2.3.1. Mutagénesis con un transposón defectivo.....	69
3.2.3.2. Subclonación.....	74
3.3. SECUENCIACION DE LA REGION DE ADN QUE CONTIENE EL GEN <i>nucA</i> . ANALISIS DE LAS PAUTAS DE LECTURA ABIERTA Y COMPARACION CON BANCOS DE DATOS.....	76
3.3.1. Obtención de los clones a secuenciar.....	76
3.3.1.1. Clonación de la región de ADN necesaria para la expresión de la nucleasa de 29 kDa en plásmidos de alto número de copias.....	76
3.3.1.2. Obtención de delecciones seriadas.....	80

3.3.2. Secuenciación. Búsqueda de zonas de lectura abierta y localización precisa de las mutaciones presentes en pRLA2.11 y pRLA3.15.....	82
3.3.3. Análisis de la proteína NucA. Comparación con bancos de datos.....	86
3.4. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA NucA EXPRESADA EN <i>E.coli</i> .....	91
3.4.1. Plásmidos utilizados en los estudios llevados a cabo con la proteína NucA expresada en <i>E. coli</i> .....	91
3.4.2. Caracterización de la actividad de la proteína NucA.....	93
3.4.3. Efecto de la proteína NucA sobre la transformación de <i>E. coli</i> con ADN plasmídico.....	95
3.5. GENERACION DE MUTANTES <i>nucA</i> DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	100
3.5.1. Generación de mutantes <i>nucA</i> .....	100
3.5.2. Estructura cromosómica de los mutantes <i>nucA</i> .....	103
3.5.3. Caracterización del mutante AMP2.....	105
3.6. PRUEBAS DE LA EXISTENCIA DE UN INHIBIDOR DE LA PROTEINA NucA. IDENTIFICACION DEL GEN <i>nuiA</i> .....	109
3.6.1. Presencia de un inhibidor de la proteína NucA en extractos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y otras cianobacterias filamentosas.....	109
3.6.1.1. Inhibición de la actividad nucleasa de la proteína NucA por extractos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y otras cianobacterias filamentosas.....	109
3.6.1.2. Caracterización de la inhibición ejercida por los extractos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 sobre la proteína NucA.....	112
3.6.2. Presencia de un inhibidor de la actividad de la proteína NucA en extractos de <i>E. coli</i> conteniendo plásmidos portadores de la región de ADN de <i>Anabaena</i> donde se localiza el gen <i>nucA</i> . Identificación de ORF-135 como el gen que codifica dicho inhibidor.....	119
3.6.2.1. Inhibición de la actividad de la proteína NucA por extractos de <i>E. coli</i> conteniendo los plásmidos pCSAM1, pCSAM12 o pCSAM20.....	119
3.6.2.2. Identificación de ORF-135 como el gen que codifica para un inhibidor de la proteína NucA.....	120
3.6.2.3. Análisis del gen <i>nuiA</i> (ORF-135).....	124

3.7. PRESENCIA DE SECUENCIAS HOMOLOGAS AL GEN <i>nucA</i> DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 EN EL GENOMIO DE DIVERSAS CIANOBACTERIAS. OBTENCION DE MUTANTES <i>nucA</i> DE <i>A. variabilis</i> ATCC 29413 .....	128
3.7.1. Secuencias homólogas al gen <i>nucA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 en diversas cianobacterias.....	128
3.7.2. Obtención de mutantes <i>nucA</i> de <i>A. variabilis</i> ATCC 29413.....	132
4. DISCUSION.....	137
5. CONCLUSIONES.....	148
6. REFERENCIAS.....	150

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A <sub>x</sub>	absorbancia (a una longitud de onda de x nm)
ADN	ácido desoxirribonucleico
Ap	ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
bisacrilamida	N, N',-bis-metilén-acrilamida
BSA	seroalbúmina bovina
cccDNA	ADN circular covalentemente cerrado
Ci	Curio
Cm	cloranfenicol
dATP	desoxiadenosín-5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidín-5'-trifosfato
DEAE	dietilaminoetil
DNasa	desoxirribonucleasa
dNTP	desoxinucleótido-5'-trifosfato
DIE	ditioeritritol
E	coeficiente de extinción
E	Einstein (mol de fotones)
EDTA	ácido etilén-diamino-tetraacético
etidio	3,8-diamino-6-etil-5-fenil fenantridio
g	aceleración de la gravedad
h	hora
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
k b	mil pares de bases de ADN bicatenario
Km	kanamicina
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
M	molar (mol/l)
min	minuto
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
Nm	neomicina (sulfato)
Nx	ácido nalidíxico
ORF	zona de lectura abierta
p b	par de bases
PCC	Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
p/v	relación peso/volumen

RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	duodecil sulfato sódico
Sm	estreptomicina
Sp	espectinomicina
Tc	tetraciclina
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametiletiléndiamina
Tricina	<i>N</i> -tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
U	unidad de actividad enzimática
UIEX	Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Texas
UV	luz ultravioleta
v/v	relación volumen/volumen

### Bases nitrogenadas

A	adenina
C	citosa
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

## **1. INTRODUCCION**

## 1.1. LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias constituyen un grupo de microorganismos procarióticos bien definido dentro de las eubacterias (Woese, 1987) que presentan la particularidad de llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis oxigénica (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Su aparato fotosintético es, en lo que concierne a su composición, estructura y función, muy similar al de los cloroplastos de las algas y plantas superiores, diferenciándose por tanto de los otros grupos de bacterias fotosintéticas (bacterias fotosintéticas verdes y rojas). Sin embargo, las cianobacterias presentan pigmentos antena especiales, denominados ficobiliproteínas (Glazer, 1984), que comparten con las algas rojas. La mayoría de las cianobacterias son fotoautótrofas estrictas, aunque hay algunas estirpes que, facultativamente, pueden crecer en condiciones heterotróficas a expensas de azúcares (Wolk, 1973). En suma, las cianobacterias son capaces de utilizar la energía de la luz y el poder reductor obtenido en la fotólisis del agua para crecer a expensas de compuestos inorgánicos oxidados como fuentes de carbono, nitrógeno y azufre.

Existen cianobacterias unicelulares y filamentosas. Las primeras crecen como células aisladas. Las cianobacterias filamentosas, por el contrario, crecen en forma de agrupaciones lineales de células o filamentos, también llamados tricomas, de mayor o menor longitud. En ambos grupos se encuentran cianobacterias capaces de fijar el nitrógeno molecular o dinitrógeno ( $N_2$ ). Dado que la enzima nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, para evitar la inactivación de la misma los procesos de fijación de dinitrógeno y fotosíntesis oxigénica no suelen llevarse a cabo simultáneamente en la misma célula. En algunas cianobacterias filamentosas la fijación de nitrógeno tiene lugar en células especializadas denominadas heterocistos (Haselkorn, 1978; Wolk, 1982), los cuales se diferencian a intervalos regulares a lo largo del filamento como respuesta a la deficiencia en nitrógeno. Por otra parte, en algunas otras cianobacterias filamentosas y en algunas estirpes unicelulares que son capaces de fijar dinitrógeno, se ha observado una separación temporal de los procesos de fijación de dinitrógeno y fotosíntesis oxigénica (Mitsui *et al.*, 1986; Stal y Krumbein, 1987).



Hay cianobacterias filamentosas que poseen también la capacidad de diferenciar estructuras de resistencia (akinetos) o de finalidad reproductiva (hormogonios) (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Finalmente, algunas estirpes son capaces de llevar a cabo lo que se denomina adaptación cromática, que consiste en una modificación de la composición de los pigmentos antena fotosintéticos según la longitud de onda de la luz incidente (Bogorad, 1975). Todas estas características únicas, junto a su importancia evolutiva como precursores de los cloroplastos de las algas y de las plantas superiores (Giovannoni *et al.*, 1988; Turner *et al.*, 1991), hacen que se considere a las cianobacterias organismos modelo para el estudio de fenómenos biológicos de gran interés.

Las cianobacterias se encuadran en cinco secciones, según la clasificación taxonómica actualmente más aceptada (Rippka *et al.*, 1979). Las secciones I y II incluyen cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión binaria o gemación (I) o por fisión múltiple (II). A la sección I pertenecen los dos géneros más estudiados, *Synechocystis* y *Synechococcus*. En las secciones III, IV y V se incluyen las cianobacterias filamentosas. La sección III comprende los géneros que no desarrollan heterocistos, como *Pseudoanabaena*, *Oscillatoria*, *Spirulina* o *Plectonema*. Las cianobacterias formadoras de heterocistos se incluyen en las secciones IV o V, según formen filamentos lineales o con ramificaciones verdaderas, respectivamente. Géneros representativos de la sección IV son *Anabaena*, *Nostoc* o *Calothrix*, y de la sección V *Fischerella*. Sólo la sección II, por un lado, y las secciones IV y V, conjuntamente, parecen ser grupos filogenéticamente coherentes (Giovannoni *et al.*, 1988).

## 1.2. MANIPULACION GENETICA DE LAS CIANOBACTERIAS

El desarrollo de la genética de las cianobacterias es relativamente reciente y por el momento la metodología de transferencia de ADN a estos organismos se encuentra relativamente limitada. Aunque son más de 300 las cianobacterias de las que se dispone en cultivo puro, hasta el momento se ha demostrado la transformación con ADN exógeno en menos de 10 estirpes, todas ellas unicelulares (Tandeau de Marsac y Houmard, 1987). La transformación con ADN plasmídico o cromosómico ha sido

ampliamente usada en el caso de las cianobacterias unicelulares más estudiadas, *Synechocystis* y *Synechococcus*, con las que se pueden realizar diversas técnicas genéticas. Dado que en este trabajo sólo se han manipulado genéticamente estirpes filamentosas, no entraremos en detalle respecto a la manipulación de estirpes unicelulares.

Exceptuando el caso de *Anabaena* sp. M-131, en la que se ha descrito transformación por electroporación (Thiel y Poo, 1989), la transferencia de ADN a estirpes filamentosas únicamente se ha demostrado mediante un sistema de conjugación interespecífica desde *E. coli* a la cianobacteria (Wolk *et al.*, 1984). Este procedimiento ha resultado ser operativo en diversas estirpes de los géneros *Anabaena* (Wolk *et al.*, 1984; Murry y Wolk, 1991), *Nostoc* (Flores y Wolk, 1985) y *Calothrix* (Cobley, 1985). La disponibilidad de este sistema de conjugación interespecífica ha permitido en los últimos años un gran avance en el estudio a nivel genético de la cianobacteria *Anabaena*, dado que ha posibilitado que se lleven a cabo procedimientos genéticos clásicos, como la clonación de genes mediante complementación de mutantes (Wolk *et al.*, 1988; Buikema y Haselkorn, 1991; Floriano *et al.*, 1992) o la generación de mutantes mediante recombinación homóloga con fragmentos de ADN previamente manipulados (Cai y Wolk, 1990; Maldener *et al.*, 1991). Recientemente se ha descrito también el uso de este sistema de conjugación para llevar a cabo la mutagénesis con transposones del cromosoma de la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. PCC 7120 (Borthakur y Haselkorn, 1989; Wolk *et al.*, 1991).

La transferencia de ADN entre las células de *E. coli* y las de la cianobacteria, ejemplificada aquí por *Anabaena*, se basa en la movilización por plásmidos conjugativos (RP1, RP4, etc.) de vectores portadores de un origen de transferencia. Estos vectores pueden ser "anfíbios", conteniendo orígenes de replicación para *E. coli* y *Anabaena* (este último procedente del plásmido pDU1, indígena de la estirpe *Nostoc* sp. PCC 7524) o "suicidas", conteniendo únicamente un origen de replicación para *E. coli*. La eficacia de la transferencia de ADN por conjugación a *Anabaena* se ha mejorado notablemente mediante la eliminación en los vectores de dianas para las endonucleasas de restricción *Ava*I o *Ava*II (Wolk *et al.*, 1984), presentes en numerosas estirpes de *Anabaena* (Duyvesteyn *et al.*, 1983), y mediante la propagación del plásmido a transferir en estirpes de *E. coli*

conteniendo genes de metilasas específicas de las dianas de estas enzimas (Elhai y Wolk, 1988b).

La generación de mutantes por sustitución génica mediada por recombinación homóloga es una técnica recientemente desarrollada en el caso de la cianobacteria filamentosa *Anabaena*. Este procedimiento consiste en la introducción en *Anabaena*, mediante conjugación, de un plásmido suicida conteniendo un gen de dicha estirpe interrumpido, por ejemplo, por un gen de resistencia a un antibiótico. El mantenimiento de dicho gen de resistencia dependerá de la integración del plásmido en el cromosoma de la cianobacteria mediante recombinación homóloga. El acontecimiento más frecuente de recombinación homóloga de plásmidos introducidos mediante conjugación en *Anabaena* es un solo entrecruzamiento (Wolk, 1991), que resulta en la integración del plásmido completo. Mediante un segundo entrecruzamiento puede tener lugar la sustitución del fragmento silvestre por el fragmento mutado introducido en la cianobacteria, portador del gen de resistencia. Este procedimiento requiere que el fragmento de ADN de *Anabaena* contenido en el plásmido suicida introducido sea lo suficientemente extenso como para que los acontecimientos de doble recombinación se produzcan con una frecuencia detectable. Recientemente, sin embargo, se ha descrito un sistema de selección de dobles entrecruzamientos que suprime la necesidad de extensas regiones de homología con el cromosoma de *Anabaena* en el plásmido utilizado, bastando con la presencia de 0,75 kb de ADN a cada lado de la mutación que se desee introducir. Este sistema de selección se basa en la letalidad condicional en *Anabaena* del gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, contenido en los vectores empleados como vehículos para introducir genes mutados (Cai y Wolk, 1990), que se describirá en detalle más adelante (ver apdos. 2.4.8 y 3.5).

La generación de mutantes en la cianobacteria filamentosa *Anabaena* se ve dificultada por el hecho de que, al contener varias copias del cromosoma por célula, se requieren largos periodos de segregación hasta obtener una célula en la que la totalidad de los cromosomas sean portadores de la mutación deseada. Por otro lado, el hecho de que se trate de una estirpe filamentosa hace que se requieran varias rondas de resiembra y fraccionamiento de los

filamentos hasta seleccionar aquellos en los que todas las células sean mutantes.

### 1.3. NUCLEASAS Y ENZIMAS RELACIONADAS

Las enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos nucleicos realizan funciones muy diversas. En líneas generales pueden incluirse en los siguientes grupos:

a) Enzimas implicadas en el mantenimiento del material genético celular (procesos de replicación del ADN, recombinación, reparación de daños, etc.) o en los procesos implicados en la expresión de información genética (ARN polimerasa).

b) Enzimas que cumplen funciones de protección frente a ADN exógeno, degradando aquellas moléculas de ADN que la célula no reconoce como propias. En este grupo se incluyen las endonucleasas de restricción y también algunas nucleasas no específicas para las que se ha descrito un papel de restricción (Aparicio *et al.*, 1988; de los Reyes-Gavilán *et al.*, 1988).

c) Enzimas implicadas en la transferencia o incorporación de material genético mediante conjugación, transformación, etc. En algunos de los procesos de transformación mejor estudiados, como el de la bacteria *Bacillus subtilis*, la entrada de ADN en la célula implica la degradación de una de las cadenas de la doble hélice mientras que la otra cadena se incorpora intacta en la célula.

d) Enzimas con un papel nutricional, para el crecimiento a expensas de ácidos nucleicos, la reutilización del material celular en periodos de senescencia, etc.

Existen enzimas cuya función no se incluye en ninguno de los grupos anteriores. Así, por ejemplo, las colicinas producidas por algunas estirpes de *E. coli* (proteínas que matan a estirpes de *E. coli* diferentes a la estirpe productora), y en concreto las colicinas E2 y E3, han resultado ser endonucleasas (Schaller y Nomura, 1976). Por otro lado, en los últimos años, el avance en las técnicas genéticas y bioquímicas está proporcionando pruebas de que algunas nucleasas están implicadas en procesos que hasta ahora no se habían asociado con las mismas; es el caso de una familia de RNasas implicadas en la autoincompatibilidad de las plantas con flores (McClure *et al.*, 1990). Finalmente, se ha definido un grupo de RNasas denominadas

RISBASES ("Ribonucleases with Special Biological Actions") (D'Alessio *et al.*, 1991) que incluye proteínas cuya actividad biológica no radica en la actividad catalítica de hidrólisis de ARN, que son también capaces de ejercer.

En todas las células estudiadas, tanto procariotas como eucariotas, así como en diversos tipos de virus, se han encontrado enzimas que hidrolizan los ácidos nucleicos. Estas enzimas se clasifican, en primera instancia, atendiendo a la naturaleza de los sustratos hidrolizados por las mismas (ver Linn, 1982). Se conocen enzimas que hidrolizan únicamente ácido desoxirribonucleico (DNasas), ácido ribonucleico (RNasas) o que hidrolizan ambos tipos de sustratos, denominándose entonces nucleasas no específicas de azúcar. El modo de acción de cada una de ellas puede ser muy variable y permite una clasificación más detallada de estas enzimas. Así, por ejemplo, existen endonucleasas (capaces de hidrolizar sustratos circulares), exonucleasas (que requieren un extremo libre para actuar), nucleasas específicas de ácidos nucleicos de cadena sencilla, etc. Asimismo, existen también diversos mecanismos de hidrólisis que originan fragmentos con grupos fosfato bien en los extremos 3' o en los 5'. Tanto las ribonucleasas como las desoxirribonucleasas presentan diversos grados de "preferencia" por una determinada secuencia de bases en el ácido nucleico. Mientras que las endonucleasas de restricción son muy específicas, ya que sus dianas son secuencias fijas de nucleótidos, otras nucleasas tienen un grado moderado de especificidad por secuencia, digiriendo más eficazmente, por ejemplo, en posiciones que contienen bases púricas o pirimidínicas, existiendo finalmente enzimas cuyo sitio de corte es totalmente inespecífico.

La multitud de enzimas con actividad nucleasa presentes en cualquier material biológico dificulta la asignación de la actividad observada a una determinada proteína. Para solventar esta dificultad pueden emplearse diversas estrategias, siendo la obtención de preparaciones altamente purificadas una de las más habituales. No obstante, y dadas las pequeñas cantidades que de cada una de las distintas enzimas pueden encontrarse por célula, se han utilizado en muchas ocasiones preparaciones parcialmente purificadas. Este hecho ha ocasionado un cierto grado de confusión en la nomenclatura de DNasas y RNasas en algunos organismos muy estudiados como *E. coli*

(Deutscher, 1985). Se ha desarrollado un tipo de ensayo que no siempre es factible, que permite identificar fielmente la actividad nucleasa correspondiente a una proteína determinada, que consiste en el ensayo de la actividad de las proteínas de una muestra después de su separación electroforética en presencia de SDS. Finalmente, el estudio de los productos de genes clonados, utilizando los controles adecuados, permite también una asignación fiable de actividades a una enzima.

Mientras que la presencia de DNasas y RNasas es estrictamente requerida para la realización de numerosas funciones celulares, sus actividades deben ser cuidadosamente reguladas para que no se produzcan daños irreparables en el material genético. Aunque en muchos casos la forma en que estas actividades son reguladas en la célula es desconocida, se conocen mecanismos responsables del control de algunas de ellas, como los que se resumen a continuación. (a) La compartimentalización es sin duda un aspecto de control importante, dado que las enzimas que se encuentran en el espacio periplásmico o en alguno de los compartimentos celulares no tienen acceso al ADN cromosómico. (b) El caso de la protección del ADN de una célula frente a las endonucleasas de restricción presentes en la misma es probablemente el mecanismo de control mejor estudiado. Este se basa en el establecimiento de un patrón de metilación del ADN presente en la célula (Yuan, 1981). Algunas endonucleasas de restricción cortan el ADN al no encontrar metiladas ciertas bases de su secuencia de reconocimiento, mientras que otros sistemas de restricción, por el contrario, digieren el ADN cuando encuentran ciertas bases metiladas.

La actividad de numerosas enzimas degradativas se regula por la presencia de inhibidores con diverso grado de especificidad. Algunos ejemplos se presentan a continuación. La DNasa y la RNasa pancreáticas de mamíferos, para las que existen proteínas inhibidoras en diversos tejidos (Moore, 1981; Blackburn y Moore, 1982). Las células de *Bacillus amyloliquefaciens* producen, además de una potente RNasa extracelular, un inhibidor intracelular específico de la misma (Hartley, 1988). Las colicinas E2 y E3, que son nucleasas, se sintetizan junto con proteínas denominadas de inmunidad, que impiden que las colicinas ejerzan efectos deletéreos sobre las células que las sintetizan (Schaller y Nomura, 1976; Mock *et al.*, 1984). Finalmente, los bacteriófagos Mu y lambda codifican proteínas que

inhiben algunas de las exonucleasas contenidas en las células de *E. coli* infectadas (Karu *et al.*, 1975; Akroyd *et al.*, 1986).

El hecho de que la actividad de las enzimas que interaccionan de algún modo con los ácidos nucleicos deba ser estrictamente controlada ha dificultado en muchos casos la clonación en *E. coli* de los genes que codifican dichas enzimas. La presencia de alguno de estos genes en plásmidos de alto número de copias es letal para las células de *E. coli*. Es el caso, por ejemplo, de los genes de la ADN polimerasa I de *E. coli* (*polA*; Murray y Kelley, 1979) o la DNasa I de *E. coli* (*dnaA*; Hansen y von Meyenburg, 1979). La clonación de este tipo de genes requiere el uso de fagos transductores o de plásmidos de muy bajo número de copias. En el caso del gen de la RNasa extracelular de *B. amyloliquefaciens*, éste únicamente se puede clonar en *E. coli* en presencia del gen que codifica el inhibidor específico de la misma ya mencionado (Hartley, 1988).

En las cianobacterias, el estudio de las enzimas que interaccionan con los ácidos nucleicos se ha centrado sobre todo en la ARN polimerasa dependiente de ADN, que se ha purificado de diversas estirpes, siendo la mejor caracterizada la de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Schneider *et al.*, 1987). Por otro lado, únicamente se ha descrito la purificación y caracterización de la ADN polimerasa de *Anacystis nidulans* (Lin *et al.*, 1990). Finalmente, se ha identificado también un gen, *xisA*, requerido para que se produzca la escisión de un fragmento de 11 kb del cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 durante el proceso de diferenciación de los heterocistos (Lammers *et al.*, 1986).

Por lo que se refiere a enzimas hidrolíticas, en las cianobacterias se conocen numerosas endonucleasas de restricción (Houmard y Tandeau de Marsac, 1988), algunas de las cuales exhiben especificidades no descritas para ninguna otra endonucleasa de restricción. En cuanto a nucleasas no específicas, se sabe que algunas cianobacterias filamentosas presentan elevada actividad DNasa cuando las células se incuban en presencia de ADN del fago lambda o se hacen crecer en medio conteniendo ADN acomplejado con verde de metilo (Wolk y Kraus, 1982). Entre estas cianobacterias filamentosas se encuentran *Anabaena variabilis* ATCC 29413 y *Anabaena* sp. PCC 7120, que son dos estirpes formadoras de heterocistos ampliamente estudiadas.

La obtención de estirpes carentes de algunas enzimas con actividad nucleasa ha facilitado la manipulación genética de diversos organismos. Así, por ejemplo, se sabe que la inactivación de los genes que codifican las nucleasas periplásmicas o extracelulares de bacterias como *E. coli* o *Vibrio cholerae* facilita la introducción de ADN mediante transformación en las mismas (Hanahan, 1983; Focareta y Manning, 1991). Por otro lado, se ha descrito que la presencia de nucleasas inespecíficas dificulta el aislamiento de ADN plasmídico en *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989), *Clostridium perfringens* (Blaschek y Klacik, 1984) y *Pseudomonas cepacia* (Williams *et al.*, 1980). Análogamente, la obtención de preparaciones de ADN cromosómico y ARN de buena calidad se ve facilitada por la ausencia de nucleasas inespecíficas.

En este trabajo se aborda la caracterización a nivel molecular de una actividad nucleasa inespecífica presente en las células y el medio extracelular de *Anabaena* sp. PCC 7120 y *A. variabilis* ATCC 29413, un aspecto previamente inexplorado de la biología de las cianobacterias. Se presenta la clonación del gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120, que codifica dicha nucleasa, y la generación, mediante sustitución génica, de estirpes mutantes en este gen derivadas de las estirpes PCC 7120 y ATCC 29413. Estos mutantes carentes de actividad nucleasa podrían representar el primer paso de un esfuerzo encaminado a obtener estirpes transformables de *Anabaena* y han de facilitar el estudio de otras enzimas con actividad nucleasa. Por otro lado, se ha identificado en extractos de *Anabaena* una proteína inhibidora de la actividad de la proteína NucA que podría ser responsable de la regulación *in vivo* de la actividad de dicha nucleasa. Se ha identificado también el gen que codifica dicha proteína inhibidora (*nuiA*) y se ha observado que tanto éste como el gen *nucA* se expresan en *E. coli*. El estudio de la interacción entre los productos de ambos genes permitirá conocer cómo se lleva a cabo en *Anabaena* la regulación de la proteína NucA.

Parte de los resultados descritos en este trabajo se encuentra en vías de publicación: A. M. Muro-Pastor, E. Flores, A. Herrero and C.P. Wolk (1992) Identification, genetic analysis, and characterization of a sugar-nonspecific nuclease from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* (en prensa).



## **2. MATERIALES Y METODOS**

## 2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 2.1.1. Cianobacterias

#### 2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas

En el presente trabajo se han utilizado principalmente dos cianobacterias del género *Anabaena*, perteneciente a la sección IV de la clasificación taxonómica de las cianobacterias propuesta por Rippka *et al.* (1979). El género *Anabaena* incluye cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos (células diferenciadas en las que se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico) que carecen de hormogonios (pequeños filamentos móviles). La primera de las estirpes empleadas fué *Anabaena* sp. PCC 7120, la cianobacteria filamentosa fijadora de dinitrógeno más utilizada en estudios a nivel genético, que admite la transferencia de ADN desde *E. coli* mediante conjugación (Wolk *et al.*, 1984). La otra estirpe es *Anabaena variabilis* ATCC 29413, una estirpe filogénicamente próxima a la anterior pero que, a diferencia de aquella, presenta la capacidad de crecer heterotróficamente en presencia de fructosa, permitiendo así el aislamiento y estudio de mutantes alterados en el metabolismo fotosintético. Se emplearon dos derivados de *Anabaena variabilis* ATCC 29413, la estirpe P9, que contiene únicamente el mayor (40 kb) de los dos plásmidos presentes en aquella (Herrero y Wolk, 1986), y la estirpe FD, que, cultivada a 40°C, presenta mejores frecuencias de infección por cianofagos que la estirpe original (Currier y Wolk, 1979) y permite, aunque con baja eficiencia, la transferencia de ADN mediante conjugación (Murry y Wolk, 1991; Maldener *et al.*, 1991). Finalmente, se emplearon también otras estirpes, tanto unicelulares como filamentosas, que se recogen en la tabla 1, en la que se indica también la sección taxonómica a la que pertenecen.

Todas las estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo se cultivaron fotoautotróficamente en condiciones axénicas.

#### 2.1.1.2. Cultivo de cianobacterias en medio líquido

Se empleó el medio denominado BG110, descrito por Rippka *et al.* (1979). Su composición era la siguiente: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2 mM; MgSO<sub>4</sub>,

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

Estirpe <sup>a</sup>	Sección taxonómica <sup>b</sup>
<b>A. Cianobacterias filamentosas<sup>c</sup></b>	
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413-P9 <sup>d</sup> (PCC 7937; UTEX 1444)	IV
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413-FD <sup>d</sup>	IV
<i>Anabaena</i> sp. PCC 6411 (ATCC 27898)	IV
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7118 (ATCC 27892)	IV
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7119 (ATCC 29151)	IV
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (ATCC 27893)	IV
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7601	
( <i>Fremyella diplosiphon</i> UTEX 481)	IV
<i>Nostoc ellipsosporum</i> B 1453-7 (Universidad de Göttingen)	IV
<i>Nostoc</i> sp. ATCC 43237	IV
<i>Nostoc</i> sp. PCC 6705 (ATCC 29131)	IV
<i>Nostoc</i> sp. PCC 6719 (ATCC 29105)	IV
<i>Nostoc</i> sp. PCC 6720 (ATCC 27895)	IV
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7107 (ATCC 29150)	IV
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7422 (ATCC 29132)	IV
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7413 (ATCC 29106)	IV
<i>Fischerella muscicola</i> UTEX 1829	V
<b>B. Cianobacterias unicelulares</b>	
<i>Gloeobacter</i> sp. PCC 7421 (ATCC 29082)	I
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7202 (ATCC 29140) <sup>e</sup>	I
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7425 (ATCC 29141) <sup>f</sup>	I
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 ( <i>Anacystis nidulans</i> R2) <sup>f</sup>	I
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6308 (ATCC 27150) <sup>g</sup>	I
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (ATCC 27184) <sup>h</sup>	I

<sup>a</sup>ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo (U.S.A.); PCC, Colección de Cultivos del Instituto Pasteur (Francia); UTEX, Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Texas (U.S.A.).

<sup>b</sup>Según Rippka *et al.*, 1979.

<sup>c</sup>Todas las cianobacterias filamentosas empleadas eran fijadoras de N<sub>2</sub> en aerobiosis, excepto *Anabaena* sp. PCC 7118 y *Calothrix* sp. PCC 7601.

<sup>d</sup>Estirpe derivada de *A. variabilis* ATCC 29413.

<sup>e</sup>Pertenece al grupo de *Synechococcus* cuyo ADN tiene un menor contenido en GC (39-43%).

<sup>f</sup>Pertenece al grupo de *Synechococcus* cuyo ADN tiene un contenido medio en GC (47-56%).

<sup>g</sup>Pertenece al grupo de *Synechocystis* cuyo ADN tiene menor contenido en GC (35-37%).

<sup>h</sup>Pertenece al grupo de *Synechocystis* cuyo ADN tiene mayor contenido en GC (42-43%).

0,3 mM; CaCl<sub>2</sub>, 0,24 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 mM; ácido cítrico, 28,5 μM; citrato férrico amónico (17% Fe), 6 mg/l; Na<sub>2</sub>-EDTA, 2,4 μM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 46 μM; MnCl<sub>2</sub>, 9,1 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 y CoCl<sub>2</sub>, 0,2 μM. La denominación BG11 hace referencia al medio BG110 suplementado con 1,5 g de NaNO<sub>3</sub> por litro (17,6 mM) (Rippka *et al.*, 1979). Opcionalmente, los medios BG110 y BG11 se suplementaban con NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, recibiendo entonces las denominaciones de BG110C y BG11C, respectivamente. El medio se preparaba concentrado 100 veces, conteniendo todos sus componentes excepto el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, el NaHCO<sub>3</sub> y el NaNO<sub>3</sub> que se añadían al medio inmediatamente antes de su esterilización en el autoclave.

El cultivo de células en medio líquido se llevaba a cabo en matraces erlenmeyers de 50 o 100 ml de capacidad conteniendo 25 o 50 ml de medio, respectivamente. Los cultivos se incubaban en una cámara termostatzada a 30°C, sometidos a agitación continua rotatoria a 95 rpm e iluminados superiormente con tubos fluorescentes que proporcionaban luz blanca con una intensidad de 25-30 μE/m<sup>2</sup>s. Para el cultivo de células de *A. variabilis* ATCC 29413-FD que se iban a someter posteriormente a conjugación con células de *E. coli*, los cultivos se incubaban en una cámara termostatzada a 40°C. Las células de esta estirpe cultivadas a 40°C presentan mejores frecuencias de infección por cianofagos (Currier y Wolk, 1979) y de conjugación (C.P.Wolk, comunicación personal). Alternativamente, el medio de cultivo se disponía en tubos o frascos de diverso tamaño (entre 40 ml y 10 l) que se cultivaban en la cámara termostatzada a 30°C y se iluminaban lateralmente con tubos fluorescentes. A través de los cultivos se burbujeaba aire estéril, garantizándose así una correcta agitación y aireación. La ausencia de bacterias contaminantes en los cultivos de cianobacterias se comprobaba mediante análisis microscópico y sembrando muestras en medio de cultivo rico (LB).

Para el cultivo de las estirpes mutantes AMP1-AMP14, el medio BG110 o BG11 (+/- NaHCO<sub>3</sub>) se suplementaba con 5 μg/ml de neomicina previamente filtrada a través de filtros Millex GS (Millipore, 0,22 μm de diámetro de poro) o Acrodisc (Gelman, 0,2 μm de diámetro de poro).

### 2.1.1.3. Cultivo de cianobacterias en medio sólido

Para el cultivo de las cianobacterias en medio sólido se empleaba el medio BG110 en el caso de estirpes filamentosas fijadoras de dinitrógeno y el medio BG11 en el caso de estirpes no fijadoras. El medio se solidificaba mediante la adición de Bacto-agar (Difco) al 1% (p/v) (Rippka *et al.*, 1979). El agar se esterilizaba en autoclave separadamente y se añadía al medio de cultivo inmediatamente antes de verterlo en cajas de Petri.

Para el cultivo de las estirpes mutantes AMP1-AMP14, el medio BG110 o BG11 (+/- HNaCO<sub>3</sub>) se suplementaba con 25-30 µg/ml de neomicina previamente filtrada. Para la selección de colonias resistentes a sacarosa (ver aptdo. 2.4.8), el medio se suplementaba con sacarosa al 5% (p/v) previamente filtrada. La adición de estos compuestos se llevaba a cabo antes de verter el medio en cajas de Petri.

### 2.1.1.4. Recogida de células

La recogida de células se llevaba a cabo mediante centrifugación en microcentrífuga Eppendorf o Sorvall (10.000 x g, 1-5 min), centrífuga de mesa Heraeus (2.500 x g, 5 min), o centrífuga Sorvall (8.000 x g, 5 min), según el volumen del cultivo. Para obtener sobrenadantes libres de células a partir de volúmenes superiores a 10 l, se empleó un sistema de centrifugación en flujo continuo (Szent-Gyorgyi-Blum, Sorvall) a 10.000 x g, seguido de filtración del sobrenadante a través de papel de filtro Albet.

### 2.1.1.5. Curvas de crecimiento

En los experimentos dirigidos a estimar la tasa de crecimiento de una determinada estirpe de cianobacteria, los cultivos se iniciaban a una densidad celular de 0,1 µg de clorofila/ml, y, a distintos tiempos de incubación en condiciones de cultivo, se tomaban muestras de la suspensión. La densidad celular se estimaba como concentración de proteína (ver aptdo. 2.5.2).

## 2.1.2. *Escherichia coli*

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

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y los genotipos correspondientes se recogen en la tabla 2.

**Tabla 2.** Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo

Estirpe	Resistencia a antibióticos	Características relevantes	Referencia
DH1	Nx	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
DH5 $\alpha$	Nx	Derivada de DH1 que presenta elevada frecuencia de transformación	Hanahan, 1983
HB101	Sm	<i>supE44 hsdS20 (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer y Roulland- Dussoix, 1969

### 2.1.2.2. Cultivo de *E. coli*

Las células de *E. coli* se cultivaban rutinariamente en medio LB (Luria-Bertani), compuesto por: NaCl, 10 g/l; Bacto-triptona (Difco), 10 g/l y extracto de levadura (Difco), 5 g/l, en agua destilada (Miller, 1972), a 37°C con agitación rotatoria continua de 200 rpm, hasta saturación del cultivo (generalmente 15 horas). Cuando las células se cultivaban para el aislamiento de ADN plasmídico, el tiempo de incubación podía reducirse hasta 6-8 horas. Para el crecimiento en medio sólido se empleaba el medio LA (Luria-agar), que correspondía al medio LB suplementado con Bacto-agar al 1,5% (p/v), incubándose las cajas a 37°C durante una noche.

El cultivo de células para el aislamiento de ADN plasmídico destinado a secuenciación se realizó en medio SB, que contenía, por

100 ml, 1,2 g de Bacto-triptona, 2,4 g de extracto de levadura, 10 ml de tampón fosfato potásico 0,9 M (pH 7,3) (esterilizado en autoclave) y 0,4 ml de glicerol. Tanto el tampón fosfato como el glicerol se añadían al medio tras ser éste esterilizado en el autoclave.

El cultivo de células para la inducción de competencia (ver aptdo. 2.4.2) se llevaba a cabo en medio  $\Psi$ , compuesto por: Bacto-triptona, 20 g/l; extracto de levadura, 5 g/l;  $MgCl_2$ , 4 g/l y KCl, 0,75 g/l.

Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo pRLA2 o pRLA3 que se someterían posteriormente a mutagénesis con el transposón *minikan* mediante infección con el fago  $\lambda$ 1105 (ver aptdo. 2.4.7), se cultivaron en medio LB suplementado con maltosa al 2%.

Los antibióticos (Sigma), esterilizados por filtración, se añadían a los medios LB, LA o SB a las concentraciones finales siguientes: ampicilina (Ap), 50  $\mu$ g/ml; cloranfenicol (Cm), 25  $\mu$ g/ml; espectinomicina (Sp), 100  $\mu$ g/ml; estreptomycin (Sm), 25  $\mu$ g/ml; kanamicina (Km), 50  $\mu$ g/ml; y tetraciclina (Tc), 15  $\mu$ g/ml.

## 2.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD NUCLEASA

### 2.2.1. Obtención de los diversos tipos de muestras a ensayar

#### 2.2.1.1. Muestras procedentes de células de cianobacterias

Durante el curso de este trabajo se intentó hacer uso de diversos métodos para liberar nucleasa a partir de células intactas de *Anabaena*, dado que se había encontrado actividad en el medio de cultivo y al menos parte de la enzima podría encontrarse en el periplasma celular (ver aptdo. 3.1). No se ha descrito hasta el momento ningún procedimiento de choque osmótico aplicable a las células de *Anabaena*, por lo que se emplearon otros métodos de liberación de proteínas que habían sido ya aplicados a otras estirpes de cianobacterias. El primero de los métodos empleados fué el tratamiento de las células con la enzima mutanolisina (N-acetilmuramidasa de *Streptomyces globisporus*; Sigma) en presencia de altas concentraciones de manitol. Esta enzima degrada la pared celular de diversas bacterias gram-negativas y ha sido empleada con éxito en la obtención de protoplastos a partir de otra cianobacteria

filamentosa, *Anabaena cylindrica* (Yoshida y Toyama, 1987). El procedimiento descrito (Yoshida y Toyama, 1987) consiste en la incubación de las células, durante 2 horas a 35°C, en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 6,8) conteniendo manitol 0,5 M y mutanolisina. Sin embargo, la suspensión de las células de *A. variabilis* ATCC 29413-FD o *Anabaena* sp. PCC 7120 en el tampón con manitol, aún en ausencia de mutanolisina, permitía liberar actividad nucleasa de las células. Las preparaciones de nucleasa así obtenidas (en ausencia de mutanolisina) se denominan en lo sucesivo preparaciones de tipo I.

Otro método empleado fué el tratamiento de las células con Tris y EDTA en presencia de un agente osmótico (sacarosa). Este tratamiento permite liberar selectivamente proteínas localizadas en el espacio periplásmico de bacterias gram-negativas (Garrard, 1971) y ha sido usado para demostrar la localización periplásmica de una proteína de *A. variabilis* (Serrano *et al.*, 1990). El procedimiento descrito (Serrano *et al.*, 1990) consiste en la incubación de las células en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8) conteniendo NaCl 30 mM, EDTA 40 mM y sacarosa 0,75 M, durante 45 min. Este método, ensayado con células de *Anabaena* sp. PCC 7120, permitía obtener actividad nucleasa aún en ausencia de EDTA. Las preparaciones de nucleasa obtenidas mediante el tratamiento con Tris y EDTA se denominan en lo sucesivo preparaciones de tipo II.

No se insistió en la puesta a punto de los dos procedimientos que se acaban de describir, dado que la nucleasa parecía liberarse de forma independiente de los tratamientos mencionados. Además, la utilización de las muestras así obtenidas requeriría la diálisis previa del EDTA y de los agentes osmóticos empleados. Por lo tanto, la mayor parte de los experimentos realizados con enzima de *Anabaena* se llevaron a cabo con muestras procedentes de medio de cultivo.

Se obtuvieron preparaciones concentradas de enzima de *A. variabilis* ATCC 29413-P9 a partir de medio de cultivo libre de células, bien mediante liofilización (proceso que no alteraba la actividad) o mediante precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 85% de saturación. Ambos procedimientos resultaban laboriosos, dada la necesidad de procesar volúmenes considerables de medio de cultivo. Asimismo se intentó, sin éxito, la retención de la actividad presente en el medio de cultivo en diversas matrices de cromatografía de intercambio iónico, incluyendo fosfocelulosa [Whatman P11, equilibrada con tampón Tris-



HCl 10 mM (pH 8,5) o tampón histidina-NaOH 10 mM (pH 6)], DEAE-celulosa [Whatman DE-52, equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,5)], QAE-Sephadex [Pharmacia A-50, equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,5)] y CM-celulosa [Sigma, equilibrada con tampón fosfato sódico 15 mM (pH 6,5)]. Finalmente se obtuvo retención de la enzima presente en el medio de cultivo en una matriz de fenil-sefarosa. La unión de las proteínas a esta matriz se lleva a cabo en virtud de interacciones hidrofóbicas.

Se utilizó un lecho de fenil-sefarosa CL-4B (Sigma, preinchada, 40-190  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) formado a partir de unos 200 ml de la suspensión de matriz suministrada por el fabricante, posteriormente equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) (tampón A) suplementado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5 M y empaquetada en una columna de vidrio (3,8 x 20 cm) a un flujo de 140 ml/h. Treinta litros de medio de cultivo procedentes de cultivos en fase estacionaria se suplementaron con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hasta una concentración de 1,5 M y, tras ajustar el pH a 7,5 con Tris-base, se hicieron pasar a través de dicha columna, a un flujo de 140 ml/h y a 4°C. Las proteínas retenidas en la columna se eluyeron resuspendiendo la matriz en tampón A y separando posteriormente la matriz del tampón mediante decantación. Este proceso se repetía entre 5 y 10 veces, obteniéndose distintas preparaciones cuya actividad era determinada antes de ser mezcladas. El volumen total de la preparación final era de aproximadamente 1 l. En ocasiones, las proteínas retenidas por la matriz se eluían mediante la aplicación de un gradiente lineal de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (desde 1,5 a 0 M) en tampón A; las fracciones conteniendo mayor actividad nucleasa eluían a una concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 325-400 mM y se unificaban para su posterior concentración. La enzima presente en las preparaciones obtenidas tras retención en columnas de fenil-sefarosa se concentraba mediante precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 85% de saturación y se dializaba frente a tampón A utilizando membranas de diálisis Visking (límite de exclusión 8.000-15.000 Da). El volumen final de estas preparaciones concentradas era de aproximadamente 11 ml.

Las preparaciones concentradas y dializadas se cromatografiaban en un lecho de DEAE-celulosa (Whatman DE-52) (8 x 0,7 cm) formado a partir de unos 5 g (peso seco) de matriz equilibrada primero con tampón A 10x y después con tampón A 1x y

empaquetada en una columna Econo-column (BioRad) a un flujo de 25 ml/h. La muestra se aplicaba sobre el lecho a un flujo de 8,6 ml/h, tras lo cual la columna se lavaba con 25 ml de tampón A y las proteínas retenidas se eluían a continuación con un gradiente lineal de NaCl en tampón A (desde 0 hasta 0,5 M, 60 ml de volumen total) a un flujo de 11,6 ml/h, recogiendo fracciones de 0,97 ml. Las fracciones con mayor actividad nucleasa eluían a una concentración de NaCl de 50-150 mM. Todo el proceso se llevaba a cabo a 4°C. Las preparaciones concentradas y parcialmente purificadas se denominan en lo sucesivo preparaciones de tipo III.

En la tabla 3 se presenta un resumen de las distintas preparaciones conteniendo actividad nucleasa de *Anabaena* empleadas.

**Tabla 3.** Distintos tipos de preparaciones conteniendo actividad nucleasa de células de *Anabaena*.

Preparación	Descripción
Tipo I	Preparación obtenida tras incubación de las células en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 6,8) conteniendo manitol 0,5 M.
Tipo II	Preparación obtenida tras incubación de las células en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8) conteniendo NaCl 30 mM, EDTA 40 mM y sacarosa 0,75 M.
Tipo III	Preparaciones parcialmente purificadas tras cromatografía en fenil-sefaroza y DEAE-celulosa.

Todas las preparaciones descritas hasta ahora podían concentrarse mediante centrifugación a través de microconcentradores Centricon-10 (Amicon). Este procedimiento consistía en la centrifugación de la disolución acuosa que contenía

actividad nucleasa a través de membranas de ultrafiltración que sólo permiten el paso del agua y las moléculas cuyo peso sea inferior a 10.000, quedando concentradas las moléculas de mayor tamaño.

Ocasionalmente se emplearon muestras de nucleasa correspondientes a extractos libres de células de diversas estirpes de cianobacterias (incluyendo *Anabaena*). En este caso, las células procedentes de cultivos líquidos saturados (50 ml) o sólidos se resuspendían en 250  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo PMSF 1 mM, obteniéndose los extractos mediante trituración, tras congelación de la suspensión celular en aire líquido. Los restos celulares se eliminaban mediante centrifugación a 13.000 x g y 4°C durante 15 min.

#### 2.2.1.2. Muestras procedentes de células de *E. coli*

Las preparaciones de nucleasa procedentes de células de *E. coli* conteniendo el gen *nuca* (que codifica la nucleasa de *Anabaena*) clonado, correspondían al medio extracelular de cultivos en fase estacionaria concentrado mediante uno de los dos procedimientos que se indican a continuación. El sobrenadante de dichos cultivos podía concentrarse hasta 200 veces mediante precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 85% de saturación seguida de diálisis frente a tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Alternativamente, la nucleasa presente en el medio de cultivo se concentraba unas 3-4 veces mediante centrifugación a través de microconcentradores Centricon-10 (Amicon).

Ocasionalmente, para los ensayos en geles de SDS-poliacrilamida (ver aptdos. 3.2 y 3.4.1), se empleaban células enteras procedentes de cultivos en fase estacionaria de *E. coli* conteniendo diversos cósmidos o plásmidos.

### 2.2.2. Ensayos de actividad nucleasa

#### 2.2.2.1. Actividad desoxirribonucleasa

Para el ensayo de la actividad desoxirribonucleasa se emplearon diversos métodos que se describen a continuación. La elección del método utilizado dependía del tipo de muestras a ensayar (sobrenadantes de cultivos, extractos o células enteras) y de los requerimientos de cada experimento concreto.

2.2.2.1.1. *Ensayo de digestión de ADN del fago lambda o del plásmido pUC18 seguido de electroforesis en gel de agarosa.*

Las muestras a ensayar se incubaban en presencia de 0,5-1  $\mu\text{g}$  de ADN del fago lambda en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo  $\text{MgCl}_2$  10 mM y DTE 1 mM, a 37°C durante periodos de tiempo variables (según se indica en cada caso). En general se empleaba ADN del fago lambda no metilado (Pharmacia), aunque en ocasiones también se empleó ADN del fago lambda parcial (*dam*<sup>-</sup>, *dcm*<sup>+</sup>; New England Biolabs) o totalmente metilado (*dam*<sup>+</sup>, *dcm*<sup>+</sup>; Pharmacia). Tras la incubación a 37°C, las muestras se calentaban a 65°C durante 10 min y, tras suplementarlas con un tampón de carga (ver aptdo. 2.4.4.3), se sometían a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% conteniendo bromuro de etidio (ver aptdo. 2.4.4.3). La actividad desoxirribonucleasa total de la muestra ensayada se estimaba en función del tamaño de los fragmentos obtenidos a partir de las moléculas de ADN del fago lambda (de 48,5 kb), es decir, de la mayor o menor degradación sufrida por las mismas.

También se ensayó la actividad de la proteína NucA sobre ADN covalentemente cerrado del plásmido pUC18. Los ensayos se llevaban a cabo en forma análoga a la ya mencionada en el caso de ADN del fago lambda, pero se paraban mediante la adición de EDTA (pH 8) a una concentración final de 50 mM. Los productos de la reacción se sometían a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% carente de bromuro de etidio (ver aptdo. 2.4.4.3), dado que la presencia de bromuro de etidio en los geles de agarosa distorsiona la velocidad de migración de las diversas formas de un plásmido.

2.2.2.1.2. *Ensayo en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN*

Este tipo de ensayo permite visualizar independientemente la actividad de las diferentes nucleasas presentes en una preparación proteica. El ensayo utilizado se basaba en el descrito por Rosenthal y Lacks (1977) y consistía en la visualización de bandas de actividad nucleasa tras someter una muestra de proteínas a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida que contenía ADN embebido en la matriz.

Dado que la pureza de las sustancias químicas empleadas, y en concreto del SDS, es crítica para que este tipo de ensayo, que requiere la renaturalización de las proteínas, pueda realizarse (Lacks *et al.*, 1979), todos los reactivos empleados, excepto el Tris y la glicina (Sigma), eran de alta pureza, de las marcas BioRad (productos para electroforesis) o Merck ( $\beta$ -mercaptoetanol). El aparato de electroforesis empleado era de la marca BioRad (modelo Mini Protean II<sup>R</sup> Dual Slab Cell).

La electroforesis se llevaba a cabo en geles de SDS-poliacrilamida preparados esencialmente según procedimientos descritos (Schleif y Wensink, 1981), a los que se añadía, únicamente en el gel separador y antes de la polimerización de éste, ADN de timo de ternera (tipo IV, Sigma) o esperma de arenque (Boehringer) a una concentración de 20  $\mu$ g/ml. En algún experimento, según se indica, se incluyó en el gel, a la misma concentración, ADN covalentemente cerrado del plásmido pUC18 (purificado mediante centrifugación en gradiente de CsCl; ver aptdo. 2.4.4.2), ADN del fago lambda o ADN de timo de ternera desnaturalizado inmediatamente antes de añadirlo al gel mediante hervido a 100°C durante 10 min seguido de enfriamiento rápido a 0°C.

Los geles empleados contenían 14% de acrilamida (p/v) en el caso del gel separador (parte inferior) y 5% de acrilamida (p/v) en el caso del gel concentrador (parte superior). Para preparar el gel separador se mezclaban 4,66 ml de una disolución acuosa que contenía acrilamida al 30% (p/v) y bisacrilamida al 0,8% (p/v), 1 ml de tampón Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 3,9 ml de agua destilada, 200  $\mu$ l de una disolución conteniendo ADN de timo de ternera (1 mg/ml) y 100  $\mu$ l de SDS al 10% (p/v). La polimerización del gel se iniciaba añadiendo 5  $\mu$ l de TEMED y 100  $\mu$ l de persulfato amónico al 10% (p/v). Tras verter el gel separador entre las placas de electroforesis (separadas 0,75 mm), el menisco se cubría con 1-2 cm de agua destilada. Una vez polimerizado el gel, se retiraba el agua y se vertía el gel concentrador, que se preparaba en forma análoga al separador pero conteniendo acrilamida al 5%, no conteniendo ADN y preparado en un tampón de pH 6,8.

Las muestras a ensayar se suplementaban con 5  $\mu$ g/ml (concentración final) de BSA (Serva o Boehringer), previamente sometida a un tratamiento que destruía la posible actividad nucleasa

contaminante (ver más adelante). Después, las muestras se solubilizaban por incubación a 100°C durante 5 min tras añadirles 0,25 volúmenes de un tampón de carga que contenía, por cada 5 ml, 1,25 ml de tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), 2 ml de SDS al 10%, 1 ml de glicerol, 0,25 ml de una disolución al 0,05% (p/v) de azul de bromofenol y 0,5 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol. En aquellos casos en que se ensayaban células enteras, antes de someter a electroforesis las muestras tratadas con tampón de carga, éstas se centrifugaban a 13.000 x g durante 2 min para precipitar los restos celulares. Con objeto de determinar el peso molecular de las proteínas de interés, se incluían en los geles muestras conteniendo patrones de tamaño conocido (BioRad).

La electroforesis se desarrollaba en una cámara refrigerada a 4°C, aplicándose una diferencia de potencial constante de 200 voltios durante todo el proceso (unos 45 min). Como tampón de electrodo se empleaba Tris-glicina (3 g/l y 14,4 g/l respectivamente) (pH 8,3) conteniendo SDS al 0,1% (p/v).

Tras la electroforesis, los geles se lavaban en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo  $MgCl_2$  2 mM, a temperatura ambiente y con agitación suave durante 90 min, con cambios de tampón cada 30 min. Tras este periodo de lavado, los geles se incubaban en el mismo tampón a 37°C durante un tiempo variable para que se desarrollara la actividad nucleasa. Generalmente el tiempo de incubación era de 12-14 horas pero, si se trataba de muestras con elevada actividad, bastaban 2-3 horas.

En aquellos experimentos en que se deseaba ensayar la dependencia de cationes de la actividad nucleasa, el lavado de los geles se llevaba a cabo en presencia de EDTA 10 mM y la subsiguiente incubación a 37°C se realizaba en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo  $MgCl_2$  5 mM,  $MnCl_2$  5 mM,  $CoCl_2$  5 mM o  $CaCl_2$  5 mM en lugar de  $MgCl_2$  2 mM, o en tampón Tricina-NaOH 10 mM (pH 7,5) conteniendo  $ZnCl_2$  5 mM. Como controles, se utilizaban geles incubados en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) sin ninguna adición o con EDTA 10 mM.

Finalmente, las bandas correspondientes a proteínas con actividad nucleasa se visualizaban, tras sumergir los geles en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo 1  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio, mediante la iluminación de éstos con luz UV de 302 nm de longitud de

onda. Aquellas zonas del gel en las que el ADN había sido degradado aparecían como zonas no fluorescentes sobre un fondo fluorescente.

Los carriles del gel que contenían proteínas patrón se separaban del resto una vez concluida la electroforesis y se teñían con una disolución de azul de Coomassie al 0,25% en 10% (v/v) de ácido acético y 40% (v/v) de metanol en agua. Tras 15-20 minutos de tinción a temperatura ambiente, los fragmentos de gel se destañían en una disolución de ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 40% (v/v) en agua, tras lo cual las proteínas se visualizaban como bandas de color azul.

El ensayo empleado, que se acaba de describir, difería en algunos aspectos del descrito por Rosenthal y Lacks (1977). En primer lugar, y tras comprobar que no era necesario para el desarrollo de la actividad nucleasa, se omitió el EDTA tanto en los geles como en el tampón de electroforesis. Además, el gel concentrador no contenía ADN. Por último, se omitió la azida sódica en el tampón de incubación dado que los tiempos de incubación a 37°C se redujeron considerablemente con respecto a los empleados en los experimentos descritos por Rosenthal y Lacks (1977), que podían ser de hasta 64 horas y requerían la presencia de agentes que evitaran el crecimiento de microorganismos.

Durante la puesta a punto de este ensayo se comprobó que tanto la adición de BSA a las muestras como la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol en el tampón de carga eran estrictamente requeridas para obtener bandas de actividad nucleasa en los geles. Por otro lado, el hervido de las muestras no se requería, obteniéndose resultados similares en muestras hervidas y sin hervir.

Para obtener seroalbúmina bovina libre de actividad nucleasa, se disolvía ésta en Tris-base 0,1 M (sin ajustar el pH) a una concentración de 50 mg/ml. A continuación, se hervía a 100°C durante 30 min y, una vez fría, se le añadía HCl 2N hasta obtener un pH de aproximadamente 7,5. Una vez tratada, la preparación se mantenía a 4°C.

#### 2.2.2.1.3. *Ensayo in vivo en células de E. coli*

Para el ensayo *in vivo* de actividad DNasa en células de *E. coli* se emplearon dos procedimientos que hacían uso de sustratos compatibles con el crecimiento en medio sólido de dichas células.

En el primero de los procedimientos empleados, las células de *E. coli* se incubaban en cajas conteniendo un medio sólido (Difco) que contenía un indicador de actividad DNasa (ADN acomplejado con verde de metilo). Este ensayo se basa en el hecho de que el verde de metilo unido de forma estable a moléculas de ADN de elevado peso molecular presenta un color verde a pH 7,5. La degradación enzimática de las moléculas de ADN libera el verde de metilo que, al pH mencionado, carece de color. Tras un periodo de crecimiento de las células en dicho medio, la actividad nucleasa de las mismas se detectaba por la pérdida de color verde del medio de cultivo circundante (Lacks, 1970).

El segundo procedimiento empleado se desarrolló durante el transcurso de este trabajo y presenta una mayor sensibilidad en la detección de las células productoras de actividad nucleasa. En este ensayo, las células de *E. coli* se transferían con un palillo de dientes a cajas de medio LA (Luria-agar) diluído a la mitad con agua destilada para reducir la fuerza iónica del mismo. El medio contenía además  $MgCl_2$  10 mM y 100  $\mu g/ml$  de ADN de timo de ternera o esperma de arenque, añadidos después de la esterilización de los componentes del medio. Tras la incubación de las cajas a 37°C durante 8-12 horas, la actividad se revelaba en forma análoga a la empleada en los geles de SDS-poliacrilamida. Para ello, se vertían sobre la caja 10 ml de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo 1  $\mu g/ml$  de bromuro de etidio y, tras unos 5 min, se retiraba este tampón y se visualizaba la caja iluminando con luz UV de 302 nm de longitud de onda. Las colonias productoras de actividad nucleasa se detectaban por la presencia de un halo no fluorescente en torno a las mismas.

#### 2.2.2.2. Actividad ribonucleasa: Ensayo en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ARN

Los ensayos de actividad ribonucleasa en geles de SDS-poliacrilamida se realizaban igual que los ensayos de actividad DNasa descritos en el apartado 2.2.2.1.2 pero, en lugar de ADN, se añadían a los geles 65  $\mu g/ml$  de ARN ribosómico de *E. coli* (16S+23S, Boehringer) o de ARN del virus MS2 (Boehringer).



## 2.3. ENSAYOS DE INHIBICION DE ACTIVIDAD NUCLEASA POR EXTRACTOS DE CIANOBACTERIAS Y DE *E. coli*

### 2.3.1. Preparación de extractos

Los ensayos de inhibición de la actividad desoxirribonucleasa de la proteína NucA se llevaban a cabo con extractos de *E. coli* o de diversas cianobacterias. Las células de cianobacterias (procedentes de cultivo sólido o de 50 ml de cultivo líquido conteniendo 7-8  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml) y las de *E. coli* (procedentes de 25 ml de cultivo en medio LB en fase estacionaria) se procesaban de forma similar. Tras resuspender las células en 250-500  $\mu\text{l}$  de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo PMSF 1 mM, los extractos se obtenían mediante congelación en aire líquido seguida de trituración. Los extractos crudos así obtenidos se centrifugaban a 10.000 x g durante 15 min a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante obtenido se empleaba como extracto crudo libre de células.

### 2.3.2. Ensayos de inhibición de la actividad desoxirribonucleasa de la proteína NucA

En estos ensayos se empleaban preparaciones muy concentradas de proteína NucA, obtenidas a partir de cultivos de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadoras del plásmido pCSAM28, que contiene el gen *nuca* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Los sobrenadantes de dichos cultivos se concentraban por alguno de los procedimientos ya descritos (aptdo. 2.2.1.2).

La actividad inhibidora de los extractos de cianobacterias o de *E. coli* sobre la proteína NucA se ensayaba como se describe a continuación. Una cantidad de 0,5-1  $\mu\text{g}$  de ADN no metilado del fago lambda se incubaba, en presencia de proteína NucA y del extracto cuya actividad inhibidora deseaba ensayarse, en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo  $\text{MgCl}_2$  10 mM y DTE 1 mM, a 37°C, durante periodos de tiempo variables. En el caso de los extractos de *E. coli*, que contenían gran cantidad de ARN, los ensayos se llevaban a cabo en presencia de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de RNasa A de pancreas bovino. Todos los componentes del ensayo se depositaban como gotas en las paredes de un tubo de microcentrífuga y el ensayo se iniciaba con un pulso de

centrifugación que ponía en contacto simultáneamente a todos estos componentes. Una vez transcurrido el tiempo de ensayo y tras calentar las muestras a 65°C durante 10 min, los productos de la reacción se sometían a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% conteniendo bromuro de etidio. La inhibición de la actividad DNasa de la proteína NucA en un determinado ensayo se estimaba en función de la diferencia entre el tamaño de los fragmentos obtenidos en dicho ensayo y los obtenidos en un ensayo control que no contenía extracto o contenía un extracto no inhibidor.

## 2.4. METODOS GENETICOS Y DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 2.4.1. Plásmidos, fagos y genoteca utilizados

Los plásmidos utilizados (no construídos en este trabajo) se recogen en la tabla 4 junto con sus características más relevantes. Entre ellos, merecen especial mención los plásmidos pRL500 y pRL538 (Elhai y Wolk, 1988a y datos no publicados). Estos vectores de clonación permiten la selección positiva de moléculas recombinantes en virtud de un extenso palíndrome que abarca una región que se extiende a ambos lados de la zona de clonación, haciendo innecesaria la desfosforilación de estos vectores en los experimentos de clonación, dado que, tras la ligación, los plásmidos que conserven el palíndrome intacto (no interrumpido por un inserto) no son viables en *E. coli* DH5 $\alpha$  (Hagan y Warren, 1982). También se hizo un uso extensivo de la colección de "cassettes", conteniendo genes de resistencia a antibióticos flanqueados por varias dianas de endonucleasas de restricción, descrita por Elhai y Wolk (1988a).

La genoteca de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 que se empleó para clonar el gen *nucA* está construída en el vector cósmido pRL25C y establecida en *E. coli* DH1 conteniendo el plásmido auxiliar pDS4101 (Wolk *et al.*, 1988). Dicha genoteca consta de 1056 clones individualizados, cada uno de los cuales contiene alrededor de 40 kb de ADN de *Anabaena*.

Por último, se empleó el fago defectivo  $\lambda$ 1105 (Way *et al.*, 1984). Este fago, derivado del fago lambda, carece de funciones necesarias para su replicación en *E. coli* y es portador de un minitransposón

Tabla 4. Plásmidos utilizados (no construidos en este trabajo)

Plásmido	Resistencia a antibióticos	Características relevantes	Referencia
pACYC184	Cm Tc	Vector de clonación derivado de p15A.	Chang y Cohen, 1978
pBR322	Ap Tc	Vector de clonación derivado de ColE1.	Bolívar <i>et al.</i> , 1977
pDUCA7	Km	Vector cósmido replicativo en <i>E. coli</i> y <i>Anabaena</i> .	Buikema y Haselkorn, 1991
pIC20R	Ap	Plásmido derivado de pUC19 que contiene más sitios de clonación que éste.	Marsh <i>et al.</i> , 1984
pRL277	Sm Sp	Vector para la selección positiva de dobles recombinantes en <i>Anabaena</i> . Contiene el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .	Cai y Wolk, datos no publicados
pRL463	Ap Sm Sp	Contiene un fragmento que confiere resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina.	Elhai y Wolk, datos no publicados
pRL479	Ap Cm	Contiene el gen <i>cat</i> de pBR325.	Elhai y Wolk, datos no publicados
pRL500	Ap	Vector para la selección positiva de plásmidos recombinantes.	Elhai y Wolk, 1988a
pRL528	Cm	Derivado de ColK portador de <i>mob</i> y genes de metilasas de sitios <i>Ava</i> I y <i>Eco</i> 47 II (isoesquizómero de <i>Ava</i> II).	Elhai y Wolk, 1988b
pRL538	Ap	Vector para la selección positiva de plásmidos recombinantes.	Elhai y Wolk, datos no publicados
pRL591-W45	Km	Contiene un gen de metilasa de sitios <i>Eco</i> T22 I (isoesquizómero de <i>Ava</i> III).	Elhai y Wolk, datos no publicados
pUC18, pUC19	Ap	Vectores de clonación que presentan el sitio múltiple de clonación en disposición inversa.	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
RP4	Ap Km Tc	Plásmido conjugativo de amplio espectro capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1.	Datta <i>et al.</i> , 1971

defectivo (carente de transposasa) que confiere resistencia a kanamicina y que se emplea en la mutagénesis *in vivo* de moléculas de ADN (aptdo. 2.4.7).

#### 2.4.2. Transferencia de ADN a *E. coli* mediante transformación

La preparación de células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  o HB101 se llevaba a cabo mediante un procedimiento rápido basado en el descrito por Hanahan (1983). Esencialmente, las células de *E. coli* se cultivaban en 5 ml de medio  $\Psi$  (ver aptdo. 2.1.2.2) durante 3 horas (hasta  $A_{550}=0,37$ ) y con este cultivo se inoculaban 100 ml del mismo medio, incubándose a 37°C con agitación rotatoria hasta una  $A_{550}=0,48$ . Tras mantener el cultivo en hielo durante 10 min, las células se recogían mediante centrifugación a 750 x g y 4°C durante 5 min y se resuspendían en 30 ml de disolución TJNI fría. La disolución TJNI contenía RbCl, 100 mM; MnCl<sub>2</sub>, 50 mM; acetato potásico, 30 mM; CaCl<sub>2</sub>, 10 mM y glicerol al 15% (v/v), ajustándose su pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Las células se centrifugaban de nuevo de la misma forma y se resuspendían en 4 ml de disolución TJNIII fría. La disolución TJNIII contenía MOPS, 10 mM; RbCl 10 mM; CaCl<sub>2</sub>, 75 mM y glicerol al 15% (v/v) y su pH se ajustaba a 7,0 con NaOH. La suspensión de células se repartía en porciones alícuotas de 100  $\mu$ l que se conservaban a -80°C. Las disoluciones TJNI y TJNIII se esterilizaban mediante filtración a través de filtros Millex GS (Millipore, 0,22  $\mu$ m de diámetro de poro) o Acrodisc (Gelman, 0,2  $\mu$ m de diámetro de poro) y se guardaban a 4°C. Las frecuencias de transformación de las células competentes así preparadas estaban en torno a 10<sup>7</sup> transformantes/ $\mu$ g de ADN de pBR322.

Para transformar las células competentes, el ADN transformante (volumen máximo, 10  $\mu$ l) se añadía a una porción alícuota de células previamente descongeladas en hielo. Tras incubar la mezcla en hielo durante 15 min y, posteriormente, a 42°C durante 2 min, se le añadía 1 ml de medio LB y se incubaba a 37°C con agitación durante una hora. Tras esta incubación, las células se recogían mediante centrifugación y se sembraban en medio LA suplementado con los antibióticos adecuados.

### 2.4.3. Transferencia de ADN a cianobacterias: conjugación entre *E. coli* y *Anabaena*

La conjugación entre *E. coli* y *Anabaena* se llevaba a cabo mediante un método de transferencia derivado del diseñado por Wolk *et al.* (1984), cuyo protocolo detallado se recoge en Thiel y Wolk (1987) y Elhai y Wolk (1988b). En esencia, el procedimiento consistía en la movilización del plásmido a transferir mediante el concurso de un plásmido conjugativo de amplio espectro (RP4) y del plásmido auxiliar pRL528 (ver tabla 4), portador del gen *mob* y de funciones de metilación de los sitios de restricción de las enzimas *Ava* I y *Ava* II, las cuales se encuentran presentes en *Anabaena* sp. PCC 7120. En algunos casos se empleaba también un segundo plásmido metilador, pRL591-W45, portador de funciones de metilación de los sitios de restricción de la enzima *Ava* III, la cual parece encontrarse asimismo presente en *Anabaena* sp. PCC 7120 (ver aptdo. 2.4.8). Este procedimiento permite también la transferencia de ADN plasmídico a *A. variabilis* ATCC 29413 (estirpe FD), si bien en el caso de conjugación con esta estirpe el plásmido a transferir debe estar desprovisto de dianas para la enzima *Avr* II (ver aptdo. 3.7). Se utilizó en ambos casos la modalidad de conjugación tripartita, en la que participaban dos estirpes de *E. coli* (HB101 conteniendo el plásmido a transferir y el plásmido auxiliar metilador y HB101 conteniendo el plásmido conjugativo RP4) y la estirpe de *Anabaena* receptora.

### 2.4.4. Aislamiento y análisis de ADN

#### 2.4.4.1. Aislamiento de ADN total de cianobacterias

El aislamiento de ADN total de cianobacterias se llevaba a cabo mediante el procedimiento descrito por Cai y Wolk (1990), que implica la rotura de las células con perlas de vidrio. Esencialmente, se aislaba ADN a partir de las células procedentes de 50 ml de cultivo conteniendo 7-8  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml (o una cantidad equivalente obtenida de un cultivo en medio sólido), que se resuspendían en 400  $\mu\text{l}$  de tampón T0,1E (Tris, 10 mM; EDTA, 0,1 mM; pH 7,5). A la suspensión celular se le añadían entonces 150  $\mu\text{l}$  (volumen aproximado) de perlas de vidrio (212-300  $\mu\text{m}$  de diámetro; Sigma) y

450 µl de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v). La mezcla se sometía entonces a agitación vigorosa (1 min) seguida de incubación en hielo (1 min) (4-6 veces). Tras estos ciclos, las células se centrifugaban a 15.000 x g y 4°C durante 15 min, retirándose el sobrenadante claro, que contenía el ADN, el cual se sometía entonces a 1-2 extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) seguidas de 2 extracciones con cloroformo y precipitación mediante adición de 2,5 volúmenes de etanol absoluto en presencia de acetato sódico a una concentración final de 0,3 M (pH 5,2).

Antes de ser utilizadas, las perlas de vidrio se sometían a un tratamiento de lavado con ácido nítrico durante una noche seguido de numerosos lavados con agua destilada. Tras ello, las perlas se esterilizaban en autoclave y se secaban.

#### 2.4.4.2. Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala se llevaban a cabo minipreparaciones siguiendo dos métodos alternativos: un método de lisis alcalina y un método de lisis por hervido. El primero de los métodos, originalmente descrito por Birnboim y Doly (1979), consiste en la lisis de las células en presencia de SDS y NaOH, seguida de la eliminación del ADN cromosómico y las proteínas mediante precipitación con acetato potásico y centrifugación. Este procedimiento se llevaba a cabo según se describe en Maniatis *et al.* (1982), seguido, opcionalmente, de extracciones con fenol:cloroformo (1:1, v/v) y cloroformo. El otro método de lisis rápida, originalmente descrito por Holmes y Quigley (1981) consiste en la lisis de las células mediante hervido en presencia de Tritón X-100, y también se realizaba según Maniatis *et al.* (1982).

El aislamiento de ADN plasmídico para experimentos de secuenciación se llevaba a cabo utilizando, según las recomendaciones del fabricante, un kit suministrado por Pharmacia ("Miniprep kit plus").

Para el aislamiento de ADN superenrollado a gran escala se empleaba el procedimiento de lisis alcalina seguido de centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (Maniatis *et al.*, 1982).

Finalmente, para la obtención de ADN superenrollado para someterlo a digestión con exonucleasa III de *E. coli* se empleaba el

procedimiento de lisis alcalina seguido de tratamiento con RNasa A y precipitación con polietilenglicol (Ausubel *et al.*, 1989).

#### 2.4.4.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se llevaba a cabo según Maniatis *et al.* (1982), utilizando geles preparados en tampón TBE (Tris-base, 89 mM; ácido bórico, 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8) que contenían diferentes concentraciones de agarosa (0,6%-1,3%) según el intervalo de resolución de fragmentos de ADN requerido. Previamente a la gelificación de la agarosa se añadía bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml. Las muestras se suplementaban con 0,25 volúmenes de un tampón compuesto por azul de bromofenol al 0,25% (p/v), xilén-cianol al 0,25% (p/v) y glicerol al 30% (v/v) (Maniatis *et al.*, 1982), y la electroforesis se llevaba a cabo en aparatos horizontales marca Pharmacia modelo GNA-100 a 70-100 V durante 60-90 min (minigeles), o modelo GNA-200 a 25-40 V durante 14-16 horas (maxigeles). Tras la electroforesis, los geles se sometían a iluminación con luz UV de 302 nm de longitud de onda, utilizando un transiluminador LKB modelo 2011 Macro Vue, y se fotografiaban con un equipo Polaroid modelo MP-4.

En electroforesis en las que se deseaba visualizar distintas formas de un plásmido (circular covalentemente cerrada, circular abierta, etc.) no se añadía bromuro de etidio al gel sino que éste se teñía, después de llevarse a cabo la electroforesis, sumergiendo el gel en una disolución conteniendo 1 µg/ml de bromuro de etidio.

Para determinar el tamaño de los fragmentos que se sometían a electroforesis se incluían en las mismas una serie de fragmentos de tamaño conocido, generalmente ADN del fago lambda digerido con las enzimas *Hind* III o *Cla* I.

#### 2.4.4.4. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa

La extracción de fragmentos de ADN a partir de porciones de geles de agarosa se llevaba a cabo mediante un procedimiento que se basa en la unión de las moléculas de ADN a una matriz de silicato en presencia de una alta concentración de NaI. Para ello se empleaban los productos suministrados bajo la denominación GeneClean™ (BIO 101 Inc., USA), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ocasionalmente, se empleó otro procedimiento basado en la unión de las moléculas de ADN a papel de DEAE-celulosa (NA45, Schleicher and Schuell), según se describe en Sambrook *et al.* (1989).

#### 2.4.4.5. Transferencia de ADN a filtros de nylon

Tras someter el ADN a electroforesis en gel de agarosa al 0,6%, los fragmentos se transferían a filtros de nylon (Zeta-Probe, Bio-Rad, o Hybond-N+, Amersham) como se describe en Ausubel *et al.* (1989). Tras un tratamiento con HCl 0,2 N durante 30 min, el gel se lavaba varias veces con agua destilada y la transferencia se llevaba a cabo por capilaridad con una disolución de NaOH 0,4 M durante 16-24 horas. Tras la transferencia, los filtros se lavaban brevemente con tampón SSC 2x (el tampón SSC 1x contiene NaCl 0,15 M y citrato trisódico 15 mM; pH 7) y se guardaban húmedos a 4°C (filtros Hybond-N+) o se secaban al aire y se guardaban a temperatura ambiente (filtros Zeta-Probe).

#### 2.4.4.6. Hibridación de ADN con sondas radioactivas

La hibridación del ADN fijado a un filtro de nylon con sondas radioactivas se llevaba a cabo según Ausubel *et al.* (1989), utilizando como disolución de hibridación una mezcla compuesta por: tampón fosfato potásico 25 mM (pH 7), SSC 5x, disolución de Denhardt 5x (la disolución de Denhardt 1x contiene, por litro, 0,2 g de ficol tipo 400, 0,2 g de polivinilpirrolidona y 0,2 g de seroalbúmina bovina), ADN de espermatozoos de arenque, 50 µg/ml, y SDS al 1% (p/v). La prehibridación se llevaba a cabo durante 4-5 horas y la hibridación (tras añadir a la disolución la sonda de ADN radiactivo), en las mismas condiciones durante 16 horas. La temperatura de prehibridación e hibridación era de 55°C o 65°C según el grado de homología entre los ADNs a hibridar y se indicará en cada caso. El filtro se lavaba a continuación con agitación moderada a temperatura ambiente con las siguientes disoluciones: SSC 2x suplementado con SDS al 0,1% (p/v) (durante 5 min); SSC 2x, SDS 0,1% (15 min); SSC 0,5x, SDS 0,1% (15 min); SSC 0,1x, SDS 1% (15 min) y, opcionalmente, a 42°C con SSC 0,1x, SDS 1% (30 min). Alternativamente, las hibridaciones homólogas se llevaban a cabo según el protocolo facilitado por Amersham para las membranas Hybond-N+. En este caso, la disolución de hibridación contenía SSPE 5x



(el tampón SSPE 1x contiene NaCl, 0,18 M; fosfato sódico, 10 mM; y EDTA, 1 mM; pH 7,7), disolución de Denhardt 5x, ADN de esperma de arenque, 100  $\mu\text{g/ml}$  y SDS al 0,5% (p/v). La prehibridación e hibridación se llevaban a cabo como en el caso anterior a 65°C. El filtro se lavaba entonces con agitación moderada a temperatura ambiente 3 veces (30 min cada una) con un tampón que contenía fosfato sódico 5 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM y SDS al 0,2% (p/v). Tras los lavados correspondientes, los filtros se autorradiografiaban utilizando películas radiográficas Valca XP-44 y pantallas intensificadoras Lightning Plus (Dupont), a una temperatura de -80°C.

## 2.4.5. Manipulaciones enzimáticas del ADN

### 2.4.5.1. Restricción

Las endonucleasas de restricción empleadas en este trabajo fueron suministradas por Boehringer, BRL, New England Biolabs o Pharmacia, y se utilizaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por los fabricantes. Para obtener restricciones totales, las reacciones se llevaban a cabo a la temperatura recomendada (generalmente 37°C) durante un tiempo variable (entre 2 y 15 horas) y se detenían mediante incubación de la mezcla de restricción a 65°C durante 10 min. Para obtener restricciones parciales se empleaban cantidades reducidas de enzima (0,15 U/ $\mu\text{g}$  de ADN) y tiempos de incubación cortos. Las restricciones de ADN total de cianobacterias se llevaban a cabo con tiempos de incubación prolongados (entre 7 y 15 horas) empleando en general cantidades de enzima no inferiores a 20 U/ $\mu\text{g}$  de ADN.

Todas las restricciones de plásmidos o muestras de ADN total que contuvieran ARN se llevaban a cabo en presencia de 1  $\mu\text{g}$  de RNasa A de pancreas bovino (Boehringer) previamente tratada como se describe en Maniatis *et al.* (1982) para destruir la posible actividad DNasa contaminante.

Para la obtención de mapas de restricción, el ADN se sometía a digestión múltiple con las correspondientes enzimas en todas las combinaciones posibles (sencillas, dobles y triples) y los fragmentos obtenidos se visualizaban tras electroforesis en geles de agarosa. Siempre que era posible, se hacía uso de aquellas enzimas para las

que había dianas conocidas y localizadas asimétricamente en la porción del plásmido correspondiente al vector.

#### 2.4.5.2. Desfosforilación

Cuando no se utilizaban vectores de selección positiva para la construcción de plásmidos en los que el fragmento a clonar no era portador de genes seleccionables (resistencia a antibióticos), para evitar la obtención de plásmidos que no contuvieran inserto se procedía a eliminar los extremos 5'-fosfato de los vectores mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Pharmacia), según se describe en Maniatis *et al.* (1982). La reacción se desarrollaba a 37°C durante 30 min y se detenía mediante incubación a 65°C durante 10 min. El vector desfosforilado se purificaba mediante electroforesis en un gel de agarosa y aislamiento de la banda correspondiente antes de someterlo a ligación.

#### 2.4.5.3. Relleno de extremos cohesivos

Para obtener fragmentos de ADN con extremos romos tras digestión con enzimas que generaban extremos cohesivos 5' protuberantes, se procedía al relleno de estos extremos cohesivos mediante tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Boehringer), según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Tras la restricción con la enzima correspondiente y el tratamiento con el fragmento Klenow en presencia de los dNTP necesarios durante 15 min a temperatura ambiente, la reacción se detenía mediante incubación a 65°C durante 10 min. Los fragmentos así tratados se purificaban mediante electroforesis en geles de agarosa y aislamiento de las bandas correspondientes.

#### 2.4.5.4. Ligación

Los extremos de distintos fragmentos de ADN generados tras restricción (y desfosforilación o tratamiento con el fragmento Klenow en su caso) se ligaban mediante tratamiento con ADN ligasa del bacteriofago T4 (Pharmacia), empleada según las instrucciones del fabricante. La reacción se llevaba a cabo en un volumen de 10 µl a una

temperatura de 12-18°C durante 16 h. Excepcionalmente, la incubación se llevaba a cabo a temperatura ambiente durante 4-6 h. Las moléculas producidas en esta reacción se utilizaban para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

#### 2.4.5.5. Marcaje radiactivo de sondas de ADN

El fragmento de ADN a utilizar como sonda se purificaba mediante electroforesis en un gel de agarosa seguida de extracción de la banda correspondiente. Una cantidad de 50-200 ng de dicho fragmento se marcaba radiactivamente utilizando 30  $\mu$ Ci de 5' [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (3000 mCi/ $\mu$ mol; New England Nuclear) y, según los casos, diversos kits de marcaje suministrados por Boehringer ("Nick translation kit" o "Random primed DNA labeling kit") o BRL ("Random primers DNA labeling system") de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. En todos los casos el exceso de nucleótidos no incorporados se eliminaba mediante la filtración de la muestra a través de columnas de Sephadex G-50 suministradas por Boehringer ("Quick Spin Columns").

#### 2.4.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación de moléculas de ADN de doble cadena se llevaba a cabo por el procedimiento de terminación de cadenas con didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) y resolución de las cadenas de ADN generadas mediante electroforesis en geles de urea-poliacrilamida. La secuenciación de fragmentos de ADN de longitud mayor de 300 pb aproximadamente se llevaba a cabo utilizando plásmidos conteniendo delecciones seriadas del inserto de ADN que se deseaba secuenciar.

##### 2.4.6.1. Obtención de delecciones seriadas

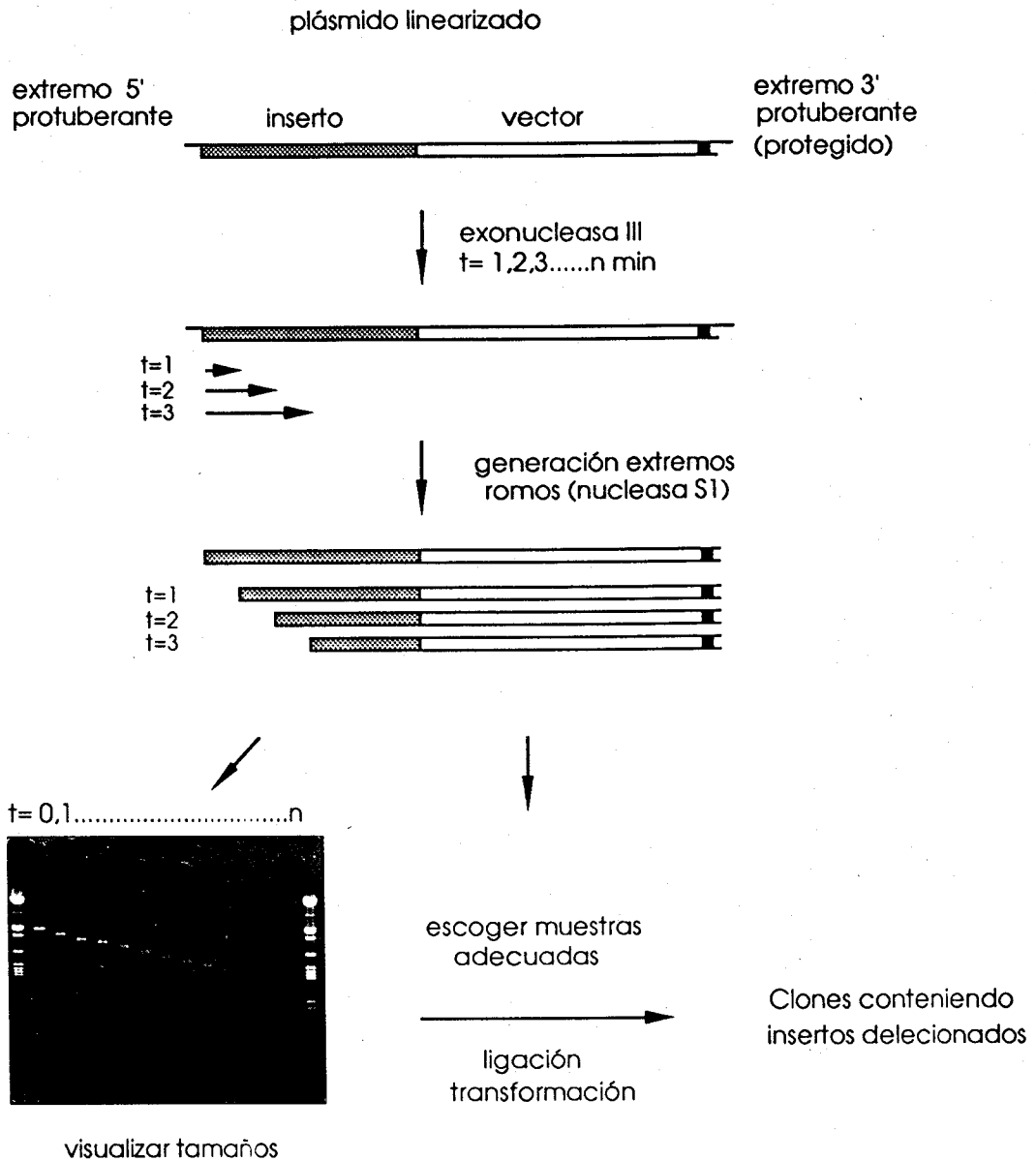
Las delecciones seriadas de los insertos contenidos en pCSAM11, pCSAM12, pCSAM19 y pCSAM20 se obtuvieron mediante digestión con exonucleasa III de *E. coli*, una enzima que es específica de ADN de doble cadena con extremos 5' protuberantes (Henikoff, 1984). El hecho de que la enzima no actúe sobre extremos 3' protuberantes la hace

ideal para la realización de digestiones unidireccionales mediante la doble digestión del plásmido a tratar con una enzima que genere extremos 3' protuberantes y con una segunda enzima que genere extremos 5' protuberantes. De esta forma, sólo se delecciona a partir del extremo 5' protuberante, impidiéndose la deleción de zonas funcionalmente importantes del vector. El ADN plasmídico empleado en la digestión con exonucleasa III debe ser superenrollado y de gran pureza, dado que las mellas en una cadena del ADN pueden permitir la iniciación de digestión por parte de la exonucleasa III. Por ello, se empleaban siempre plásmidos purificados mediante precipitación con polietilenglicol (ver aptdo. 2.4.4.2).

El procedimiento seguido era el recomendado para el kit de obtención de deleciones seriadas suministrado por Pharmacia ("*double-stranded nested deletion kit*") y se resume en la figura 1. En primer lugar, el plásmido se digería con la enzima que proporcionaba extremos 5' protuberantes (*Hind* III en el caso de pCSAM11 y pCSAM12 y *Xba* I en el caso de pCSAM19 y pCSAM20). Después, el plásmido se digería con la enzima que generaba extremos 3' protuberantes (*Kpn* I en todos los casos) y se sometía a digestión con exonucleasa III. Tras distintos periodos de incubación, los plásmidos obtenidos se trataban con nucleasa S1, generándose así extremos romos que se ligaban después mediante tratamiento con ligasa del fago T4. Los plásmidos resultantes se recuperaban mediante transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

#### 2.4.6.2. Aislamiento y desnaturalización de ADN

Las preparaciones de ADN bicatenario empleadas en experimentos de secuenciación deben estar libres de oligonucleótidos, ribonucleótidos e inhibidores de las ADN polimerasas. Todos estos contaminantes estan presentes en preparaciones obtenidas por los procedimientos más comunes. Se empleó por tanto el procedimiento de purificación de plásmidos recomendado por Pharmacia para su uso en reacciones de secuenciación con la ADN polimerasa del fago T7 ("*Miniprep kit plus*"). Tras obtener las preparaciones de los plásmidos, éstos se desnaturalizaban mediante la adición de NaOH y posteriormente los oligonucleótidos contaminantes y el NaOH se



**Fig. 1. Procedimiento seguido para la obtención de deleciones seriadas mediante digestión con exonucleasa III de *E. coli*.**

El plásmido portador del inserto de ADN de *Anabaena* cuyo tamaño se deseaba reducir se digería con dos endonucleasas, una que generaba extremos 3' protuberantes y otra que generaba extremos 5' protuberantes (sensibles a exonucleasa III). Tras diversos periodos de digestión con exonucleasa III, los extremos de los fragmentos obtenidos se convertían en romos mediante digestión con nucleasa S1. Para escoger las muestras con los tamaños deseados, los plásmidos resultantes del tratamiento se visualizaban en gels de agarosa, incluyendo ADN del fago lambda digerido con *Cla* I como patrón de tamaño. Tras el tratamiento con ligasa de T4, se transformaban células de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se analizaban los clones obtenidos mediante restricción. En el ejemplo que se muestra, el plásmido tratado era pCSAM12 y las endonucleasas de restricción empleadas *Hind* III, que genera extremos 5' protuberantes, y *Kpn* I, que genera extremos 3' protuberantes.

retiraban mediante centrifugación a través de columnas de Sephacryl S-400 ("Miniprep spun columns", Pharmacia).

#### 2.4.6.3. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea-poliacrilamida. Secado y autorradiografía de geles

Las reacciones de polimerización a partir del cebador suministrado se llevaban a cabo utilizando un "kit" para secuenciación ("T7 Sequencing kit", Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se emplearon dos cebadores diferentes, ambos correspondientes a la misma región del vector pIC20R, en el que se habían clonado los fragmentos a secuenciar. Estos cebadores eran el denominado universal -20 (Pharmacia) y el denominado universal -40 (del "kit" "Sequenase", USB). El nucleótido empleado para marcar radiactivamente las cadenas sintetizadas era 5' [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATP (1.212 mCi/ $\mu$ mol; New England Nuclear).

Los productos de las reacciones de secuenciación se sometían a electroforesis en geles de poliácridamida al 6% (p/v) conteniendo urea al 18% (p/v) en tampón TBE, utilizando para ello un aparato de la firma Hoefer (modelo SE 1500 "Pocker-face"). La electroforesis se llevaba a cabo a una potencia constante de 130 W y una temperatura de 50-60°C. Tras la electroforesis, el gel se transfería a papel de filtro (Whatman 3MM), se fijaba durante 15 min en una disolución de metanol al 10% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en agua y se secaba mediante aplicación de calor y vacío en un secador Hoefer, modelo SE 1160, antes de someterlo a autorradiografía con películas Valca XP-44, a temperatura ambiente.

#### **2.4.7. Mutagénesis *in vivo* de fragmentos de ADN mediante el uso de un transposón defectivo**

La mutagénesis de los fragmentos de ADN de *Anabaena* contenidos en los plásmidos pRLA2 y pRLA3 se llevó a cabo utilizando un minielemento transponible, denominado mini-*kan*, contenido en el fago  $\lambda$ 1105 (Way *et al.*, 1984) (ver figura 11). El minitransposón mini-*kan*, de 1,8 kb, consiste en el gen *npt* de resistencia a kanamicina/neomicina procedente de Tn903 flanqueado a cada lado por 70 pb correspondientes a las secuencias repetidas de los extremos

del transposón Tn10. El virus  $\lambda$ 1105 es un derivado del fago lambda que contiene el minitransposón mini-kan y el gen que codifica la transposasa del transposón Tn10 (necesaria para que el minitransposón salte a otra molécula de ADN) bajo el control del promotor *ptac*, inducible por IPTG. Se trata además de un virus defectivo, es decir, que porta una mutación que lo hace carecer de funciones requeridas para su replicación en *E. coli*. No obstante, la estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$ , hospedadora de los plásmidos que se deseaba mutagenizar, contenía un supresor de la mutación mencionada, por lo que, para impedir que se produjeran ciclos de lisis, tras la infección las células se cultivaban a 42°C.

Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadoras de pRLA2 o pRLA3 (aproximadamente  $5 \times 10^8$  células), cultivadas en medio LB suplementado con maltosa al 0,2%, se recogían en fase exponencial de crecimiento y se infectaban con el virus  $\lambda$ 1105 (aproximadamente  $5 \times 10^7$  unidades formadoras de halos) en un volumen de 100  $\mu$ l de medio LB. Tras incubar durante 30 min a temperatura ambiente, se añadían 500  $\mu$ l de medio LB e IPTG 0,2 mM (concentración final) y se incubaban a 37°C durante 80 min. Durante este periodo, la presencia de IPTG inducía la expresión del gen de la transposasa, que a su vez hacía que se produjera la transposición del minitransposón mini-kan a otras moléculas de ADN. Las células se sembraban entonces en una sola caja de medio LA conteniendo pirofosfato tetrasódico 1,25 mM, 50  $\mu$ g/ml de ampicilina (resistencia codificada por pRLA2 y pRLA3) y 500  $\mu$ g/ml de kanamicina (resistencia codificada en el minitransposón) y se incubaban a 42°C durante 24 horas. La incubación a 42°C y la presencia de pirofosfato tetrasódico 1,25 mM en el medio contribuyen a que no se produzcan infecciones posteriores por parte de partículas de fagos libres. Las colonias obtenidas (aproximadamente  $10^3$ ) se recogían con ayuda de 2 ml de medio LB y el ADN plasmídico de las mismas se aislaba por el procedimiento de lisis alcalina (aptdo. 2.4.4.2). Finalmente, para seleccionar los plásmidos mutagenizados se transformaban células de *E. coli* DH5 $\alpha$  con una fracción del ADN plasmídico aislado (entre 10 y 100 ng), y se seleccionaban las colonias resistentes a ampicilina y kanamicina portadoras de plásmidos mutagenizados.

#### 2.4.8. Obtención de mutantes *nucA* de *Anabaena*

Los mutantes *nucA* se obtuvieron tanto en *Anabaena* sp. PCC 7120 como en *A. variabilis* ATCC 29413 (estirpe FD) por el procedimiento cuya estrategia se razonará en el apartado 3.5 y que se esquematiza en la figura 24. Se realizó una conjugación tripartita (ver aptdo. 2.4.3) entre *E. coli* HB101 conteniendo el plásmido conjugativo RP4, *E. coli* HB101 conteniendo el plásmido auxiliar pRL528 y el plásmido portador de una copia mutada del gen *nucA* (pRLA4 o pRLA5 en el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120 y pRLA6 en el caso de *A. variabilis* ATCC 29413), y la estirpe de *Anabaena* correspondiente. En el caso de la conjugación que implicaba al plásmido pRLA4 (portador de, al menos, tres sitios *Ava* III), la estirpe de *E. coli* portadora del plásmido pRL528 contenía además otro plásmido metilador, pRL591-W45, que contiene el gen de una metilasa que metila sitios *Ava* III. Tras mezclar e incubar a temperatura ambiente las dos estirpes adecuadas de *E. coli* durante aproximadamente 1 h, la suspensión resultante se mezcló a su vez con células de *Anabaena* procedentes de cultivos en medio BG11<sub>0</sub> (incubados a 30°C en el caso de la estirpe *Anabaena* sp. PCC 7120 y a 40°C en el caso de la estirpe FD de *A. variabilis* ATCC 29413). La mezcla de la cianobacteria con *E. coli* se sembró entonces sobre filtros Nucleopore estériles en cajas de medio BG11 conteniendo 5% de medio LB. Las cajas se incubaron a 30°C con baja intensidad de iluminación durante 48 h y, tras este periodo de expresión, los filtros se transfirieron a cajas de medio BG11 suplementado con 25 µg/ml de neomicina. La presencia del gen *npt* confiere resistencia a kanamicina y neomicina, siendo este último antibiótico el más usado en el caso de cianobacterias filamentosas. En el caso de la conjugación con la estirpe FD, los filtros se transfirieron posteriormente a cajas conteniendo 40 o 100 µg/ml de neomicina.

Tras una incubación de 11-14 días, tras los que el césped de cianobacterias no resistentes al antibiótico se había lisado, se apreciaron colonias resistentes a neomicina, algunas de las cuales se sembraban por estrías en el mismo medio para liberarlas de las células de *E. coli* HB101 contaminantes. Una vez libres de *E. coli*, las células de *Anabaena* (resistentes a neomicina) se inocularon en medio BG11 líquido conteniendo 5 µg/ml de neomicina. Los cultivos obtenidos se recogieron y las células se sembraron en medio BG11



sólido conteniendo 25  $\mu\text{g/ml}$  de neomicina y sacarosa al 5%. Como se esquematiza en la figura 24, la resistencia a sacarosa vendría dada por un doble entrecruzamiento que conllevaría la pérdida del gen *sacB* (que confiere sensibilidad a la sacarosa) y de las resistencias a estreptomycin y espectinomycin. Las colonias que crecieron en estas cajas, que presumiblemente habían sufrido la sustitución del gen *nucA* silvestre por la copia mutada introducida, se transfirieron con palillos a medio conteniendo 2  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycin y 2  $\mu\text{g/ml}$  de espectinomycin para ensayar su sensibilidad a dichos antibióticos (los genes de resistencia a los mismos estaban localizados en la porción de los plásmidos introducidos que se perdería tras un evento de doble recombinación).

## 2.5. METODOS ANALITICOS

### 2.5.1. Determinación de clorofila

El contenido celular en clorofila *a* se determinaba espectrofotométricamente tras someter las células a una extracción con metanol (MacKinney, 1941). Las células contenidas en 1 ml de suspensión celular se recogían mediante centrifugación (10.000  $\times g$ , 1 min) y se resuspendían en 1 ml de metanol. Alternativamente, un volumen de suspensión celular no superior a 0,1 ml se mezclaba con 0,9 ml de metanol. En ambos casos, tras agitación vigorosa durante 30 s, el extracto se centrifugaba a 10.000  $\times g$  durante 2 min. La concentración de clorofila en el sobrenadante resultante se estimaba en base a su  $A_{665}$ , utilizando un coeficiente de extinción  $E = 74,46 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La cantidad de células de *Anabaena* que contiene 1  $\mu\text{g}$  de clorofila contiene aproximadamente 30  $\mu\text{g}$  de proteína.

### 2.5.2. Determinación de proteína

#### 2.5.2.1. En células enteras

La determinación de proteína en suspensiones celulares se llevó a cabo según el método descrito por Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones introducidas por Markwell *et al.* (1978). A la muestra (0-100  $\mu\text{g}$  de proteína), contenida en un volumen de 0,2 ml, se

añadían 0,05 ml de NaOH 0,5 N y 0,75 ml de una mezcla compuesta por Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%, NaOH al 0,4%, tartrato sódico-potásico al 0,16%, SDS al 1% y CuSO<sub>4</sub> al 0,04%. Tras incubar durante 15 min a 30°C, se añadían 0,075 ml de reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck) diluído 2 veces y, tras una incubación posterior de 30 min a 30°C, se determinaba la absorbancia a 750 nm. Para cada determinación se construía una curva patrón empleando cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

#### 2.5.2.2. En muestras libres de células

Para la determinación de proteína en extractos libres de células se empleaba el método descrito por Bradford (1976). La muestra (0-25 µg de proteína), contenida en un volumen de 0,8 ml, se mezclaba con 0,2 ml de reactivo para la determinación de proteína ("Bio-Rad protein assay") y la A<sub>595</sub> de la mezcla se determinaba al cabo de 5 min de incubación a temperatura ambiente. Como patrón se empleaba ovoalbúmina.

#### 2.5.3. Determinación de ADN

La cantidad de ADN se estimaba normalmente tras electroforesis de una porción de la muestra en un gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio. La fluorescencia (inducida por la luz ultravioleta) emitida por las moléculas de bromuro de etidio intercaladas en el ADN de la muestra se comparaba con la emitida por las moléculas intercaladas en cantidades conocidas de fragmentos de restricción de ADN del fago lambda también incluídos en el gel.

Alternativamente, el ADN se cuantificaba en base a su A<sub>260</sub>, empleándose un coeficiente de extinción  $E = 0,020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.5.4. Determinaciones espectrofotométricas

Las medidas de absorbancia de luz visible se realizaban en espectrofotómetros marca Hitachi o Pye Unicam. Las medidas de absorbancia de luz ultravioleta se llevaban a cabo, utilizando cubetas de cuarzo, en un espectrofotómetro Hitachi, modelo U-1100.

### **2.5.5. Medidas de pH**

El pH de los tampones y disoluciones se determinaba utilizando un pH-metro Crison.

### **2.5.6. Medidas de intensidades de iluminación**

La densidad de flujo de radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm), expresada en  $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  (denominada "intensidad luminosa" en este trabajo), se estimó empleando un medidor-integrador LI-COR Inc., provisto de una célula sensora de fotones LI-188 B.

## **2.6. OTROS METODOS**

### **2.6.1. Cromatoenfoque**

El cromatoenfoque de proteínas se llevó a cabo según la técnica descrita por Sluyterman y Elgersma (1978), utilizando "Polybuffer 96-74" y "Polybuffer exchanger-94" (Pharmacia) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. La columna se equilibró con tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,3). La muestra se equilibró en el mismo tampón mediante diálisis a través de membranas Visking (límite de exclusión 8.000-15.000 Da) y se aplicó encima del lecho de la columna. A continuación se introdujo el eluyente (aproximadamente 10 volúmenes de columna de polybuffer 96:polybuffer 74:agua en proporción 3:7:90 ajustado a pH 5 con HCl) y se recogieron fracciones del eluato a las que se determinó el pH. Todo el proceso de cromatoenfoque se llevó a cabo a 4°C.

### **2.6.2 Tratamiento informático de secuencias de ADN y proteínas**

La edición de secuencias de ADN y proteínas se llevó a cabo utilizando los programas DNA Strider y MacMolly, ambos en versión Apple Macintosh. El programa DNA Strider se empleó también para el cálculo del peso molecular deducido de las secuencias de proteínas y

para la búsqueda de zonas de lectura abierta en secuencias de ADN. La aplicación del algoritmo "Testcode" a las secuencias de nucleótidos y del algoritmo de Kyte y Doolittle (para el cálculo de la hidrofobicidad de secuencias de aminoácidos) se realizó utilizando el programa MacMolly.

La comparación de secuencias de aminoácidos con las secuencias contenidas en el "EMBL Data Bank" (Heidelberg) se realizó utilizando el programa FASTA (Pearson y Lipman, 1988). El punto isoeléctrico correspondiente a la proteína NucA se determinó utilizando el programa Isoelectric, contenido en el paquete informático del "Genetics Computer Group" de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984), depositado en el Centro de Informática Científica de Andalucía.

Finalmente, la detección del sitio de corte más probable de la secuencia señal de la proteína NucA se llevó a cabo utilizando el programa PLOT.A/SIG contenido en el paquete de programas MacProt, 1990 (Peter Markiewicz, Dept. Microbiology, MBI, UCLA, Los Angeles, CA 90024, USA) distribuido por EMBL.

### **3. RESULTADOS**

### **3.1. PRESENCIA DE UNA ACTIVIDAD NUCLEASA CORRESPONDIENTE A UN POLIPEPTIDO DE 29 kDa EN ALGUNAS CIANOBACTERIAS Y CARACTERIZACION DE LA MISMA EN *A. variabilis* ATCC 29413 Y *Anabaena* sp. PCC 7120.**

Con anterioridad se había descrito que la incubación de ADN del fago lambda o del plásmido pBR322 con células enteras de diversas cianobacterias filamentosas resulta en la degradación casi total de estas moléculas de ADN. Este fenómeno de degradación es especialmente acusado con *A. variabilis* ATCC 29413, una estirpe en la que no sólo las células sino también el medio de cultivo libre de células son capaces de llevar a cabo una degradación exhaustiva del ADN suministrado como sustrato (Wolk y Kraus, 1982).

En este apartado se describe la presencia de una actividad nucleasa correspondiente a un polipéptido de 29 kDa en una serie de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, incluyendo *Anabaena variabilis* ATCC 29413 y *Anabaena* sp. PCC 7120. Asimismo, se presenta una caracterización inicial a nivel bioquímico de dicha nucleasa en las estirpes ATCC 29413 y PCC 7120. Los resultados obtenidos permiten afirmar que, en lo que concierne a los sustratos susceptibles de degradación, al peso molecular según electroforesis desnaturizante y al requerimiento por cationes divalentes, las nucleasas de 29 kDa encontradas en *A. variabilis* ATCC 29413 y *Anabaena* sp. PCC 7120 son esencialmente idénticas.

Las estirpes derivadas de *A. variabilis* ATCC 29413 empleadas en los experimentos que se describen a continuación fueron, según se indica en cada caso, *A. variabilis* ATCC 29413-P9 y *A. variabilis* ATCC 29413-FD (ver Materiales y Métodos, aptdo. 2.1.1.1).

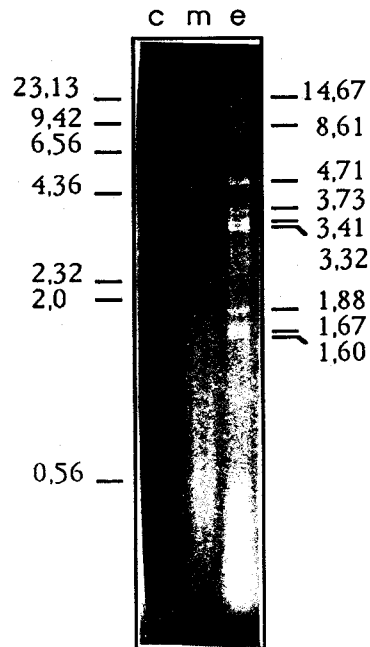
#### **3.1.1. Presencia de una actividad nucleasa en sobrenadantes de cultivos de *A. variabilis* ATCC 29413-P9. Determinación del peso molecular de dicha nucleasa mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida.**

La incubación de ADN del fago lambda con células enteras de *A. variabilis* provocaba una exhaustiva degradación del sustrato suministrado, quedando éste reducido a fragmentos de pequeño

tamaño (<500 pb en el experimento mostrado en la Fig. 2). Asimismo, cuando se separaban las células del medio de cultivo mediante centrifugación, se observaba que el medio de cultivo libre de células era capaz de producir una degradación similar, mientras que el extracto crudo obtenido a partir de las células no era capaz de degradar el ADN suministrado a fragmentos menores que los generados por las endonucleasas de restricción presentes en esta estirpe (figura 2). Se ha descrito que *A. variabilis* ATCC 29413 posee dos endonucleasas de restricción, *Avr I* (Duyvesteyn *et al.*, 1983), isoesquizómero de *AvaI*, y *Avr II* (Houmard y Tandeau de Marsac, 1988), cuya acción combinada sobre el ADN del fago lambda produce fragmentos de 14,67, 8,61, 4,71, 3,73, 3,49, 3,32, 1,88, 1,67, 1,60 y 0,07 kb (ver figura 2).

El hallazgo de una elevada actividad nucleasa en el medio de cultivo de *A. variabilis* ATCC 29413 nos llevó a intentar caracterizar la/s nucleasa/s presentes en esta estirpe. En primer lugar, se puso a punto un método de ensayo en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo un sustrato embebido en la matriz (basado en Rosenthal y Lacks, 1977; ver Materiales y Métodos, apdo. 2.2.2.1.2). En este ensayo, las muestras de células, medio de cultivo, extracto crudo, etc. que se deseaba ensayar se sometían a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo un ácido nucleico. Tras la electroforesis, se retiraba el SDS de los geles mediante sucesivos lavados, permitiéndose así la renaturalización de las proteínas. Tras un tiempo de incubación en un tampón adecuado en el que las proteínas con actividad nucleasa degradaban el sustrato embebido en el gel, se visualizaba y fotografiaba éste tras inmersión en una disolución de bromuro de etidio y excitación con luz ultravioleta. Aquellas zonas del gel en las que había tenido lugar la degradación del sustrato se revelaban como zonas no fluorescentes sobre un fondo fluorescente (ver figura 3A). Este ensayo, si bien es sólo limitadamente cuantitativo, permite estudiar la actividad nucleasa correspondiente a un determinado polipéptido sin que tengan lugar interferencias debidas a otras proteínas, siendo esto de particular utilidad cuando se ensayan extractos crudos.

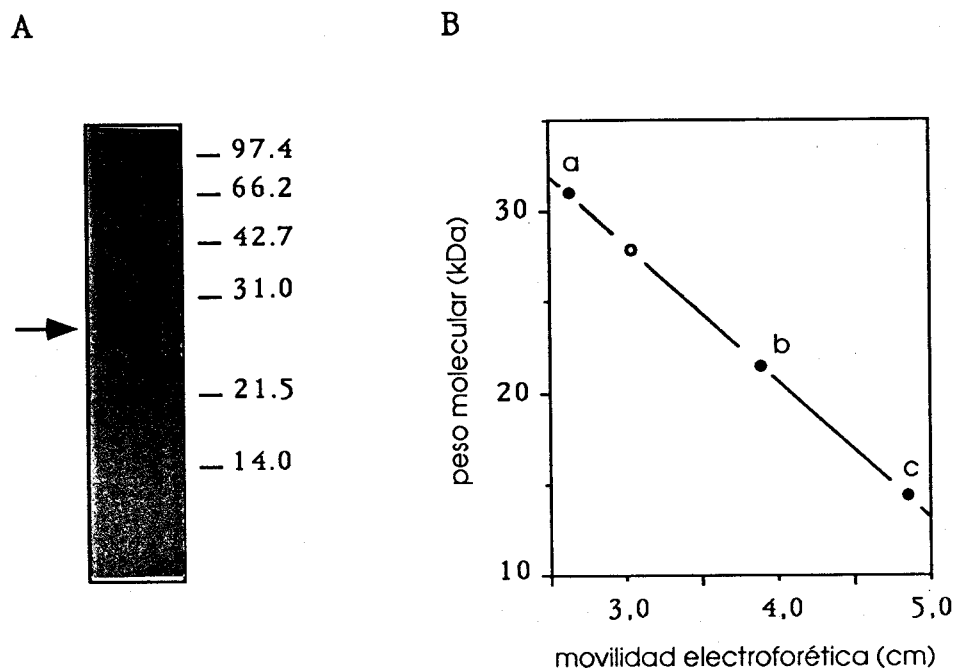
Mediante el uso de ensayos en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN de timo de ternera como sustrato, se encontró una



**Fig. 2. Actividad DNasa de *A. variabilis* ATCC 29413-P9.**

0,5  $\mu$ g de ADN no metilado del fago lambda se incubaron como se describe en Materiales y Métodos, durante 90 min, en presencia de (c) células de *A. variabilis* ATCC 29413-P9 (procedentes de 100  $\mu$ l de un cultivo conteniendo 4,5  $\mu$ g clorofila/ml), (m) medio de cultivo libre de células (10  $\mu$ l) o (e) extracto libre de células (10  $\mu$ l, conteniendo el extracto correspondiente a las células presentes en 40  $\mu$ l de cultivo). Los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 %. Como patrón se incluyeron 0,5  $\mu$ g de ADN del fago lambda digerido con *Hind* III (los tamaños de los fragmentos generados se indican en kb a la izquierda de los gels). A la derecha se indican los tamaños correspondientes a la digestión combinada de ADN del fago lambda con las endonucleasas *Avr* I y *Avr* II.





**Fig. 3. Ensayo de la actividad DNasa del medio de cultivo de *A. variabilis* ATCC 29413-P9 en gel de SDS-poliacrilamida. Determinación del peso molecular de dicha DNasa.**

10  $\mu$ l de sobrenadante de un cultivo de *A. variabilis* conteniendo 3  $\mu$ g de clorofila/ml se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN de timo de ternera como sustrato (ver Materiales y Métodos).

(A) Tinción con bromuro de etidio que revela una banda de actividad DNasa presente en la muestra. Las proteínas patrón empleadas fueron, de arriba a abajo, fosforilasa b de conejo, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica bovina, inhibidor de tripsina de soja y lisozima. Los pesos moleculares correspondientes se indican a la derecha en kDa. La flecha señala la banda de actividad DNasa.

(B) Determinación del peso molecular correspondiente a la banda de actividad DNasa observada (o). Las proteínas patrón empleadas fueron: anhidrasa carbónica bovina (a), inhibidor de tripsina de soja (b) y lisozima (c).

proteína con actividad DNasa en el medio de cultivo de *A. variabilis* ATCC 29413 (figura 3A). Para determinar el peso molecular de dicha nucleasa, se sometieron simultáneamente a electroforesis una mezcla de proteínas patrón de peso molecular conocido y una muestra de medio de cultivo de *Anabaena*, tiñéndose el carril correspondiente a las proteínas patrón con una disolución de azul de Coomassie. En la figura 3B se muestra el resultado obtenido al representar los pesos moleculares frente a la movilidad electroforética de las proteínas marcadoras. El peso molecular de la banda de actividad DNasa que se observa en la figura 3A, calculado a partir de su movilidad electroforética, fué de aproximadamente 29 kDa.

Finalmente, cabe señalar que cuando se ensayaban en geles de SDS-poliacrilamida extractos obtenidos a partir de células de *A. variabilis* ATCC 29413 se observaba también una banda de actividad nucleasa en torno a 29 kDa. Así pues, dicha nucleasa estaba presente tanto en las células como en el medio extracelular. Este resultado, aparentemente contradictorio con los ensayos mostrados en la figura 2, se debe, como se mostrará más adelante, a la ausencia, en los ensayos en SDS-poliacrilamida, de interferencias por parte de otras proteínas presentes en los extractos.

### **3.1.2. Presencia de una actividad nucleasa de 29 kDa en diversas estirpes de cianobacterias.**

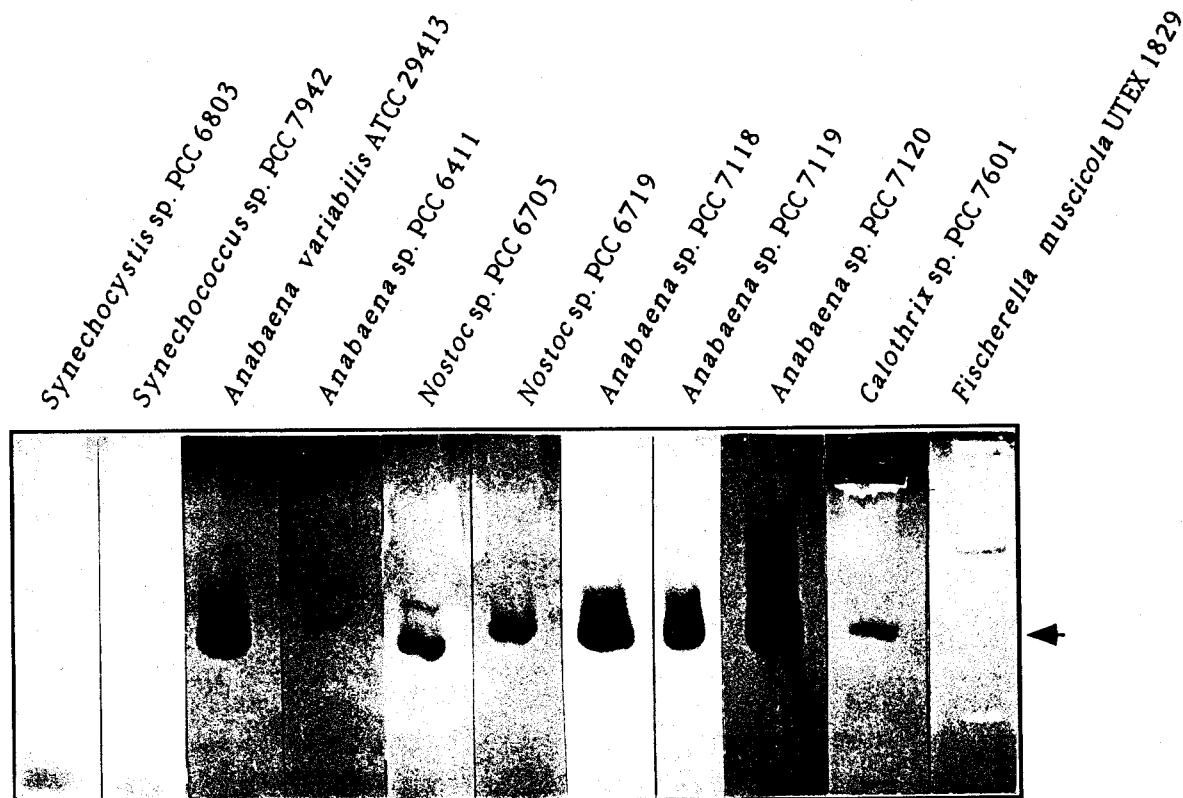
Se investigó la presencia de una actividad DNasa correspondiente a un polipéptido de 29 kDa en una serie de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos pertenecientes a las secciones IV y V de la clasificación propuesta por Rippka *et al.* (1979). Entre las cianobacterias de la sección IV ensayadas se encuentran una serie de estirpes, clasificadas dentro de los géneros *Nostoc* y *Anabaena*, que constituyen un grupo filogénicamente muy coherente (Lachance, 1981) y una estirpe del género *Calothrix*. Como representante de la sección V de la clasificación mencionada se ensayó la estirpe *Fischerella muscicola*. Por otro lado, se ensayaron también dos estirpes unicelulares (*Synechocystis* y *Synechococcus*), pertenecientes a la sección I, filogénicamente distantes de las cianobacterias filamentosas. El ensayo se llevó a cabo con muestras de extractos crudos libres de células.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4. Se observaba la presencia de una actividad DNasa correspondiente a un polipéptido de aproximadamente 29 kDa en todas las cianobacterias filamentosas ensayadas a excepción de *F. muscicola* UTEX 1829, que mostraba una banda de actividad correspondiente a un polipéptido con un peso molecular superior. Por otro lado, no se encontraba ninguna actividad apreciable en los extractos de las cianobacterias unicelulares, a pesar de haberse ensayado una cantidad de extracto tres veces mayor que en el caso de algunas cianobacterias filamentosas.

Merece una especial mención la presencia de esta actividad nucleasa en *Anabaena* sp. PCC 7120, la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos más ampliamente utilizada actualmente en estudios genéticos. En *Anabaena* sp. PCC 7120, al igual que en *A. variabilis* ATCC 29413, al menos una parte de la actividad nucleasa correspondiente al polipéptido de 29 kDa se encontraba en el medio de cultivo (resultados no mostrados).

### 3.1.3. Caracterización de la nucleasa de 29 kDa de *A. variabilis* ATCC 29413 y *Anabaena* sp. PCC 7120.

Como ya se ha mencionado, la nucleasa de 29 kDa de *Anabaena* se encontraba tanto en el medio extracelular como en los extractos de las células, si bien en este último caso su ensayo se veía dificultado por la presencia de otras proteínas. En general, la presencia de actividad en el medio de cultivo era mayor en los cultivos agitados mediante aireación que en los cultivos sometidos a agitación rotatoria. La mayor parte de los experimentos que se muestran se llevaron a cabo con preparaciones de nucleasa procedente del medio extracelular o liberada de las células mediante diversos tratamientos (ver Materiales y Métodos, aptdo. 2.2.1.1 y tabla 3). La nucleasa presente en el medio de cultivo de *A. variabilis* ATCC 29413-P9 se concentró y purificó parcialmente mediante cromatografía en fenil-sefariosa seguida de cromatografía en DEAE-celulosa. Los detalles experimentales se recogen en Materiales y Métodos (apdo. 2.2.1.1).



**Fig. 4. Presencia de una actividad DNasa correspondiente a un polipéptido de 29 kDa en distintas estirpes de cianobacterias.**

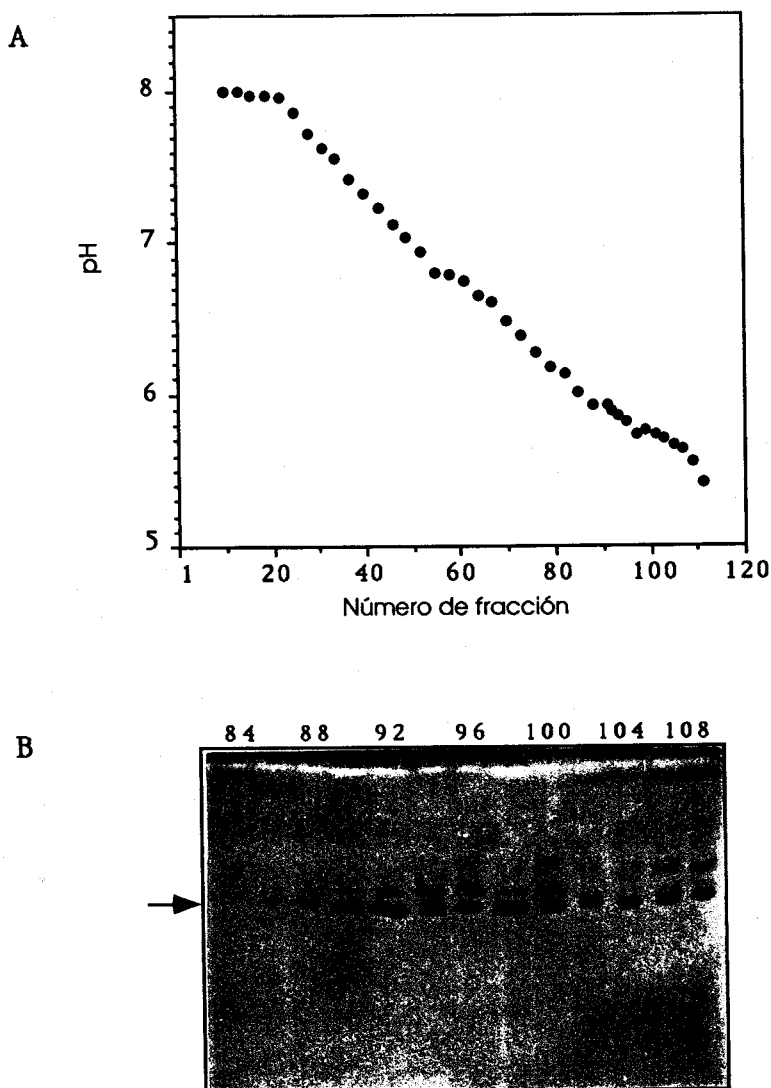
Células de las estirpes que se indican, procedentes de cultivos en medio sólido, se resuspendieron en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) suplementado con PMSF 1 mM, obteniéndose los extractos mediante congelación de la suspensión celular con aire líquido seguida de trituración. Tras eliminar los restos celulares, muestras conteniendo 90  $\mu$ g de proteína (estirpes PCC 6803, PCC 7942, PCC 7601 y UTEX 1829) o 30  $\mu$ g de proteína (resto de las estirpes) se ensayaron en geles conteniendo ADN de timo de ternera como sustrato, como se describe en Materiales y Métodos. La flecha señala la posición del polipéptido de 29 kDa.

### 3.1.3.1. Determinación del punto isoeléctrico.

El punto isoeléctrico de la nucleasa de 29 kDa de *A. variabilis* se determinó mediante cromatoenfoco. Dado que la técnica implica que las proteínas estén expuestas a un amplio rango de valores de pH, pudiendo resultar la actividad de las mismas sensiblemente afectada, se empleó una muestra de enzima muy concentrada, procedente de cromatografía en DEAE celulosa. Tras su aplicación a una columna de PBE 94, las proteínas se eluyeron mediante la creación de un gradiente de valores de pH entre 5 y 8. En la figura 5 se muestran los valores de pH correspondientes a las fracciones obtenidas, así como el ensayo en geles de SDS-poliacrilamida de la actividad DNasa de las mismas. Dentro del intervalo de pH 5,47-8,0, el pico de máxima actividad resultó estar en torno a las fracciones 94-96, correspondientes a un pH de aproximadamente 5,8, siendo éste por tanto el punto isoeléctrico determinado correspondiente a la nucleasa de 29 kDa de *A. variabilis*.

### 3.1.3.2. Sustratos susceptibles de degradación.

Se investigaron los sustratos susceptibles de ser degradados por la nucleasa de 29 kDa. Para ello, muestras conteniendo actividad nucleasa de *A. variabilis* ATCC 29413-P9 o *Anabaena* sp. PCC 7120 se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo diversos ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 6. La nucleasa de *A. variabilis* resultó ser capaz de degradar tanto ADN (timo de ternera, fago lambda, plásmido pUC18) como ARN (virus MS2), siendo igualmente activa frente a ADN de cadena sencilla y de cadena doble. Asimismo, la nucleasa degradaba tanto ADN metilado (*dam*, *dcm*) como no metilado. Por otro lado, utilizando como sustrato ADN plasmídico covalentemente cerrado, se determinó que la enzima exhibía actividad endonucleasa, siendo capaz por lo tanto de producir incisiones en moléculas de ADN circulares cerradas covalentemente. Igualmente, la nucleasa de *Anabaena* 7120, además de degradar ADN, mostraba también actividad RNasa, y era capaz de producir incisiones en ADN covalentemente cerrado.

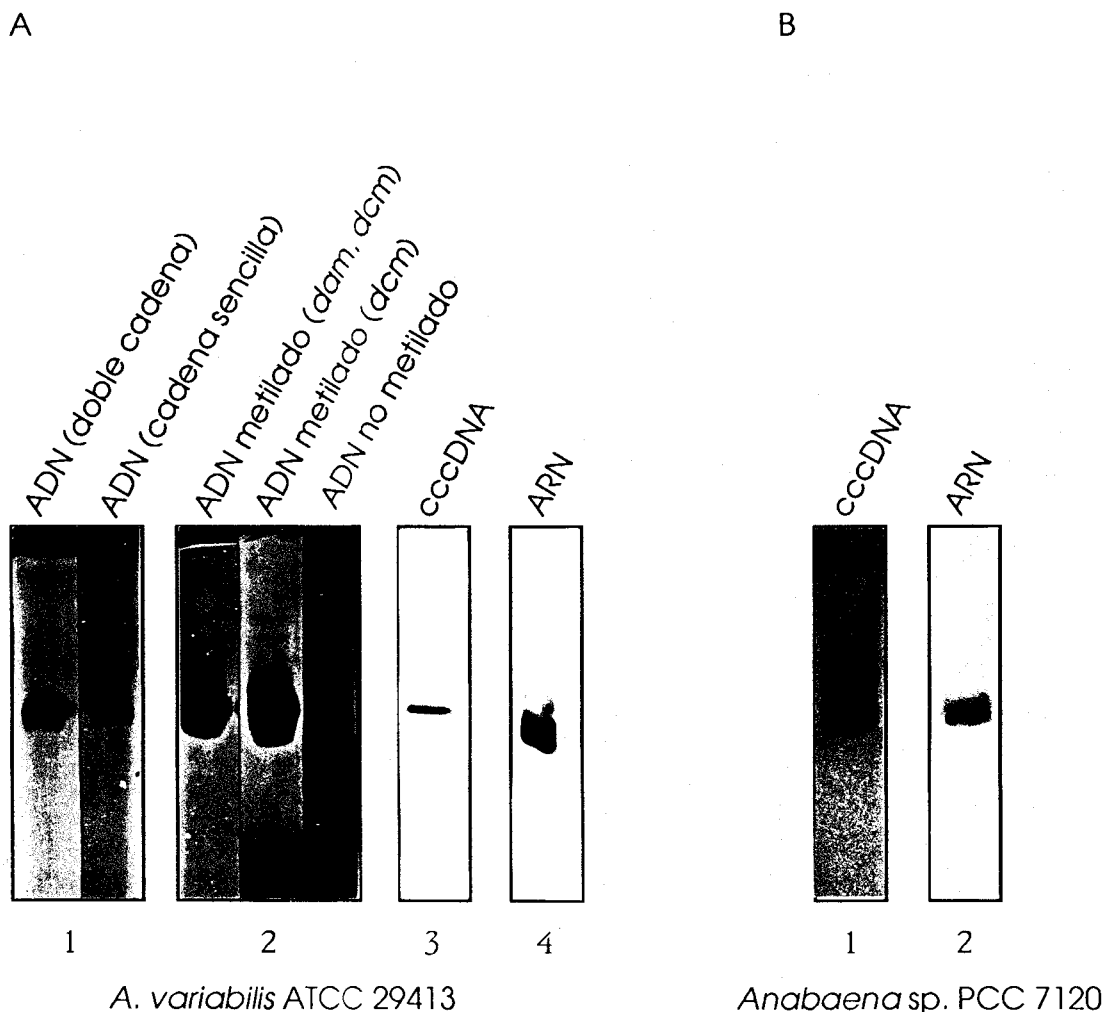


**Fig. 5. Determinación mediante cromatoenfoco del punto isoelectrico de la nucleasa de 29 kDa de *A. variabilis* ATCC 29413-P9.**

Una muestra de 0,8 ml, correspondiente a la combinación de fracciones con máxima actividad de una cromatografía en DEAE celulosa (preparación tipo III, ver aptdo. 2.2.1.1. y tabla 3), se concentró mediante centrifugación en microconcentradores Centricon-10 (Amicon), hasta un volumen final de 0,25 ml, y se dializó frente a tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,3). Esta muestra se cromatografió, a un flujo de 32 ml/h, en una matriz de PBE-94 (Pharmacia) equilibrada con tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,3) en una columna C10/20 (Pharmacia). Tras aplicar la muestra, la columna se lavó con 15 ml del mismo tampón y las proteínas se eluyeron mediante un gradiente de Polybuffer 96/74 (30%-70%, v/v, dilución 1:10, ajustado a pH 5 con HCl), recogiendo fracciones de 1,6 ml.

(A) Valores de pH correspondientes a las fracciones obtenidas en la elución de la columna de PBE 94.

(B) Ensayo de actividad DNasa de algunas de dichas fracciones en gels de SDS-poliacrilamida (se muestran únicamente las fracciones con actividad DNasa). La flecha señala la localización de la nucleasa de 29 kDa.



**Fig. 6.** Caracterización de la reacción llevada a cabo por la nucleasa de 29 kDa de *A. variabilis* ATCC 29413 y *Anabaena* sp. PCC 7120.

**I. Sustratos susceptibles de degradación.**

A) Muestras de sobrenadantes de cultivos de *A. variabilis* ATCC 29413-P9 se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo diversos ácidos nucleicos. 1, ADN de timo de ternera (doble cadena o cadena sencilla); 2, ADN del fago lambda (*dam*, *dcm*-metilado, *dcm*-metilado o no metilado); 3, ADN circular covalentemente cerrado (plásmido pUC18); 4, ARN del virus MS2. Las muestras contenían 10  $\mu$ l de sobrenadante sin concentrar (3) o 15  $\mu$ l de sobrenadante concentrado y parcialmente purificado mediante retención en fenil-sefarosa y precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 85% de saturación y posterior dilución hasta contener aproximadamente la misma actividad que el sobrenadante sin concentrar (1, 2, 4).

B) Muestras de nucleasa de *Anabaena* 7120 se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo diversos ácidos nucleicos. 1, ADN circular covalentemente cerrado (plásmido pCSAM11); 2, ARN ribosómico de *E. coli* (16S + 23S). Las muestras contenían 3  $\mu$ l de una preparación de tipo I (obtenida mediante tratamiento de las células de *Anabaena* correspondientes a 10  $\mu$ g de clorofila) (ver aptdo. 2.2.1.1 y tabla 3).

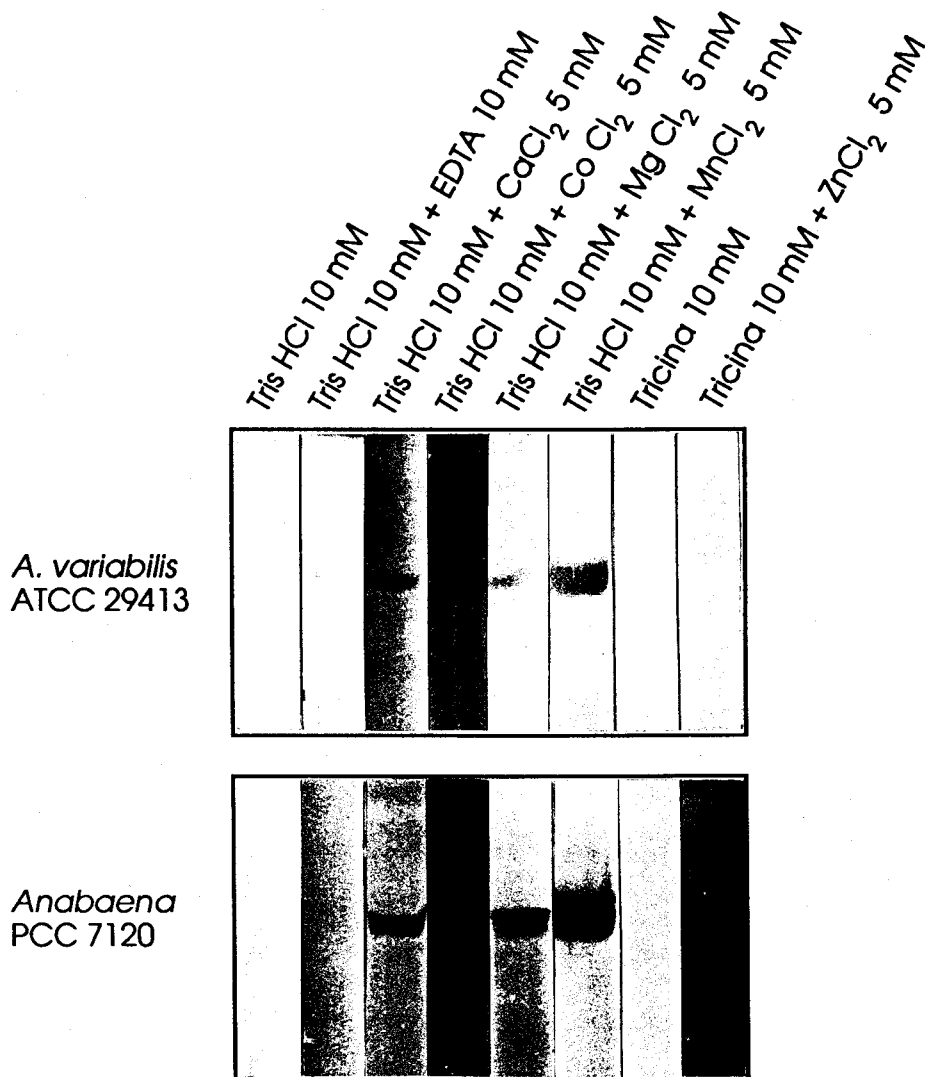
### 3.1.3.3. Requerimiento por cationes divalentes.

Se investigó el requerimiento por cationes que presentaba la reacción catalizada por la nucleasa de 29 kDa de *A. variabilis* ATCC 29413-FD y *Anabaena* sp. PCC 7120. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7. Se encontró que la nucleasa de ambas estirpes era completamente inactiva en presencia de EDTA 10 mM en el ensayo, lo que indicaba un requerimiento por cationes. Se ensayó, por lo tanto, el efecto de una serie de cationes divalentes sobre la actividad nucleasa desarrollada en ensayos en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN. En los experimentos que se muestran en la figura 7, tras electroforesis y lavado del SDS en presencia de EDTA 10 mM, el ensayo de actividad se llevó a cabo a 37°C en presencia de los cationes divalentes indicados.

Como se observa, ambas enzimas presentaban similares características. El  $Mn^{2+}$  era el catión que permitía un mayor nivel de actividad, mientras que  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  permitían una actividad menor y el  $Zn^{2+}$  no permitía el desarrollo de la actividad. Considerando que el  $Mn^{2+}$  es un catión que precipita en algunos tampones, se escogió el  $Mg^{2+}$  como catión divalente para todos los ensayos de actividad posteriores, tanto en SDS-poliacrilamida como en ensayos convencionales.

Por último, cabe mencionar también que, en ensayos de actividad nucleasa sobre ADN del fago lambda, se comprobó que la presencia de NaCl 50 mM reducía la actividad observada (no mostrado).





**Fig. 7.** Caracterización de la reacción llevada a cabo por la nucleasa de 29 kDa de *A. variabilis* ATCC 29413 y *Anabaena* sp. PCC 7120.

## II. Requerimiento por cationes divalentes.

Muestras de nucleasa de *Anabaena variabilis* ATCC 29413-FD o *Anabaena* 7120 se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN de timo de ternera como sustrato. Tras lavar los geles con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo EDTA 10 mM, cada uno de los carriles se procesó por separado y la actividad nucleasa se desarrolló en presencia de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) o Tricina-NaOH 10 mM (pH 7,5) suplementado con EDTA o el catión divalente indicado en cada caso. Las muestras contenían 6  $\mu$ l de preparaciones de tipo II obtenidas mediante el tratamiento de células de *A. variabilis* 29413-FD (209  $\mu$ g de clorofila/ml) o *Anabaena* 7120 (164  $\mu$ g de clorofila/ml)(ver aptdo. 2.2.1.1 y tabla 3).

Aunque no se muestra, la actividad desarrollada en tampón Tricina-NaOH 10 mM (pH 7,5) suplementado con MgCl<sub>2</sub> 10 mM era equivalente a la desarrollada en tampón Tris-HCl 10mM (pH 7,5) suplementado con MgCl<sub>2</sub> 10 mM.

### 3.2. CLONACION Y MUTAGENESIS EN *E. coli* DEL GEN *nucA*, QUE CODIFICA PARA LA NUCLEASA DE 29 kDa DE *Anabaena* sp. PCC 7120.

Entre las cianobacterias filamentosas son muy pocas las estirpes que permiten el uso de técnicas de transferencia de ADN y, en consecuencia, los estudios a nivel genético. Entre ellas, *Anabaena* sp. PCC 7120 es actualmente la más utilizada, dado que se ha desarrollado un sistema de transferencia de ADN desde *E. coli* por conjugación (Wolk *et al.*, 1984) que ha permitido en los últimos años un considerable avance en el estudio a nivel genético de este organismo.

En este apartado se describe la clonación de un fragmento de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 conteniendo el gen (*nucA*) que codifica la nucleasa de 29 kDa, así como la localización aproximada de dicho gen en el fragmento de ADN clonado, determinada mediante mutagénesis con un transposón defectivo y subclonación.

#### 3.2.1. Clonación de una región de ADN conteniendo el gen *nucA* a partir de una genoteca de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Con objeto de clonar el fragmento de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 que codifica la nucleasa de 29 kDa, se empleó una genoteca de ADN de *Anabaena* construida en el cósmido anfíbio pRL25C (Wolk *et al.*, 1988) y establecida en *E. coli* DH1. Dicha genoteca consta de 1056 clones individualizados, cada uno de los cuales contiene un cósmido con un fragmento de ADN de *Anabaena* de aproximadamente 40 kb.

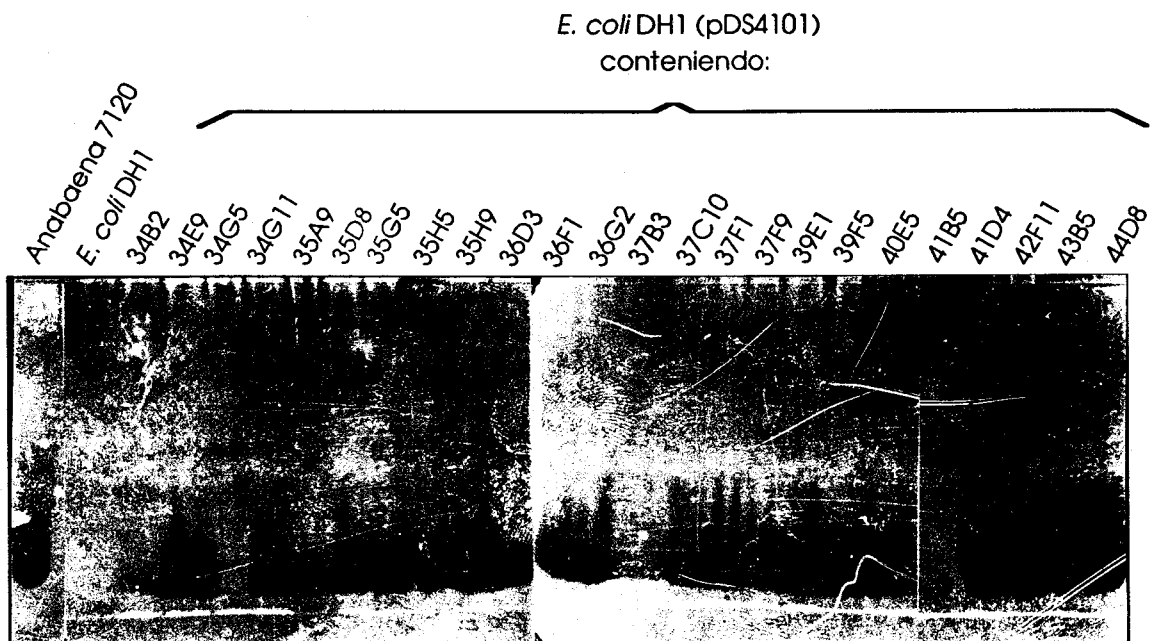
Previamente se había ensayado la presencia en dicha genoteca de clones que produjeran elevada actividad nucleasa. Para ello, células de cada uno de los 1056 clones de que consta la genoteca se incubaron en placas de Petri conteniendo medio de cultivo suplementado con un sustrato para el ensayo de actividad nucleasa (ADN acomplejado con verde de metilo) (ver Materiales y Métodos, aptdo. 2.2.2.1.3). De esta forma se habían identificado 24 clones cuya actividad nucleasa era superior a la de las células control, *E. coli* DH1 sin cósmido, y a la de los demás clones de la genoteca (C. P. Wolk, comunicación personal). [La estirpe DH1, al igual que la estirpe DH5 $\alpha$ , utilizada más adelante como hospedador de plásmidos conteniendo el gen codificador de la nucleasa de 29 kDa, es mutante en el gen *endA*, por lo que no contiene

la endonucleasa periplásmica de *Escherichia coli* (Hanahan, 1983).] Los clones con actividad nucleasa inicialmente identificados correspondían a los números de la genoteca 34B2, 34E9, 34G5, 34G11, 35A9, 35D8, 35G5, 35H5, 35H9, 36D3, 36F1, 36G2, 37B3, 37C10, 37F1, 37F9, 39E1, 39F5, 40E5, 41B5, 41D4, 42F11, 43B5 y 44D8.

Se procedió a determinar si alguno de los cósmidos que conferían elevada actividad nucleasa a *E. coli* contenía un fragmento de ADN que codificara para la nucleasa de 29 kDa, empleando para ello el ensayo en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN. El resultado obtenido se muestra en la figura 8. La estirpe de *E. coli* DH1 sin cósmido no presentaba actividad nucleasa detectable en este ensayo, mientras que 22 de los 24 clones mencionados más arriba (todos excepto los números 34G5 y 41B5) mostraban una actividad nucleasa correspondiente a una proteína de un peso molecular similar al de la nucleasa de *Anabaena* 7120, incluida en la misma electroforesis como control, debiendo contener, por tanto, cósmidos que codificaran para una nucleasa de 29 kDa. La actividad encontrada en los clones 34B2 y 37B3 era considerablemente menor a la del resto de los clones. El análisis de restricción del ADN plasmídico aislado a partir de células conteniendo cada uno de los 22 cósmidos permitió identificar algunos fragmentos comunes (que no correspondían al vector pRL25C ni al plásmido auxiliar pDS4101 presente en todos los clones de la genoteca), si bien el patrón de restricción observado era diferente en todos los cósmidos. Uno de estos cósmidos, el nº 35G5, se escogió para llevar a cabo la subclonación del gen de la nucleasa de 29 kDa.

### 3.2.2. Subclonación del gen *nuca* a partir del cósmido 35G5.

La genoteca de *Anabaena* sp. PCC 7120 utilizada se había construido con el objeto de clonar genes mediante complementación de mutantes. Por este motivo, todos los clones contenían, además del cósmido correspondiente, un plásmido auxiliar, pDS4101 (ColK::Tn1), que aporta el producto del gen *mob*, requerido para la transferencia del cósmido a *Anabaena* mediante conjugación. Con objeto de poder disponer de ADN del cósmido escogido (nº 35G5) libre de ADN del plásmido auxiliar, se transfirió el cósmido a la estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$ .



**Fig. 8.** Actividad nucleasa en diversos clones de la genoteca de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se muestra el ensayo de actividad nucleasa en geles de SDS-poliacrilamida de los 24 clones de la genoteca de *Anabaena* sp. PCC 7120 inicialmente identificados como productores de nucleasa. Como controles se incluyeron células de *E. coli* DH1 sin ningún cósmido y una muestra de extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120. Las muestras de *E. coli* consistían en 2  $\mu$ l de suspensiones celulares conteniendo las células presentes en 150  $\mu$ l de cultivo saturado.

mediante transformación seleccionando resistencia a kanamicina, el marcador del vector pRL25C. La presencia del cósmido 35G5 confería a las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadoras del mismo la capacidad de producción de la nucleasa de 29 kDa, según el ensayo en geles de SDS-poliacrilamida.

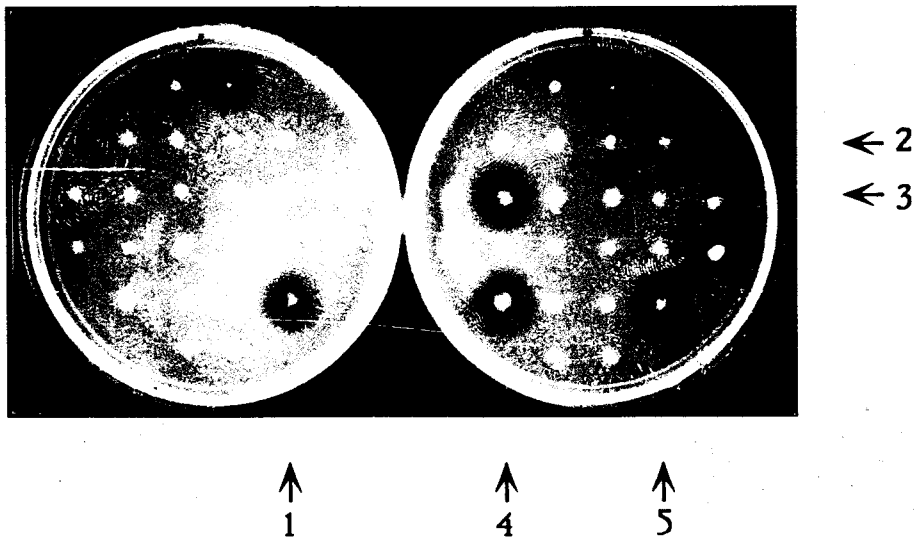
Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo el cósmido 35G5 presentaban, tanto en medio líquido como en medio sólido, un crecimiento lento en presencia de kanamicina. Al sembrar células que inicialmente contenían el cósmido 35G5 en medio sólido conteniendo kanamicina, se observaba, con cierta frecuencia, la aparición de colonias de crecimiento rápido y aspecto opaco, mientras que el resto de las colonias presentaban crecimiento lento y aspecto transparente. El análisis de los plásmidos contenidos en las colonias de crecimiento rápido reveló que se trataba de diversas versiones delecionadas del cósmido 35G5, que, por otro lado, ya no conferían la capacidad de producción de actividad nucleasa a estas células. Las colonias de crecimiento lento presentaban cósmidos de alto peso molecular que sí conferían la capacidad de producción de actividad nucleasa. La aparición en un cultivo líquido de células portadoras de cósmidos delecionados, con una velocidad de crecimiento mayor que la de las células portadoras del cósmido intacto, tenía como consecuencia una presencia mínima o prácticamente nula de células portadoras de cósmido intacto en los cultivos saturados. Debido a esta contingencia, la subclonación del fragmento conteniendo el gen de la nucleasa de 29 kDa se llevó a cabo a partir de ADN aislado de cultivos no saturados de *E. coli* que presentaban crecimiento lento y en los que previamente se había comprobado que no existían versiones delecionadas del cósmido.

Para proceder a la subclonación del gen codificador de la nucleasa de 29 kDa, se llevó a cabo una restricción parcial de ADN del cósmido 35G5 con la endonucleasa *Sau3A* I. Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa, aislándose a continuación fragmentos con un tamaño comprendido entre 5 y 10 kb. [Aunque teniendo en cuenta el peso molecular de la nucleasa (29 kDa) se podrían haber seleccionado fragmentos de menor tamaño, hay un ejemplo en la literatura de una nucleasa de *Bacillus amyloliquefaciens* cuyo efecto letal sobre las células de *E. coli* hace inviable la clonación del gen que codifica dicha nucleasa en ausencia de un fragmento de ADN que codifica para un inhibidor específico de la misma (Hartley,

1988). Considerando la posibilidad de que se requiriera un fragmento contiguo al gen de la nucleasa, la subclonación se inició con fragmentos de ADN de más de 5 kb]. Los fragmentos aislados se clonaron en el vector de selección positiva pRL500 (Elhai y Wolk, 1988a) digerido con *Bam*H I, obteniéndose tras transformación un total de 80 colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contenían plásmidos portadores de diversos fragmentos del cósmido 35G5. Se ensayó la producción de nucleasas por parte de estas colonias, utilizando para ello un ensayo en cajas de medio de cultivo LA suplementado con ADN de esperma de arenque y MgCl<sub>2</sub> (ver Materiales y Métodos, aptdo 2.2.2.1.3) puesto a punto en el transcurso de este trabajo. Para ello, células de cada una de las colonias a ensayar se transfirieron a cajas del medio mencionado y se incubaron a 37°C durante 24 horas para permitir su crecimiento. Posteriormente, se vertió sobre la caja una disolución de bromuro de etidio (1  $\mu$ g/ml en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5) y se fotografió la misma tras excitación con luz ultravioleta. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9A. Se obtuvieron un total de 5 colonias que presentaban actividad nucleasa (numeradas 1-5 en la figura 9A), una de las cuales, la número 2, presentaba una actividad débil comparada con la de las cuatro colonias restantes. En estas cinco colonias se ensayó la producción de la nucleasa de 29 kDa mediante el ensayo en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN. Considerando el fenómeno de inestabilidad observado con el cósmido 35G5, se ensayaron dos colonias independientes obtenidas a partir de cada uno de los cinco clones seleccionados. Como se muestra en la figura 9B, todas las colonias ensayadas eran portadoras de fragmentos de ADN que codificaban para una nucleasa de 29 kDa. Nuevamente, la actividad de las células del subclón número 2 resultó ser inferior a la de los otros cuatro subclones.

Se realizó un mapeo inicial de los insertos de ADN de *Anabaena* presentes en los cinco subclones seleccionados con las enzimas *Bam*H I y *Hind* III. El inserto del subclón número 1 resultó ser igual al del subclón número 3, mientras que el del número 4 era igual al del número 5. Así pues, disponíamos únicamente de tres insertos diferentes, los contenidos en los subclones 1 (que denominamos pRLA1), 2 (que denominamos pRLA2 y que corresponde al subclón con débil actividad nucleasa mencionado anteriormente) y 4 (que denominamos pRLA3). La digestión de los plásmidos pRLA1, pRLA2 y

A

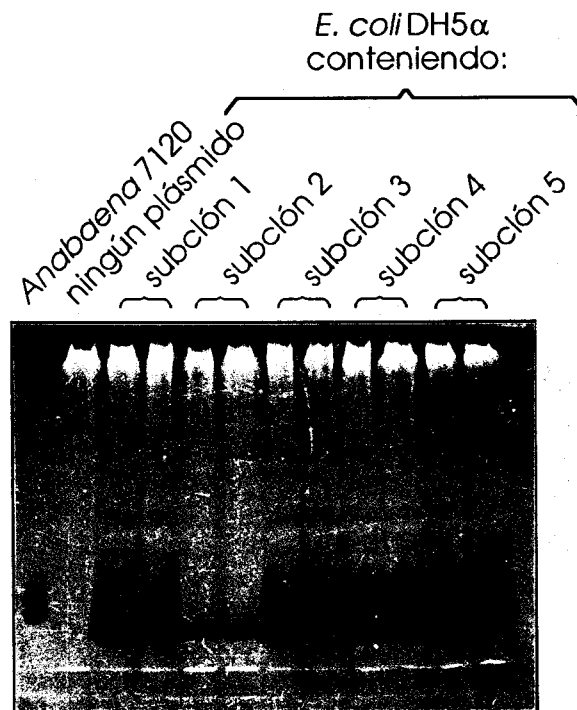


**Fig. 9. Actividad nucleasa de células de *E. coli* conteniendo fragmentos de ADN procedentes del cósmido 35G5.**

ADN del cósmido 35G5 se digirió parcialmente con *Sau3A* I y los productos de la digestión se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa. Se seleccionaron fragmentos de ADN de un tamaño entre 5 y 10 kb, los cuales se aislaron mediante unión a papel de DEAE-celulosa. Dichos fragmentos se ligaron al vector de selección positiva pRL500 digerido con *BamH* I y los productos de la ligación se introdujeron en *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante transformación. Se obtuvieron 80 colonias resistentes a ampicilina (resistencia codificada por pRL500) y se ensayó la actividad nucleasa de dichas colonias.

(A) Ensayo de actividad nucleasa en cajas de medio LA conteniendo ADN y MgCl<sub>2</sub> (ver Materiales y Métodos) de las colonias portadoras de fragmentos del cósmido 35G5. Como controles se incluyeron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  sin ningún plásmido (arriba a la izquierda en ambas cajas) y células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo el cósmido 35G5 (arriba a la derecha en ambas cajas). Los números 1-5 indican las colonias productoras de nucleasa identificadas. Únicamente se muestran las cajas que contenían colonias con actividad nucleasa.

B



**Fig. 9. (cont.)**

(B) Ensayo de actividad nucleasa en geles de SDS-poliacrilamida de células conteniendo cada uno de los cinco subclones seleccionados tras el ensayo mostrado en (A). 50  $\mu$ l de cultivos saturados de *E. coli* DH5 $\alpha$  de cada uno de los subclones se centrifugaron y la actividad nucleasa de las células se ensayó como se indica en Materiales y Métodos. Como control se incluyó una muestra idénticamente preparada de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  sin ningún plásmido y una muestra de cultivo de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se ensayaron dos colonias independientes de cada subclón.



pRLA3 con la enzima *EcoR* I, para la que no hay sitios de corte en los insertos de dichos plásmidos, pero sí en el vector, permitió hacer una estimación de los tamaños aproximados de dichos insertos. El inserto de pRLA1 (aproximadamente 15 kb) era de un tamaño mayor al esperado considerando que se habían clonado fragmentos de 5-10 kb, pudiendo por tanto corresponder a la clonación de dos fragmentos independientes de ADN de *Anabaena* en una sola molécula de vector. Dado que este hecho podría dificultar la búsqueda de regiones comunes a los tres insertos, sólo se llevó a cabo un mapeo exhaustivo de los insertos de ADN de *Anabaena* contenidos en pRLA2 (aproximadamente 10 kb) y pRLA3 (aproximadamente 8 kb). El mapa de restricción de la región de ADN contenida en ambos insertos se muestra en la figura 10. Como se observa, existe una región de aproximadamente 6,3 kb común a los dos insertos, en la que presumiblemente debía encontrarse el gen que codificaría para la nucleasa de 29 kDa. Los plásmidos pRLA2 y pRLA3 resultaron ser estables en *E. coli*, a diferencia de lo que ocurría con el cósmido 35G5.

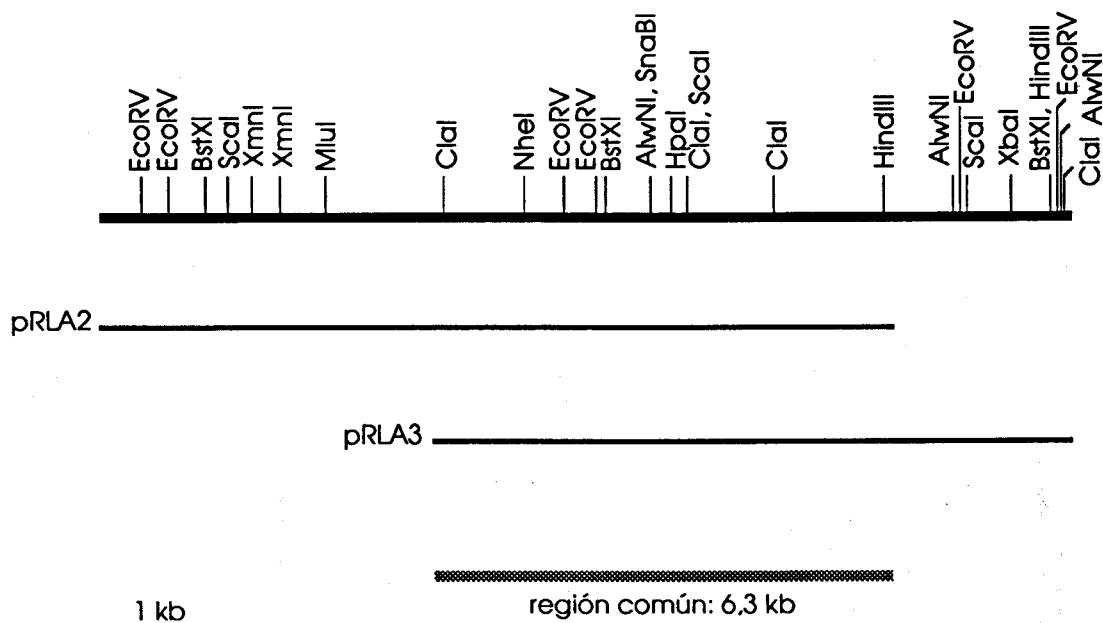
### 3.2.3. Localización del gen de la nucleasa de 29 kDa en la región de ADN clonada.

En este subapartado se describe la localización del gen *nucA*, que codifica la nucleasa de 29 kDa, en el fragmento de ADN clonado. Para ello, se llevó a cabo una doble estrategia que implicaba, por un lado, la mutagénesis del fragmento con un transposón defectivo y, por otro, la obtención, mediante subclonación, de fragmentos menores que permitieran la expresión de la nucleasa de 29 kDa en *E. coli*.

#### 3.2.3.1. Mutagénesis con un transposón defectivo.

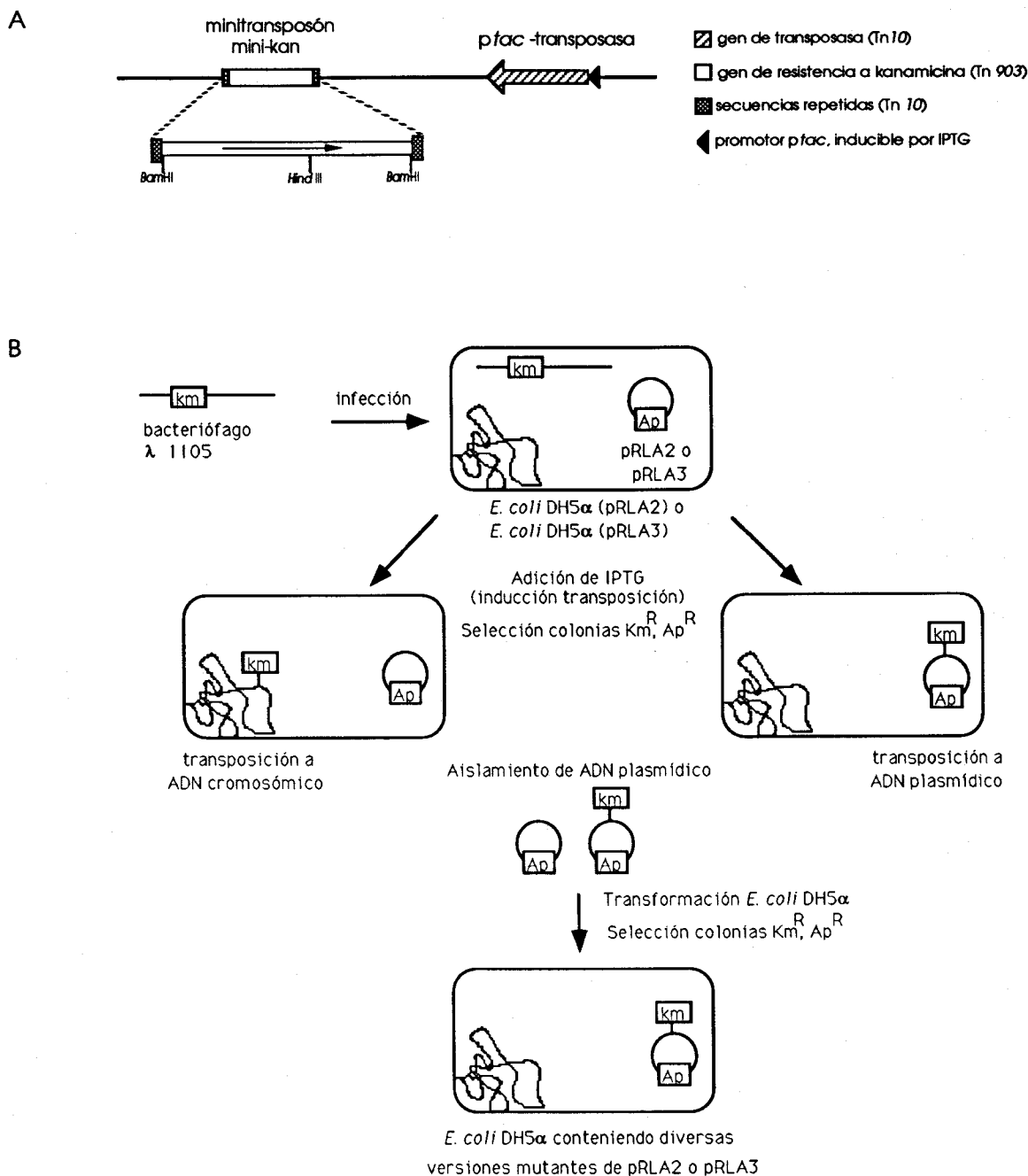
Se procedió a localizar el gen de la nucleasa en la región de ADN clonada mediante mutagénesis insercional de los fragmentos de ADN de *Anabaena* contenidos en pRLA2 y pRLA3, utilizando para ello un sistema que implica un transposón defectivo, *ptac*-transposasa *mini-kan* (Way *et al.*, 1984). El procedimiento utilizado se describe en Materiales y Métodos (aptdo. 2.4.7) y se resume en la figura 11.

Tras la infección y la inducción se seleccionaron células resistentes a altos niveles de kanamicina (500 µg/ml). En estas células,



**Fig. 10.** Mapa de restricción de la región de ADN de *Anabaena* contenida en pRLA2 y pRLA3.

Se muestran los insertos de los plásmidos pRLA2 y pRLA3 así como la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 definida por ambos. Se indica asimismo la región de ADN común a los dos insertos (aproximadamente 6,3 kb). No se encontraron dianas para las siguientes enzimas de restricción: *Apa* I, *Ava* II, *Bam*H I, *Bgl* II, *Bst*E II, *Dra* III, *Eco*R I, *Kpn* I, *Nar* I, *Nco* I, *Nde* I, *Not* I, *Nru* I, *Pml* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Sac* I, *Sal* I, *Sma* I, *Spe* I, *Stu* I y *Xho* I.



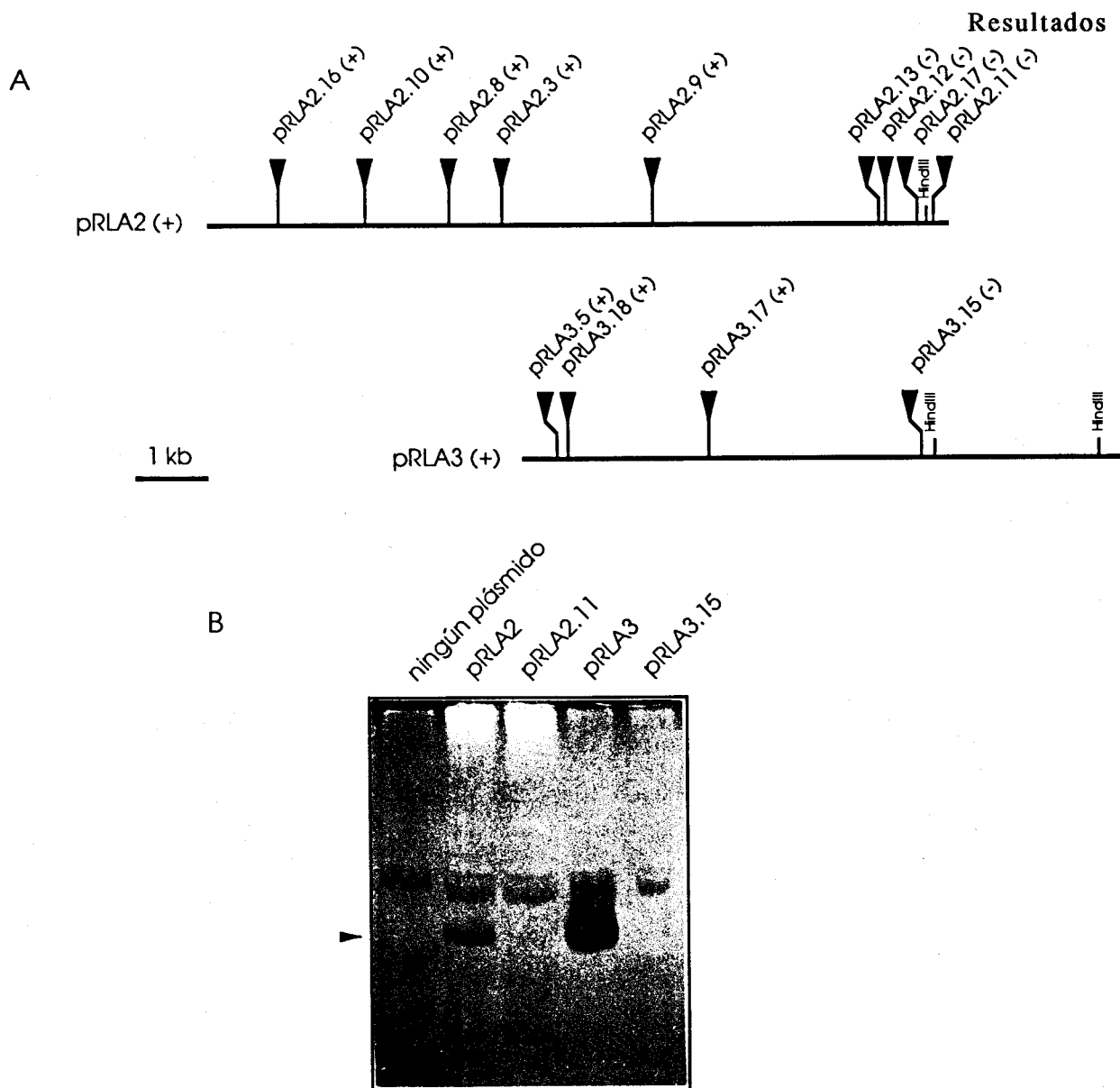
**Fig. 11. Mutagénesis de los plásmidos pRLA2 y pRLA3 con pTAC-transposasa mini-kan.**

(A) Esquema de los elementos contenidos en el derivado del fago  $\lambda$ ,  $\lambda$ 1105.  
 (B) Esquema del procedimiento seguido para la obtención de plásmidos mutagenizados (ver aptdo. 2.4.7.). Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pRLA2) o *E. coli* DH5 $\alpha$  (pRLA3) se infectaron con el fago  $\lambda$ 1105. Tras la infección de las células, la adición de IPTG inducía la transcripción del gen de la transposasa de Tn10, que llevaba a cabo la transposición del minitransposon mini-kan a otras moléculas de ADN (cromosoma de *E. coli* o plásmidos contenidos en la misma). Los plásmidos aislados de células en las que había tenido lugar la transposición se introdujeron en *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante transformación y se seleccionaron transformantes resistentes a kanamicina y ampicilina.

el gen de resistencia a kanamicina del minitransposón tendría un alto nivel de expresión, bien por estar integrado en una zona del cromosoma de *E. coli* activamente transcrita o por estar integrado en un plásmido. Para seleccionar estos últimos fenómenos de transposición, se aisló ADN plasmídico de las células resistentes a altos niveles de kanamicina, con el que se transformaron nuevas células de *E. coli*, seleccionándose de nuevo células resistentes a kanamicina. Estas células contendrían plásmidos mutagenizados en los que el minitransposón se habría insertado en diversas localizaciones. El minitransposón insertado en estos plásmidos no sufre transposiciones secundarias, dado que no cuenta con el gen codificador de la transposasa.

Se ensayó la actividad nucleasa en cajas de medio LA conteniendo ADN y  $MgCl_2$ , de colonias de las células portadoras de plásmidos mutagenizados, y se identificaron una serie de clones que habían perdido dicha actividad, presumiblemente como resultado de la inserción del minitransposon en el gen de la nucleasa. Se determinó entonces la localización del minitransposón en los plásmidos aislados a partir de dichas colonias, que indicaría la localización aproximada del gen de la nucleasa. Asimismo, se determinó la localización del minitransposón en una serie de colonias que seguían presentando actividad nucleasa, con objeto de definir zonas de la región de ADN clonada que no fueran requeridas para la expresión de la misma. En ambos casos la localización se llevó a cabo mediante el análisis del patrón de restricción de los plásmidos mutagenizados, haciendo uso de diversas enzimas para las que había sitios de corte tanto en el plásmido como en el minitransposón. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12A. Como se observa, las inserciones del transposón que resultaban en la pérdida de actividad nucleasa (las contenidas en pRLA2.11, pRLA2.12, pRLA2.13, pRLA2.17 y pRLA3.15) se localizaban en una zona de la región común a los insertos de pRLA2 y pRLA3.

Cabía la posibilidad de que la ausencia de actividad nucleasa en el ensayo de células intactas (LA + ADN) en los clones mutagenizados se debiera a una deficiente excreción de la nucleasa y no a una mutación en la misma. Para averiguar si ésto estaba ocurriendo, se llevó a cabo el ensayo de actividad nucleasa en geles de SDS-poliacrilamida (que implica la lisis de las células mediante hervido en



**Fig. 12. Localización de diversas inserciones del transposón *mini-kan* en los plásmidos pRLA2 y pRLA3, junto con el fenotipo nucleasa positivo o nucleasa negativo de los plásmidos conteniendo dichas inserciones.**

(A) Se muestra la localización aproximada de diversas inserciones del minitransposón en los insertos de pRLA2 y pRLA3. Asimismo, se indican los nombres asignados a los plásmidos que contienen cada una de las inserciones, junto con el fenotipo nucleasa positivo (+) o nucleasa negativo (-) de los mismos según el ensayo en cajas de medio LA + ADN. La localización de las inserciones se llevó a cabo realizando un mapa de restricción de cada uno de los plásmidos portadores de inserciones.

(B) Ensayo de actividad DNasa en geles de SDS-poliacrilamida de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo pRLA2, pRLA3 o uno de dos plásmidos derivados de los mismos (pRLA2.11 y pRLA3.15, respectivamente). Como control, se incluyeron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  sin plásmido. Las muestras contenían 5  $\mu$ l de cultivo saturado, excepto en el caso de pRLA2 y pRLA2.11 (células procedentes de 50  $\mu$ l de cultivo saturado resuspendidas en 5  $\mu$ l del mismo cultivo). La flecha señala la nucleasa de 29 kDa. La banda de actividad de tamaño superior corresponde a una nucleasa propia de *E. coli*.

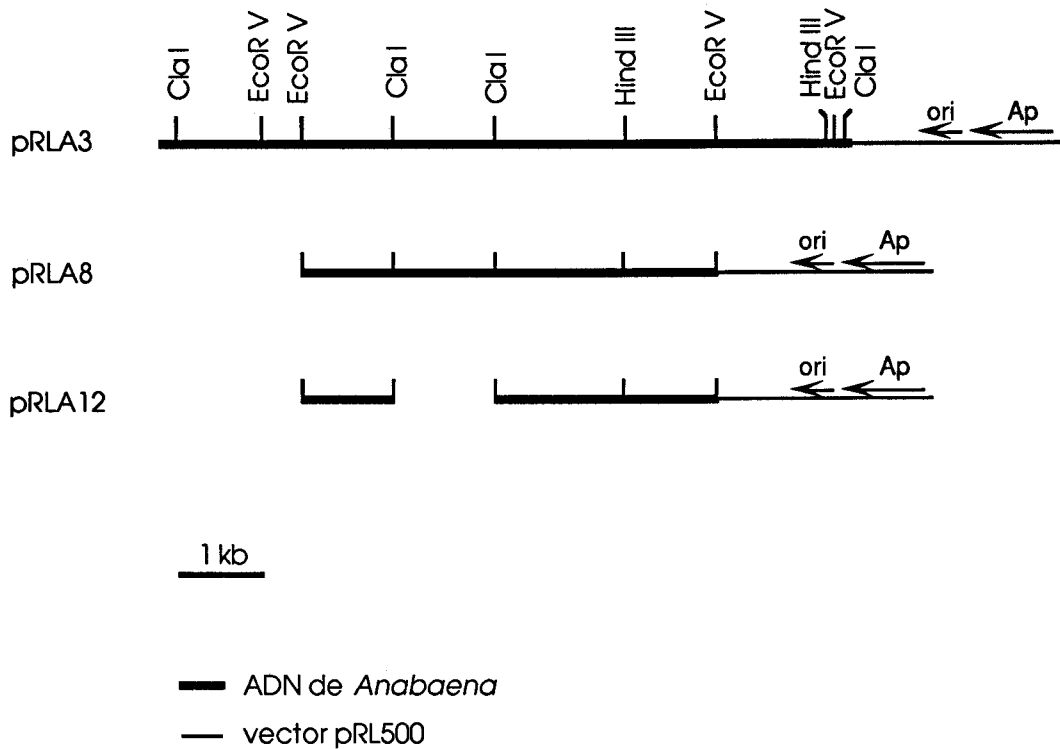
presencia de SDS) en algunos clones portadores de plásmidos mutagenizados, en concreto pRLA2.11 (derivado de pRLA2) y pRLA3.15 (derivado de pRLA3). Como se muestra en la figura 12B, las células conteniendo dichos plásmidos carecían por completo de la actividad de la nucleasa de 29 kDa, corroborándose por tanto que la zona identificada correspondía al gen de dicha nucleasa.

### 3.2.3.2. Subclonación.

Para subclonar el gen de la nucleasa de 29 kDa se escogió el inserto contenido en pRLA3, dado que la región que presuntamente contenía dicho gen se localizaba en un extremo de pRLA2 (ver figura 12A), siendo posible, por lo tanto, que pRLA2 no contuviera parte del gen o del promotor, como de hecho sugería la observación de que la actividad nucleasa que confería pRLA2 era menor que la conferida por pRLA3.

Los subclones construidos se muestran en la figura 13. En primer lugar se subclonó el fragmento *EcoR* V de 5 kb de pRLA3 en el vector pRL500, obteniéndose pRLA8, un plásmido que confería actividad nucleasa. Para reducir el inserto de ADN de *Anabaena*, se delecionó el fragmento *Cla* I de 1,2 kb de pRLA8 y se religó el fragmento restante obteniéndose pRLA12, un plásmido que también confería actividad nucleasa y que contenía dos fragmentos discontinuos de ADN de *Anabaena*. Estas construcciones, junto con el fenotipo de los plásmidos conteniendo inserciones que se muestran en la figura 12, permitieron identificar tentativamente el fragmento *Cla* I-*EcoR* V de 2,7 kb de pRLA12 (que contiene el único sitio *Hind* III del inserto de pRLA2) como suficiente para la expresión de la nucleasa de 29 kDa.

Los plásmidos pRLA8 y pRLA12 contienen el vector pRL500 y por lo tanto un origen de replicación procedente del plásmido pBR322 (Bolívar *et al.*, 1977), lo que mantiene el número de copias por célula en torno a 10-15. En este número de copias, la presencia de los plásmidos pRLA8 y pRLA12 no afectaba de forma apreciable al crecimiento de las células de *E. coli* portadoras.



**Fig. 13. Subclonación del gen *nuca*. Construcción de pRLA8 y pRLA12.**

Se muestran los plásmidos pRLA8 y pRLA12, así como pRLA3, del que derivan. Para construir pRLA8, el fragmento *EcoR V* de 5 kb de pRLA3 se clonó en el vector de selección positiva pRL500 digerido con *Hinc II*. Para obtener pRLA12, se digirió con *Cla I* el plásmido pRLA8, y se aisló y religó el fragmento mayor producto de la digestión (que contenía el vector y dos fragmentos discontinuos de ADN de *Anabaena*). Los tres plásmidos que se muestran conferían actividad nucleasa. Abreviaturas: Ap, gen de resistencia a la ampicilina ( $\beta$ -lactamasa); ori, origen de replicación del vector pRL500.

### 3.3. SECUENCIACION DE LA REGION DE ADN QUE CONTIENE EL GEN *nucA*. ANALISIS DE LAS PAUTAS DE LECTURA ABIERTA Y COMPARACION CON BANCOS DE DATOS.

En este apartado se describe la secuenciación de la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 en la que se localiza el gen *nucA*, que codifica la nucleasa de 29 kDa, así como el análisis de la secuencia de la proteína NucA y de los polipéptidos derivados de otras dos pautas de lectura abierta encontradas.

#### 3.3.1. Obtención de los clones a secuenciar.

##### 3.3.1.1. Clonación de la región de ADN necesaria para la expresión de la nucleasa de 29 kDa en plásmidos de alto número de copias.

Para secuenciar la región *Cla* I-*Eco*R V de 2,75 kb de pRLA12 en la que tentativamente se había localizado el gen de la nucleasa de 29 kDa (ver figura 13), se intentó clonar dicho fragmento en vectores de la serie pUC (Yanish-Perron *et al.*, 1985), que presentan un alto número de copias y contienen una secuencia complementaria del cebador ("M13/pUC universal sequencing primer -20") que se usaría posteriormente para obtener la secuencia de la región. La clonación del fragmento de 2,75 kb en vectores de la serie pUC resultó ser inviable. Los plásmidos obtenidos eran inestables y se producían reordenaciones que llevaban a la pérdida de la región de ADN de *Anabaena*. Así pues, se clonó el fragmento *Eco*R V de 5 kb, que contiene al fragmento *Cla* I-*Eco*R V anteriormente mencionado (ver pRLA8 en figura 13), en el vector pUC18. El plásmido obtenido, que denominamos pCSAM4, confería actividad nucleasa a las células de *E. coli* según el ensayo en cajas de LA + ADN, pero el aislamiento de ADN a partir de estas células resultaba muy difícil. Tanto cuando se extraía ADN plasmídico mediante el procedimiento de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979; ver Materiales y Métodos) como cuando se extraía por el procedimiento de hervido en presencia de Tritón X-100 (Holmes y Quigley, 1981; ver Materiales y Métodos), se obtenía una elevada contaminación con fragmentos de ADN cromosómico de *E. coli*. Además, en el caso de la lisis alcalina, el ADN plasmídico aparecía casi

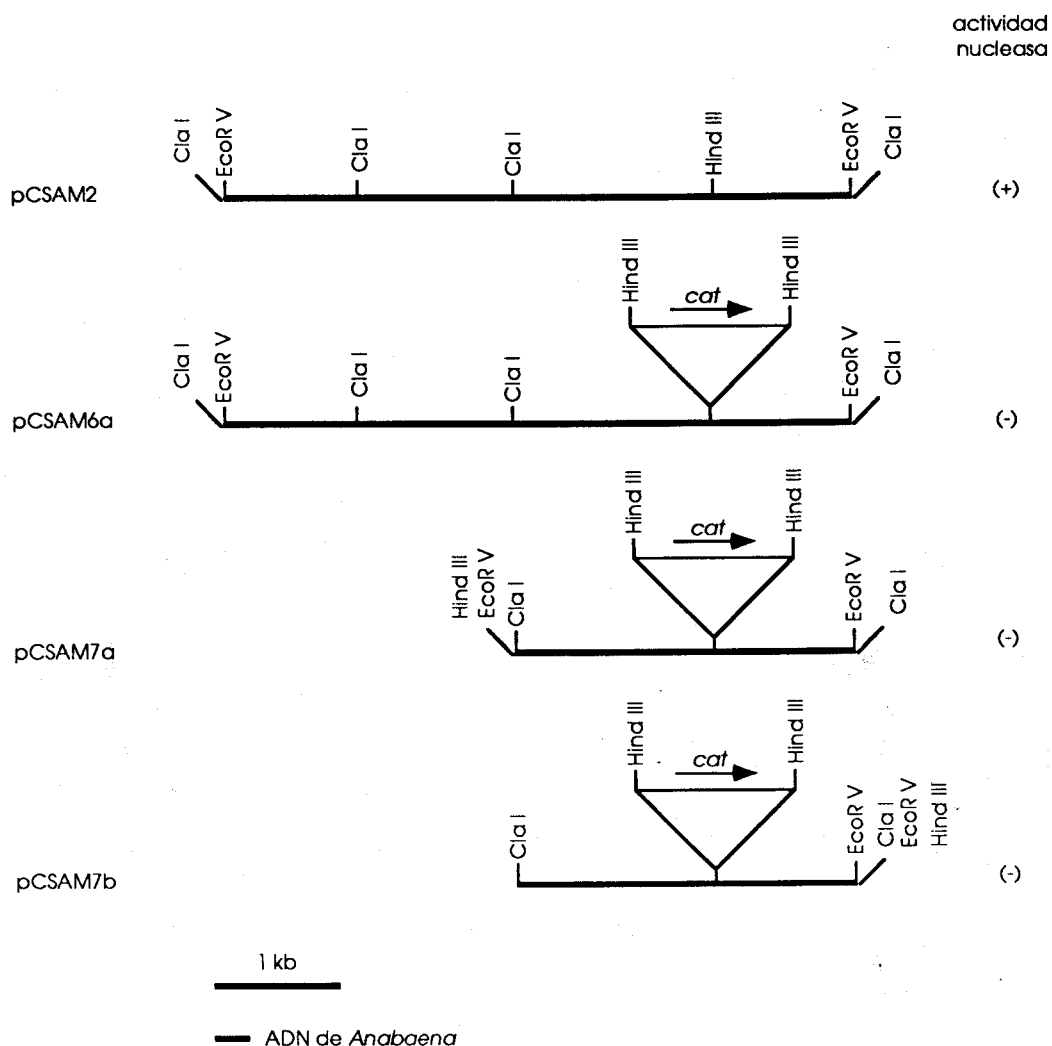


completamente degradado. Este efecto se debía presumiblemente a la presencia de una elevada actividad nucleasa en las células, al encontrarse el plásmido que contenía el gen de la nucleasa en alto número de copias.

Dado que no se podían obtener buenas preparaciones de ADN a partir de los clones que contenían intacto el gen de la nucleasa en vectores de alto número de copias, se decidió secuenciar fragmentos de dicho gen que no confirieran actividad nucleasa. El fenotipo nucleasa negativo de los plásmidos pRLA2.11 y pRLA3.15 (ver figura 12) permitía suponer que el sitio *Hind* III situado entre las inserciones del minitransposón contenidas en dichos plásmidos estaba localizado en el gen de la nucleasa. Dicho sitio *Hind* III permitiría la clonación del fragmento *Cla* I-*Eco*R V de 2,75 kb en dos fragmentos de 1,65 y 1,1 kb (*Cla* I-*Hind* III y *Hind* III-*Eco*R V, respectivamente). Para clonar estos fragmentos se procedió a inactivar el gen *nuca* mediante la integración en dicho sitio *Hind* III del gen *cat* (cloranfenicol acetil transferasa) de pBR325 (Bolívar, 1978), que confiere resistencia al cloranfenicol, obteniéndose así el plásmido pCSAM6 cuya construcción se describe en la figura 14. La inserción del gen *cat* se llevó a cabo en ambas orientaciones y en ambos casos resultaba en la pérdida de actividad nucleasa. Esta región del ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120, interrumpida por el gen *cat*, se subclonó como se indica en la figura 14 para obtener pCSAM7.

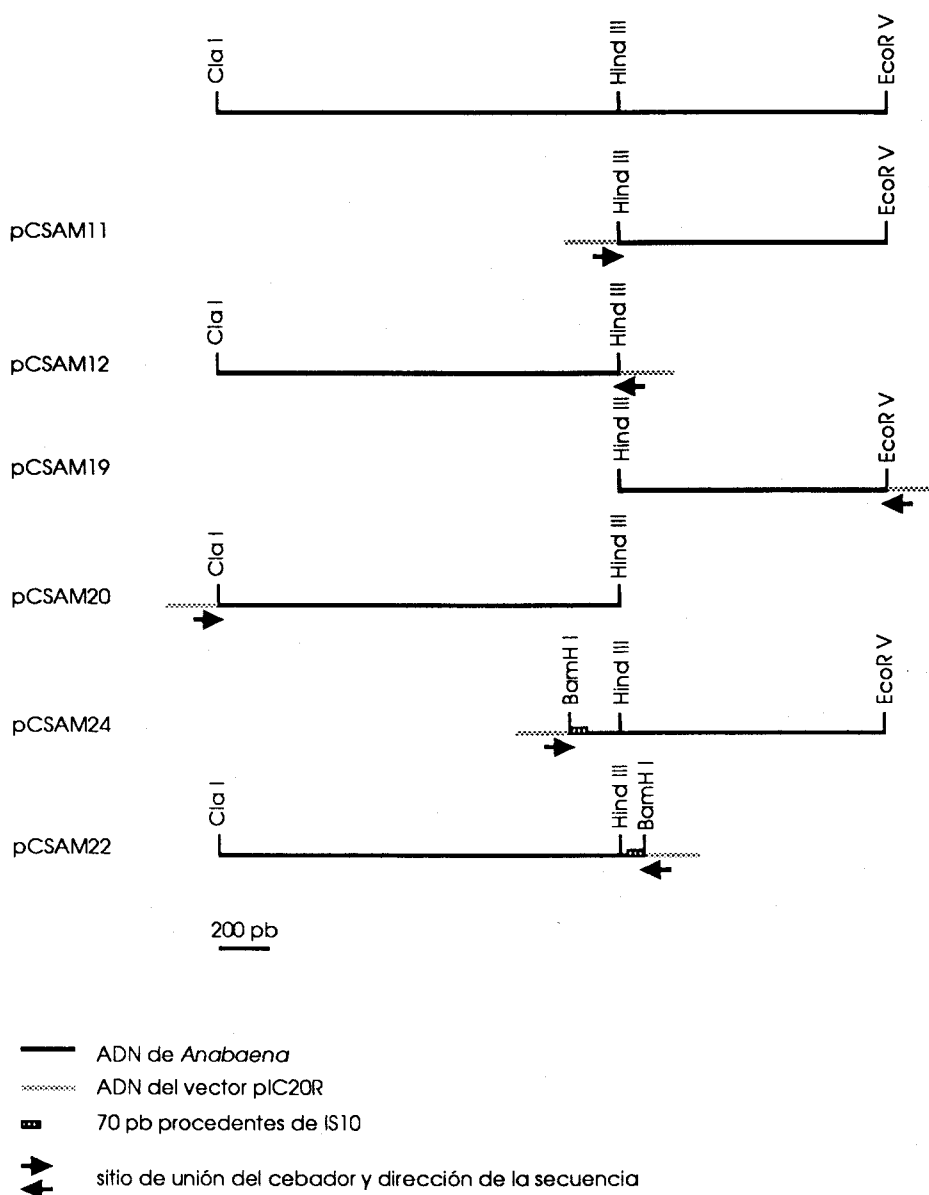
La construcción de los plásmidos pCSAM11 y pCSAM12, que contienen los dos fragmentos (*Cla* I-*Hind* III y *Hind* III-*Eco*R V) que cubren la región *Cla* I-*Eco*R V de 2,75 kb, se llevó a cabo a partir de pCSAM7a o pCSAM7b y se describe en la figura 15. Ambos plásmidos contienen el vector pIC20R, derivado de pUC19, que contiene la secuencia complementaria del cebador usado posteriormente en los experimentos de secuenciación y contiene asimismo un mayor número de sitios de clonación. Para poder secuenciar las dos cadenas del ADN usando el mismo cebador, los fragmentos de ADN contenidos en pCSAM11 y pCSAM12 se clonaron también en disposición inversa respecto al vector, como se indica en la figura 15. pCSAM19 contiene el inserto de pCSAM11 en disposición inversa, mientras que pCSAM20 contiene el inserto de pCSAM12 en disposición inversa.

Finalmente, cabía la posibilidad de que el sitio *Hind* III que se muestra en la figura 15 no fuera único, es decir, que hubiera otro sitio



**Fig. 14.** Obtención de una versión inactivada del gen *nucaA* y subclonación de la misma.

Para obtener pCSAM2, el fragmento *EcoR* V de 5 kb de pRLA3 (ver figura 13) se clonó en el vector de selección positiva pRL538 (S.A2/L.EBE1, nomenclatura de Elhai y Wolk, 1988a) digerido con *EcoR* V. A continuación, se insertó en ambas orientaciones el gen *cat* [obtenido mediante digestión de pRL479 (S.A2/L.EHE2/C.C2, nomenclatura de Elhai y Wolk, 1988a) con *Hind* III] en el sitio *Hind* III de pCSAM2, obteniéndose pCSAM6a y pCSAM6b. Para obtener pCSAM7a y pCSAM7b, el fragmento *Cla* I de 4,1 kb de pCSAM6a (que contenía la región de ADN de *Anabaena* interrumpida por el gen *cat*) se clonó, en ambas orientaciones, en el vector pIC20R (Marsh *et al.*, 1984) digerido con *Cla* I. Se muestran los insertos contenidos en los plásmidos descritos, así como algunos sitios de restricción pertenecientes a los vectores que son relevantes para las construcciones posteriores. Asimismo, se indica el fenotipo nucleasa positivo (+) o nucleasa negativo (-) de cada plásmido.



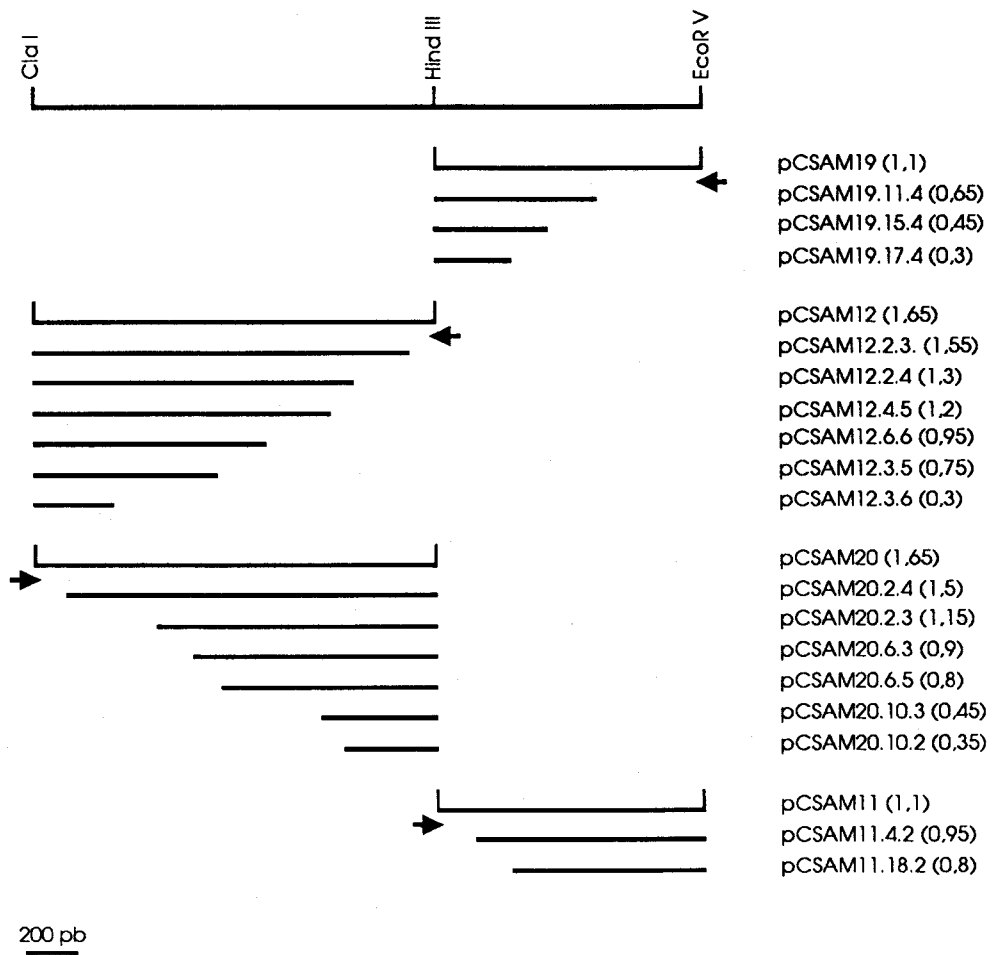
**Fig. 15. Construcción de plásmidos conteniendo fragmentos de la región *Cla* I-*Eco*R V de 2,75 kb.**

Se muestra el fragmento *Cla* I-*Eco*R V de ADN de *Anabaena* de 2,75 kb, así como los insertos contenidos en cada uno de los plásmidos construidos para llevar a cabo la secuenciación del mismo. Para obtener pCSAM11, se digirió pCSAM7a con *Hind* III y el fragmento mayor resultante de la digestión (que contenía el vector pIC20R) se recircularizó mediante ligación. Para obtener pCSAM12 se llevó a cabo idéntico proceso con pCSAM7b. La digestión de pCSAM7a con *Hind* III y *Eco*R V permitía obtener dos fragmentos de ADN de *Anabaena* de 1,1 y 1,65 kb que se clonaron en el vector pIC20R digerido con *Hind* III y *Hinc* II dando lugar a pCSAM19 y pCSAM20, respectivamente. Para construir pCSAM22, el fragmento *Cla* I-*Bam*H I de pRLA2.11 que contiene el sitio *Hind* III del inserto se clonó en el vector pIC20R digerido con *Cla* I y *Bam*H I. Para construir pCSAM24, el fragmento *Bam*H I-*Eco*R V de pRLA3.15 que contiene el sitio *Hind* III del inserto se clonó en el vector pIC20R digerido con *Bam*H I y *Eco*R V. Nótese que pCSAM22 y pCSAM24 conservan 70 pb procedentes del extremo del transposón mini-kan. La flecha indica el sitio de unión del cebador y la dirección de la secuencia que se obtendría a partir de cada plásmido (ver texto).

*Hind* III a escasa distancia que no se hubiera detectado al analizar los fragmentos de restricción de la región. De ser así, al subclonar los fragmentos *Cla* I-*Hind* III y *Hind* III-*Eco*R V se habría perdido el ADN contenido entre ambos sitios *Hind* III y la secuencia de ADN estaría incompleta. Así pues, se clonaron en pIC20R otros dos fragmentos de ADN que permitieran la lectura en ambas cadenas del sitio *Hind* III y las secuencias contiguas al mismo. Dichos fragmentos se obtuvieron a partir de los plásmidos pRLA2.11 y pRLA3.15, que contenían inserciones del minitransposón mini-*kan* próximas al sitio *Hind* III (ver figura 12), haciendo uso de los sitios *Bam*H I situados a 70 nucleótidos del extremo de dicho minitransposón (ver figura 11A). Se obtuvieron así los plásmidos pCSAM22 y pCSAM24, cuya construcción se describe en la figura 15.

### 3.3.1.2. Obtención de deleciones seriadas.

Dado que el sistema de secuenciación disponible permitía leer como máximo 400-450 nucleótidos de la secuencia de un fragmento de ADN a partir del cebador, se hacía necesaria la obtención de plásmidos conteniendo, próximos al sitio de unión al cebador, fragmentos internos de los insertos de los plásmidos pCSAM11, pCSAM12, pCSAM19 y pCSAM20. Para ello, se procedió a generar deleciones seriadas de los insertos de ADN de *Anabaena* contenidos en estos cuatro plásmidos utilizando la exonucleasa III de *E. coli* (Henikoff, 1984) (ver Materiales y Métodos, apdo 2.4.6.1 y figura 1). El uso de distintos tiempos de digestión con exonucleasa III permite obtener una serie de plásmidos en los que el inserto está delecionado en diverso grado, a partir de los cuales pueden obtenerse fragmentos de la secuencia interna de los insertos originales. En la figura 16 se muestran los insertos de los plásmidos obtenidos mediante deleción de pCSAM11, pCSAM12, pCSAM19 y pCSAM20 con exonucleasa III.



**Fig. 16. Plásmidos conteniendo deleciones seriadas de los insertos de los plásmidos pCSAM11, pCSAM12, pCSAM19 y pCSAM20 obtenidos mediante digestión con exonucleasa III.**

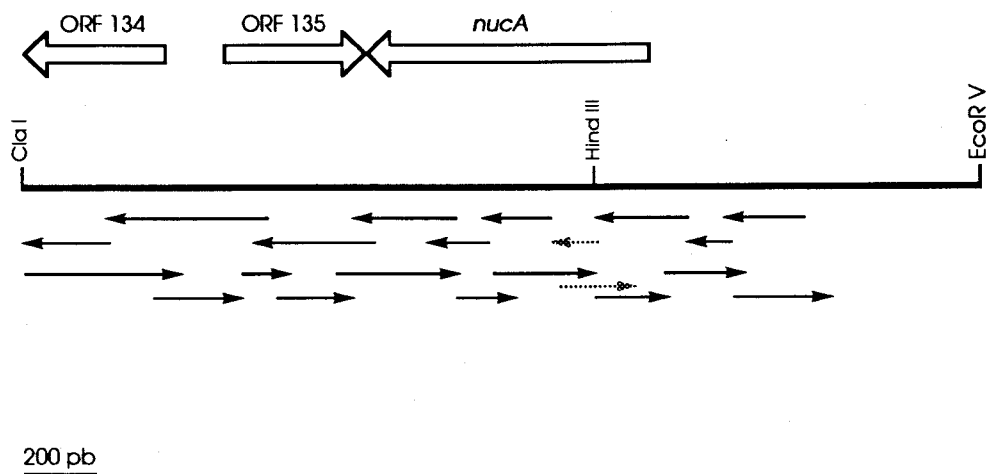
Los insertos de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 contenidos en los cuatro plásmidos mencionados se deleccionaron como se indica en Materiales y Métodos mediante digestión con exonucleasa III seguida de digestión con nucleasa S1. Los fragmentos obtenidos se ligaron a continuación. Se muestran los insertos de los plásmidos deleccionados así como los nombres de los mismos y, entre paréntesis, el tamaño en kb del fragmento de ADN de *Anabaena* contenido en cada uno. Sólo se presentan los plásmidos a partir de los cuales se obtuvieron posteriormente datos de secuencia. La flecha indica la dirección de la secuencia que se obtendría a partir de cada plásmido.

### 3.3.2. Secuenciación. Búsqueda de zonas de lectura abierta y localización precisa de las mutaciones presentes en pRLA2.11 y pRLA3.15.

La secuenciación de la región se llevó a cabo mediante el procedimiento de la terminación de cadenas con didesoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977; ver Materiales y Métodos, aptdo 2.4.6). A partir de los clones mostrados en la figura 16 se obtuvieron fragmentos de secuencia de longitud variable, los cuales se superpusieron para obtener la secuencia lineal completa. La estrategia de secuenciación seguida para ambas cadenas hasta obtener un total de 2.263 nucleótidos secuenciados se muestra en la figura 17. Los plásmidos pCSAM22 y pCSAM24, como ya se ha mencionado, permitieron la lectura de la secuencia que incluye el sitio *Hind* III, que resultó ser único. Además, la secuenciación de los insertos contenidos en estos dos plásmidos permitió determinar el sitio exacto de las inserciones del minitransposón *mini-kan* en pRLA2.11 y pRLA3.15 (ver más adelante), las cuales inactivaban a la nucleasa (ver figura 12).

En la secuencia obtenida se determinaron las posibles zonas de lectura abierta utilizando para ello una aplicación del programa DNA Strider que permite encontrar en una secuencia de ADN tripletes de nucleótidos que corresponden a codones de iniciación y terminación. De esta forma se encontraron tres posibles regiones de lectura abierta u ORFs ("Open Reading Frames") cuya disposición en el fragmento secuenciado se muestra en la figura 17. En la figura 18 se muestra la secuencia de nucleótidos obtenida.

La primera ORF encontrada constaba de 822 nucleótidos y daría lugar a una proteína de 274 aminoácidos con un peso molecular de 29.650 Da y un punto isoeléctrico de 5,88, lo cual está de acuerdo con las determinaciones de tamaño (ver figura 3) y punto isoeléctrico (ver figura 5) que se habían realizado para la nucleasa de *Anabaena*. Por otro lado, esta ORF contenía el sitio *Hind* III y los sitios de inserción del minitransposón *mini-kan* en pRLA2.11 y pRLA3.15. En concreto, la inserción del minitransposón *mini-kan* en pRLA2.11 se localizaba entre los nucleótidos 149-150 (correspondientes al residuo Pro-50), mientras que la inserción en pRLA3.15 se localizaba entre los nucleótidos 278-279 (correspondientes al residuo Arg-93) de esta ORF. Por todo ello, se identificó esta ORF como la correspondiente al



**Fig. 17. Región de ADN de *Anabaena* secuenciada. Estrategia de secuenciación y pautas de lectura abierta.**

Se muestra la región *Cla* I-*Eco*R V de 2,75 kb. Por debajo de la misma, las flechas indican la dirección y extensión de la secuencia determinada a partir de cada uno de los clones utilizados. En negro se indican las correspondientes a los clones que aparecen en la figura 16. Con distinto trazado se muestran las correspondientes a los plásmidos pCSAM22 y pCSAM24. Las flechas por encima indican las tres pautas de lectura abierta encontradas.

```

TAGCAATTTTCTTACTATTCTTACTATATATGGCACACTGAGATGAACGCGAGGGGGATTGCATTGCTTTTGACAAC 79
AAGCAGCGCATGGTATTGAACGGGTGGTGGGTGATAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 158
AGCAGGAATACGGGAAGCAATTGAGTTGGTTAGCCCTTCCGCCAAATTCAGAGCGTTCCGTCGCCGCTCCGGCAGAGA 237
GGAAAGTAGCGGATGACCTACGCTACCCGAAAGAGCGATGGCGTAACGCAAGAGCGTAGCTGATCGTCAGCAACCCCT 316
AATTTTTTAGAGAAAATTAGGGTTGCATCGGCAGGAGACTTGAATAATTTGAAGCCTAGCTGAGTGAAGTCAGGAA 395

Met Gly Ile Cys Gly Lys Leu
ATACAATCACAAAGTGTGAAGTGAATAAATCTCTAAAGGTCGCTCAATTT ATG GGA ATT TGT GGA AAA TTG 467
7
Gly Val Ala Ala Leu Val Ala Leu Ile Val Gly Cys Ser Pro Val Gln Ser Gln Val Pro
GGT GTA GCG GCG TTG GTG GCG TTG ATT GTC GGG TGT TCG CCT GTC CAA TCC CAA GTG CCA 527
27
Pro Leu Thr Glu Leu Ser Pro Ser Ile Ser Val His Leu Leu Leu Gly Asn Pro Ser Gly
CCA TTA ACT GAA CTT TCC CCA TCA ATC AGC GTG CAT TTA CTG CTG GGA AAT CCC AGT GGT 587
47
Ala Thr Pro Thr Lys Leu Thr Pro Asp Asn Tyr Leu Met Val Lys Asn Gln Tyr Ala Leu
GCA ACG CCA ACA AAG CTT ACA CCT GAT AAT TAC CTG ATG GTC AAA AAT CAA TAT GCA CTC 647
67
Ser Tyr Asn Asn Ser Lys Gly Thr Ala Asn Trp Val Ala Trp Gln Leu Asn Ser Ser Trp
TCC TAC AAC AAC ACG AAG GGA ACT GCT AAC TGG GTA GCT TGG CAG CTT AAC TCC TCA TGG 707
87
Leu Gly Asn Ala Glu Arg Gln Asp Asn Phe Arg Pro Asp Lys Thr Leu Pro Ala Gly Trp
CTA GGG AAC GCA GAG CGT CAA GAT AAC TTC CGC CCA GAC AAA ACA TTG CCT GCG GGT TGG 767
107
Val Arg Val Thr Pro Ser Met Tyr Ser Gly Ser Gly Tyr Asp Arg Gly His Ile Ala Pro
GTG CGA GTG ACT CCT TCT ATG TAC TCT GGG AGT GGT TAT GAC CGG GGG CAT ATT GCA CCT 827
127
Ser Ala Asp Arg Thr Lys Thr Thr Glu Asp Asn Ala Ala Thr Phe Leu Met Thr Asn Met
TCA GCA GAC CGC ACC AAG ACA ACA GAA GAT AAT GCG GCT ACT TTC CTG ATG ACA AAC ATG 887
147
Met Pro Gln Thr Pro Asp Asn Asn Arg Asn Thr Trp Gly Asn Leu Glu Asp Tyr Cys Arg
ATG CCC CAA ACA CCC GAT AAC AAT AGA AAT ACG TGG GGA AAT TTA GAA GAT TAT TGT CGA 947
167
Glu Leu Val Ser Gln Gly Lys Glu Leu Tyr Ile Val Ala Gly Pro Asn Gly Ser Leu Gly
GAA TTA GTC AGT CAG GGT AAA GAG CTT TAC ATT GTT GCC GGG CCT AAT GGT AGT CTT GGC 1007
187
Lys Pro Leu Lys Gly Lys Val Thr Val Pro Lys Ser Thr Trp Lys Ile Val Val Glu Leu
AAA CCC CTC AAA GGT AAG GCG ACA GTT CCC AAA TCC ACT TGG AAG ATT GTT GTC GCA CTA 1067
207
Asp Ser Pro Gly Ser Gly Leu Glu Gly Ile Thr Ala Asn Thr Arg Val Ile Ala Val Asn
GAT AGC CCA GGC TCA GGG CTT GAA GGT ATT ACT GCT AAT ACT CGC GTT ATC GCA GTA AAT 1127
227
Ile Pro Asn Asp Pro Glu Leu Asn Asn Asp Trp Arg Ala Tyr Lys Val Ser Val Asp Glu
ATT CCC AAC GAC CCA GAA TTA AAT AAT GAC TGG AGG GCT TAT AAA GTC AGT GTT GAT GAA 1187
247
Leu Glu Ser Leu Thr Gly Tyr Asp Phe Leu Ser Asn Val Ser Pro Asn Ile Gln Thr Ser
TTA GAA AGT TTG ACG GGT TAT GAT TTT TTG TCT AAT GTT TCC CCC AAT ATT CAA ACA AGT 1247
267
Ile Glu Ser Lys Val Asp Asn TER
ATT GAG ACT AAA GTT GAT AAT TAG TAAATAGGTCAGTTTCCACAACCTTTAGTAGAAAATACCAGCTAAATT 1318
274
TCCTGCTGGAGTTCCACCAATAACAATAACATCAAGTTCTACCTCACCCAGTCGATACACCTCGGGTTTTTAAGTTC 1397
GATTTTATTACCTCTAGCAGTTTTGAAATTTAGCAACTACAGCATTCTTCATCCTCATACCAGCTCTGGGGAGTAG 1476
TGGCTCTGCTAAAAAGCTGTCAATCTCTACCACTTTAAAGGGCGCATCTGTCCGTCACCTGTTTGCCTGCAAAATPAT 1555
TTCATGTCAACAGGAGGTGGAGATCTCTCCACAAAAAACCTCAAATGGGTATTCAGACTCACTCAATAACAAG 1635
CCATCGGATGCCGTTTTAGCTGTCTAAATTTCTGAGTTGGTTTTGGTCAATAACCAATAAGAGAGTTATTCATCAA 1713
GTATAAAGTGATTGCTTCTTTATCTGCAATTTTGGTCAGACAACAGAAATTTTGTAAACTTAATTTATTTCAACGGT 1792
ACAAGACAATAAATTAATAAGTGCATTTAAAGTGGTGTAAATATCGGAATTTGGACGCTGCTAAACGCTCGC 1871
TACTCTAAATCCGATCCGTCACCTCAGTCGTTTGGATGATACATCAATACGCATTCCTTTAACAAGTTTTCGATTGGA 1950
ATAGACCCAAATTTGGTTAAATTCAGGTGGTGGTAAATCAAGTACAGCGTTTCAGCTTACATTAATTTTTAG 2029
CTACCCGCTTTGGTATATCAGCCAGATTTATCCAAAATGATTTTTAATGTGGGTTAGAAACATTCCTTTGGGGCTGT 2108
GCCTTTAGTAGAGATTGTGTTGACCTTTCTACAAATCTAATATTCGCAATTTAGCAATTTAGAGAAAACACTTGACA 2187
GTGGTTGAACCAAGATTCAGAAAGTCTGTGATGAACCTTACAAAAACAAGTTAGTCAAGTTTAAAGTGCATCGAT 2263
Cla I

```

**Fig. 18. Secuencia de nucleótidos de la región de ADN de *Anabaena* que contiene el gen *nucA* así como la ORF-134 y la ORF-135, con indicación de posibles señales de transcripción y traducción y de la localización de las mutaciones presentes en pRLA2.11 y pRLA3.15.**

Se muestra la cadena no codificante (del extremo 5' al extremo 3') del gen *nucA* en dirección contraria a la presentada en la figura 17. Se indican los sitios *Hind* III y *Cla* I. Se muestran los aminoácidos correspondientes a la traducción de *nucA*. Las puntas de flecha indican la localización del minitransposón *mini-kan* en pRLA2.11 (Pro-50) y pRLA3.15 (Arg-93). Además, se señalan dos posibles secuencias de unión al ribosoma (subrayadas) y una secuencia al final del gen que podría dar lugar a un lazo en el ARN. ORF-135 y ORF-134, cuya disposición se muestra en la figura 17, se localizaban entre los nucleótidos 1280-1687 y 1849-2253, respectivamente (los codones de iniciación y terminación de cada una aparecen subrayados). La secuencia de los nucleótidos 1-1318 se ha depositado en la "EMBL Data Library" con el número de acceso X64706.



gen que codifica la nucleasa de 29 kDa y se denominó *nucA*. El producto de la traducción del gen *nucA*, que se muestra en la figura 18, se denominó proteína NucA.

Como se indica en la figura 18, el gen *nucA* presenta dos posibles secuencias de unión al ribosoma o secuencias de Shine-Dalgarno (Shine y Dalgarno, 1974). Estas dos secuencias, 5'AAAGG3' y 5'AGGTG3', serían complementarias del extremo 3' del ARN ribosómico 16S, permitiendo la unión al ribosoma del ARN mensajero de *nucA*. En *Anabaena* sp. PCC 7120 la secuencia del extremo 3' del ARN ribosómico 16S es 5'GGAUCACCUCCUUU3' (Ligon *et al.*, 1991). En la figura 18 se indican también una serie de nucleótidos al final del gen *nucA* que permitirían la formación de un lazo en el ARN mensajero. Este lazo implicaría a los últimos nucleótidos del gen *nucA* y los últimos nucleótidos de otra ORF (ORF-135) situada a continuación, pudiendo afectar a la transcripción de ambos. En cuanto a la presencia de posibles secuencias promotoras, se encuentran dos secuencias que podrían ser reconocidas como secuencias -10 (consenso en *E. coli*, 5'TATAAT3') y -35 (consenso en *E. coli*, 5'TTGACA3') (Rosenberg y Court, 1979) para el comienzo de la transcripción de *nucA* en *E. coli*, aunque el espaciamiento entre las mismas no es óptimo. La primera de estas secuencias (5'TACAAT3', posible secuencia -10) comienza 50 nucleótidos antes del inicio de *nucA*. La otra secuencia (5'TTGAAG3', posible secuencia -35) comienza 80 nucleótidos antes del inicio de *nucA*. Como se observa, todos los nucleótidos para los que el consenso de *E. coli* es más estricto (indicados en negrita, según Hawley y McClure, 1983) aparecen en las secuencias que preceden a *nucA*.

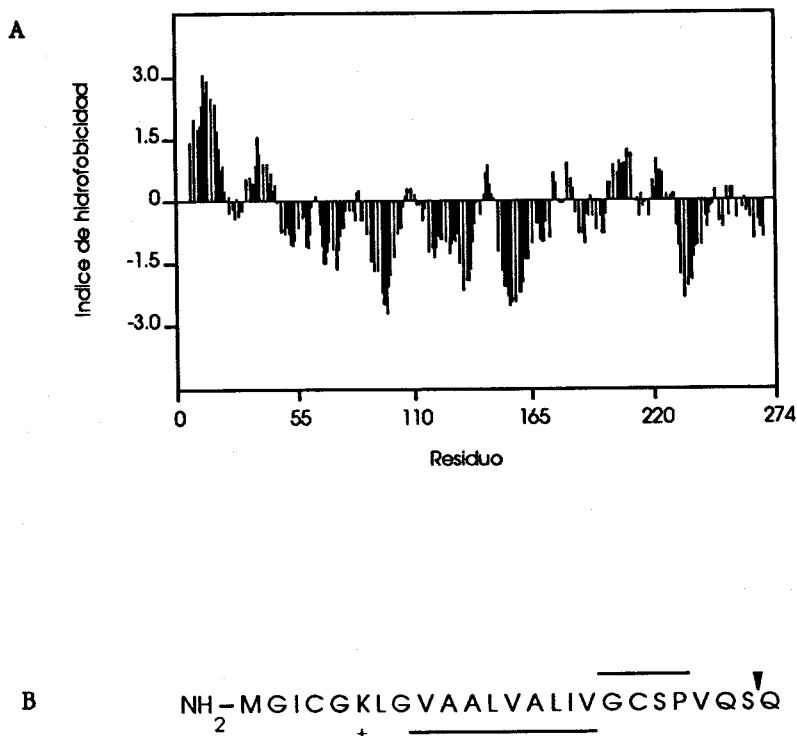
Las otras dos zonas de lectura abierta, cuya disposición respecto a *nucA* se muestra en la figura 17, constaban de 402 y 405 nucleótidos y darían lugar a proteínas de 134 y 135 aminoácidos, por lo que las denominamos ORF-134 y ORF-135, respectivamente. La secuencia de nucleótidos correspondiente a estas dos ORFs se muestra también en la figura 18. ORF-134 presentaba tres codones de metionina (Met-1, Met-20 y Met-74), encontrándose el primero de ellos precedido por una secuencia que podría actuar como sitio de unión al ribosoma (5'GGA3'). ORF-135 presentaba dos posibles codones de iniciación (Met-1 y Met-22), ninguno de los cuales iba precedido de una secuencia de unión al ribosoma identificable. En todo caso, la ausencia de una secuencia de unión al ribosoma reconocible no implica

necesariamente la ausencia de traducción, dado que se han identificado varios genes de *Anabaena* sp. PCC 7120 que carecen de una secuencia de Shine-Dalgarno reconocible (Tandeau de Marsac y Houmard, 1987). La secuencia de aminoácidos derivada de ORF-135 se mostrará más adelante (ver aptdo. 3.6.)

### 3.3.3. Análisis de la proteína NucA. Comparación con bancos de datos.

Se ha mencionado ya que la nucleasa de 29 kDa de *Anabaena* sp. PCC 7120 se podía obtener a partir del medio de cultivo (aptdo. 3.1). Igualmente, dicha nucleasa clonada en *E. coli* era excretada al medio extracelular (ver aptdo. 3.4). Así pues, se procedió a analizar la secuencia de aminoácidos de la proteína NucA para determinar la presencia de secuencias que pudieran dirigir la excreción de la misma al medio extracelular. Las secuencias líder, que dirigen a las proteínas a través de las membranas lipídicas para su exportación a diferentes compartimentos celulares o al medio extracelular, presentan una serie de características comunes. Concretamente, en el caso de la exportación al medio extracelular o al periplasma en bacterias gram-negativas, las secuencias líder presentan en su región amino terminal un aminoácido cargado positivamente, seguido de una serie de aminoácidos hidrofóbicos y, después, de varios aminoácidos hidrofílicos en los que en muchos casos se localiza el sitio de corte de dicha secuencia líder (von Heijne, 1985).

Se determinó la hidrofobicidad media en cada fragmento de 11 aminoácidos de la proteína NucA haciendo uso del algoritmo de Kyte y Doolittle (1982). Tras aplicar dicho algoritmo a todos los residuos de una proteína, los valores por encima de cero corresponden a zonas hidrofóbicas y los valores negativos a zonas hidrofílicas. El resultado obtenido para la proteína NucA se muestra en la figura 19A. Como se observa, la proteína NucA es mayoritariamente hidrofílica, a excepción de una zona hidrofóbica en la región amino terminal. Esta región hidrofóbica podría corresponder a una secuencia líder para el paso de la proteína a través de la membrana plasmática. Los aminoácidos del extremo amino de NucA se muestran en detalle en la figura 19B. Como se observa, la secuencia se ajusta a las características comunes de las secuencias líder. Aparece un aminoácido cargado positivamente (Lys-



**Fig. 19. Hidrofobicidad de la proteína NucA.**

(A) Índice de hidrofobicidad calculado según Kyte y Doolittle (1982). En cada posición, el valor obtenido representa el promedio de hidrofobicidad en un entorno de 11 aminoácidos (5 a la derecha y 5 a la izquierda).

(B) Características de los aminoácidos de la región amino terminal de la proteína NucA. Se indica subrayado un agrupamiento de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica y con una línea por encima un agrupamiento de aminoácidos de naturaleza hidrofílica. También se indica un residuo cargado positivamente (+) cerca del extremo amino de NucA. La flecha señala un sitio probable de procesamiento de la secuencia señal.

6), seguido de una serie de aminoácidos hidrofóbicos (desde Val-9 hasta Val-17) y de una serie de aminoácidos hidrofílicos (desde Gly-18 hasta Pro-21). Se aplicó entonces a la proteína NucA una matriz que permite determinar la presencia de secuencias líder así como los sitios de corte más probables de las mismas (von Heijne, 1986a). La aplicación de esta matriz indicó de hecho la presencia de una secuencia líder cuyo sitio de corte más probable se encuentra situado entre los aminoácidos Ser-24 y Gln-25. Así pues, en base a los datos derivados de la secuencia de NucA, se puede proponer que dicha proteína presenta una secuencia líder de 24 aminoácidos. Sin embargo, se desconoce si esta secuencia líder es efectivamente procesada en la célula.

Finalmente, se buscaron en los bancos de datos disponibles aquellas secuencias que mostraran homología con la proteína NucA. Para ello se utilizó el programa FASTA, que hace uso del algoritmo de Pearson y Lipman (1988) para la comparación de secuencias. La búsqueda se efectuó en la base de datos "EMBL Data Bank" (Heidelberg) y se identificaron así dos proteínas que mostraban homología con la proteína NucA. Estas dos proteínas son los productos de los genes *nuc* de *Serratia marcescens* (número de acceso P13717) y *NUC1* de *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso P08466). El gen *nuc* de *S. marcescens* codifica una nucleasa extracelular de 266 aminoácidos (Ball *et al.*, 1987), mientras que el gen *NUC1* de *S. cerevisiae* corresponde a una nucleasa mitocondrial de 329 aminoácidos de codificación nuclear (Vincent *et al.*, 1988).

El alineamiento de los productos de los genes *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120, *nuc* de *S. marcescens* y *NUC1* de *S. cerevisiae* se muestra en la figura 20. Como se observa, las tres proteínas presentan un tamaño similar y una elevada similitud a lo largo de toda la secuencia, si bien hay una zona (desde Asp-121 hasta Ala-129 en NucA) en la que se aprecia una especial conservación de los residuos. La proteína de *Anabaena* presenta 64 identidades con la de *S. marcescens* y 70 con la de *S. cerevisiae*, mientras que las proteínas de *S. marcescens* y *S. cerevisiae* sólo presentan 48 identidades entre sí. Por otro lado, hay un total de 29 residuos idénticos entre las tres proteínas (señalados con asteriscos en la figura 20), 7 de los cuales se localizan en la región de mayor conservación mencionada anteriormente. Esta región contiene un residuo de histidina (His-124 en NucA) que, como se

```

(1) .....MRFNNKNUGLGALLFAAQSADTLESIDNCAUG
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(1) .....MGI CGKLGVAALVALIUGCSPUQSQPPLTELSPSISUHLNLLGNPSGAT
          ! : : ! : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(1) MCSRILLSGLUGLAGTGLTYLLLNKHSPTQIIEIETYPPTQKPNHNIQSHSFNUDPSGFF

          *          **

(34) CPTG-GSSNUSIURHAYTLNHNSTTKFANWUAVYHITKD-TP--ASGKTRNKUTDPALNPA
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(50) PTKL-TPDNYLMUKNQVALSYNNSKGTANWUAVQLNSSLG--NAERQDNFRPKTLNPA
          : : ! : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(61) KYGFGPIHDLQNFEEFISCYNRQTQNPYUWLEHITPESLAARNADRNKNSFFKEDEVIFE

          *          **** * *          * **          * *

(90) -DTLAPADYTGANAALKVDRGHQAPLASLAGUSDWESLNYL-SNITPQKSDL-NQGAHAR
          : : ! : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(107) WURUTPSMYSGSG----YDRGHIAPSADRTKTEDNAATFLMTNMMPTPDN-NRNTWGN
          ! : : ! : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(121) KFRGKLRDYFRSG----YDRGHQAPAADAKFSQQAMDDTFYLSNMCPQUGEGFNRDYWAH

          ** * *          * **

(147) LEDQERKLIDRADISSUYTUTGPLY---ERDMGKLPQTQKAHTIPSAYWKVIF-----I
          ! ! ! ! : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(162) LEDYCRELUSQG--KELYIYAGP-----NGSLGK-PLKGV-TUPKSTWIKVU-----U
          ! ! : ! : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(177) LEYFCRGLTKKY--KSURIUTGPLYLPKDPIDN-KFRUNY-EUIGNPPIAUPTHFFKL

          *          * * * *

(198) NNSPAUN----HYAAFLDQNTPKGA-DFCQ----FRUTUDEIEKRTGLIIWAGLPDDUQ
          : ! ! : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(207) LDSPGSGLEGITANTRUIAUNIPNDP-ELNNDURAYKUSUDELESLTGYDFLSNUSPNIQ
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
(233) IVAEAPTANPAREDIAVAAFULPNEPISNETKLTQFEUPIDALERSTGLELLQKUPPSK

(249) ASLSKPGULPELMGCKN....(266) Serratia
          : ! : !
(266) TSIESKVDN....(274) Anabaena
          : : : : !
(293) KALCKEUNCQIUURDFSNAAIKQSKDUKLLPPPCKRN....(329) Saccharomyces

```

**Fig. 20. Alineamiento de la proteína NucA con otras nucleasas.**

Se muestra el alineamiento de la proteína NucA de *Anabaena* sp. PCC 7120 con los productos de los genes *nuc* de *Serratia marcescens* y *NUC1* de *Saccharomyces cerevisiae* según el programa FASTA. Se indican los cambios conservativos (:) y las identidades (!) entre NucA y las otras dos proteínas. Los residuos idénticos en las tres proteínas se señalan con un asterisco. Los guiones representan espacios introducidos para optimizar el alineamiento.

discutirá más adelante, podría estar directamente implicado en la reacción catalizada por NucA.

Por último, para determinar la significación de los alineamientos obtenidos, se hizo uso del parámetro NAS ("Normalized Alignment Score"; Doolittle, 1986), que permite evaluar la probabilidad de que dos secuencias alineadas sean realmente homólogas. El valor NAS obtenido para el alineamiento entre NucA y la nucleasa de *S. cerevisiae* fué de 204 en una longitud de alineamiento de 274 aminoácidos. Según Doolittle (1986), este valor indica, con elevada probabilidad, que ambas proteínas son homólogas. El valor obtenido para el alineamiento entre NucA y la nucleasa de *S. marcescens* fué de 146 en una longitud de alineamiento de 266 aminoácidos, indicando que la homología entre estas dos proteínas es sólo marginalmente probable, aunque no improbable.

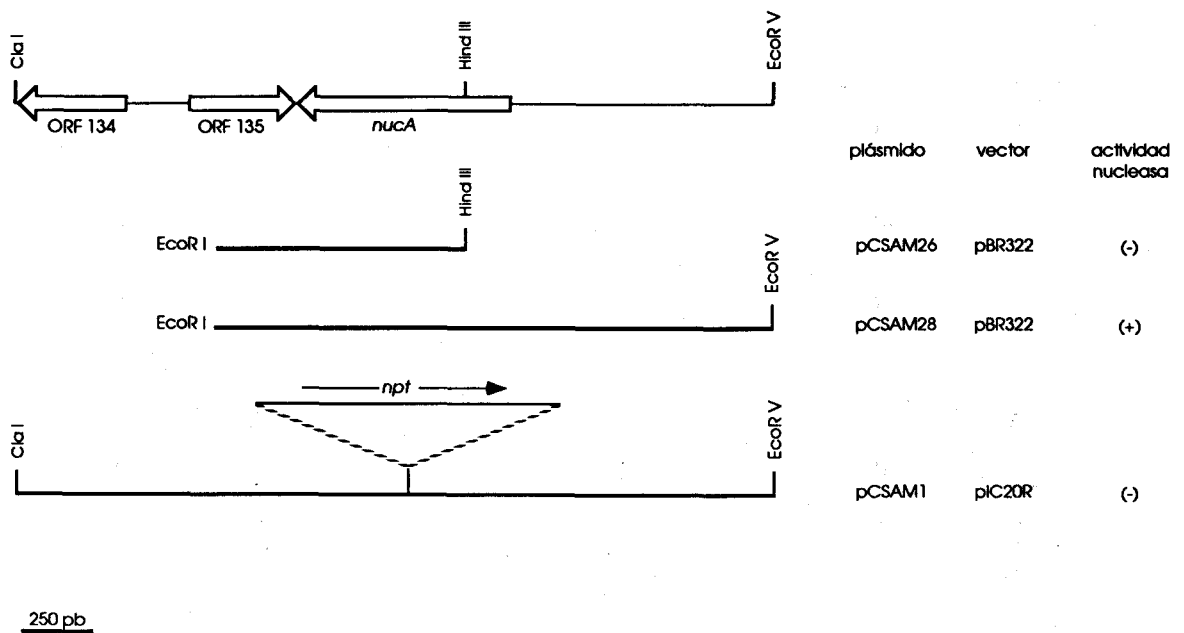
### 3.4. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEINA NucA EXPRESADA EN *E.coli*.

En este apartado se realiza una caracterización de la reacción llevada a cabo por la nucleasa NucA de *Anabaena* sp. PCC 7120 expresada en *E. coli*. Se confirma que esta nucleasa tiene actividad DNasa y RNasa y que es capaz de actuar como endonucleasa. Por otro lado, se estudia el efecto de la proteína NucA en la transferencia de ADN plasmídico a *E. coli* mediante transformación.

A diferencia de lo que ocurre con los experimentos realizados utilizando células de *Anabaena*, en los experimentos que se llevaron a cabo con la proteína NucA clonada en *E. coli* se utilizaron como controles versiones inactivadas del gen *nucA*. De esta forma se aseguraba la atribución a la proteína NucA de las distintas actividades estudiadas.

#### 3.4.1. Plásmidos utilizados en los estudios llevados a cabo con la proteína NucA expresada en *E. coli*.

Para llevar a cabo los experimentos que se describen a continuación, se subclonó un fragmento de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 que contuviera únicamente el gen *nucA* y no las otras dos ORFs adyacentes al mismo (ver aptdo. 3.3). Dado que la expresión del gen *nucA* en vectores de muy alto número de copias resultaba inviable (ver aptdo. 3.3.1.1.), el fragmento mencionado se clonó en el vector pBR322 (10-15 copias por célula). La construcción del plásmido pCSAM28, que contiene únicamente el gen *nucA*, se describe en la figura 21. El gen *nucA* se reconstruyó a partir de dos fragmentos, el fragmento *Hind* III-*Eco*R V de 1,1 kb contenido en pCSAM11 y el fragmento *Eco*R I-*Hind* III de 0,9 kb contenido en pCSAM20.6.3 (ver figura 16). Este último fragmento contiene parte del gen *nucA* y parte también de ORF-135 pero no ORF 134. El plásmido pCSAM28 confería actividad nucleasa tanto en el ensayo en cajas de LA+ADN como en el ensayo en geles de SDS-poliacrilamida. Por otro lado, utilizando como diagnóstico la ausencia de un sitio *Hinf* I próximo al segundo codón de metionina dentro de ORF-135, se determinó que pCSAM28, además de no contener ORF-134, no contenía tampoco ninguno de los dos posibles



**Fig. 21. Construcción de plásmidos utilizados en los estudios llevados a cabo con la proteína NuCA expresada en *E. coli*.**

Se muestra la región *Cla* I-*Eco*R V de 2,75 kb del genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 y las tres ORFs identificadas, así como los insertos contenidos en pCSAM1, pCSAM26 y pCSAM28. Para construir pCSAM28, el fragmento *Eco*R I-*Hind* III de 0,9 kb de pCSAM20.6.3 se clonó en el vector pBR322 digerido con *Eco*R I y *Hind* III, obteniéndose pCSAM26. A continuación, el fragmento *Hind* III-*Eco*R V de 1,1 kb de pCSAM11 se clonó en pCSAM26 digerido con *Hind* III y *Eco*R V, obteniéndose pCSAM28. Para construir pCSAM1, el fragmento *Cla* I-*Eco*R V de 3,8 kb de pRLA5 (ver figura 25), que contiene el gen *nuca* interrumpido por el gen *npt*, se clonó en el vector pIC20R digerido con *Cla* I y *Sma* I. El extremo izquierdo de pCSAM26 y pCSAM28 había sido generado mediante digestión con exonucleasa III (ver pCSAM20.6.3 en figura 16).



codones de iniciación de ORF-135. Así pues, ninguna de estas dos ORFs se requería para la expresión de la proteína NucA en *E. coli*.

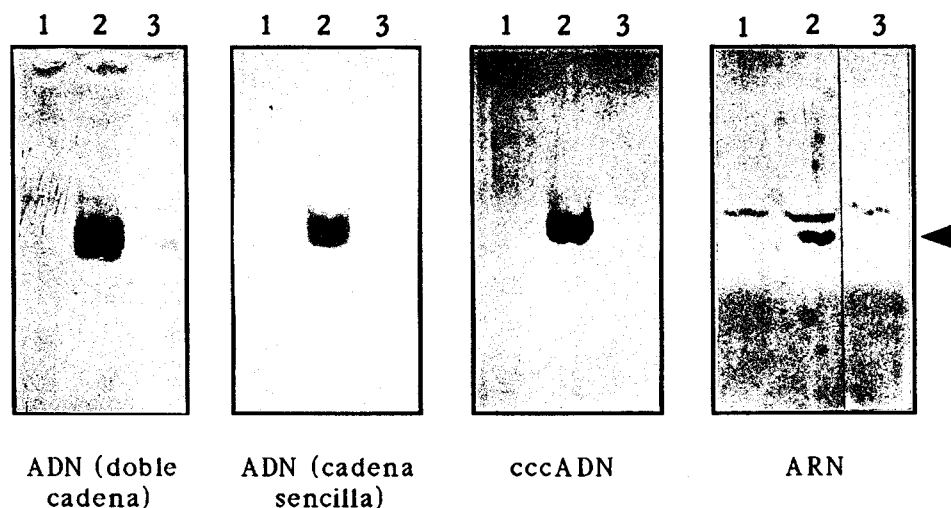
Los plásmidos utilizados como controles en los experimentos realizados con pCSAM28 fueron pCSAM1 y pCSAM26, cuya construcción se describe también en la figura 21. pCSAM1 contiene el fragmento *Cla* I-*Eco*R V de 2,75 kb (ver figura 15) interrumpido por el gen *npt* a nivel del residuo Arg-93 de NucA y no confiere actividad nucleasa. pCSAM26 contiene únicamente el fragmento *Eco*R I-*Hind* III de 0,9 kb de pCSAM20.6.3 y, por lo tanto, sólo parte del gen *nucA*, no confiriendo tampoco actividad nucleasa.

### 3.4.2. Caracterización de la actividad de la proteína NucA.

La proteína NucA se obtenía a partir de los sobrenadantes de cultivos saturados de células de *E. coli* que portaban plásmidos conteniendo el gen *nucA* y podía concentrarse hasta 200 veces mediante precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Alternativamente, la proteína NucA se concentraba unas 3-4 veces mediante centrifugación del medio de cultivo a través de microconcentradores (ver Materiales y Métodos, aptdo. 2.2.1.2).

Utilizando células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo pCSAM28 y el ensayo en geles de SDS-poliacrilamida que contenían diversos ácidos nucleicos, se determinaron los diferentes sustratos susceptibles de ser degradados por la nucleasa NucA. Como controles se emplearon células de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contenían el plásmido pCSAM1 (*nucA::npt*) o el vector pBR322 sin inserto. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 22. Como se observa, la proteína NucA expresada en *E. coli* degradaba tanto ADN (de doble cadena o cadena sencilla) como ARN y tenía además actividad endonucleasa (degradaba la forma circular covalentemente cerrada de pUC18). En alguno de los geles que se muestran, por encima de NucA se observa una banda de actividad nucleasa que está presente en todos los carriles. Esta actividad es atribuible a las células de *E. coli*. De hecho, se han descrito en dicho organismo varias proteínas con actividad RNasa en el rango de peso molecular comprendido entre 23 y 30 kDa (Srivastava *et al.*, 1992).

Dado que la electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida produce la separación de las proteínas presentes en una muestra de acuerdo con el peso molecular de las mismas, las bandas de actividad



1. *E. coli* (pBR322)
2. *E. coli* (pCSAM28) (*nucA*)
3. *E. coli* (pCSAM1) (*nucA::npt*)

**Fig. 22. Actividad de la proteína Nuca expresada en *E. coli*.**

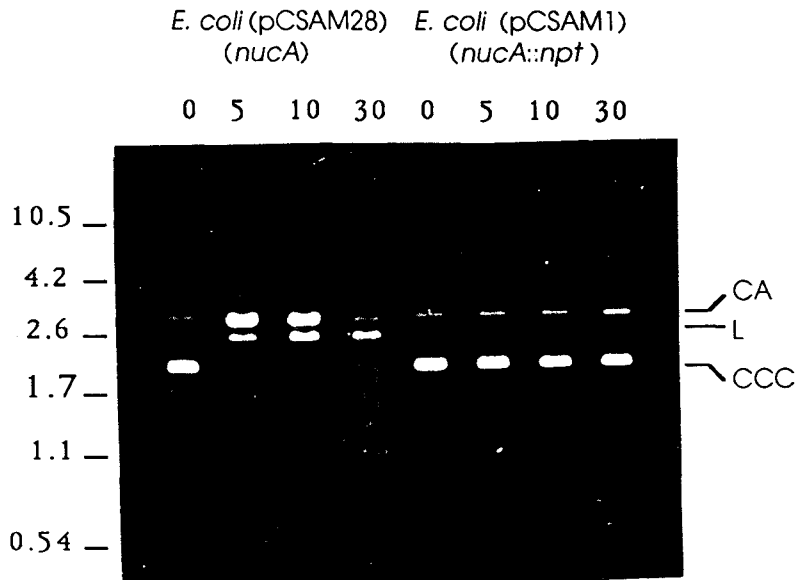
Se muestra el ensayo de actividad de la proteína Nuca en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo diversos sustratos. Células de cultivos en fase estacionaria de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadoras de pBR322 (carriles 1), pCSAM28 (carriles 2) o pCSAM1 (carriles 3) se ensayaron como se describe en Materiales y Métodos. Los geles contenían ADN nativo de timo de ternera (ADN de doble cadena), ADN desnaturalizado de timo de ternera (ADN de cadena sencilla), cccpUC18 o ARN ribosómico de *E. coli* (16S+23S). Las muestras contenían 1  $\mu$ l de cultivo estacionario excepto en el gel que contenía ARN (10  $\mu$ l de cultivo estacionario). La flecha señala la banda de actividad correspondiente a la proteína Nuca.

observadas en los ensayos en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN podrían ser el resultado de la acción de un único polipéptido o de polipéptidos del mismo tamaño. Cabía por tanto la posibilidad de que la proteína NucA no tuviera actividad endonucleasa y que la actividad detectada en el gel que contenía cccpUC18 fuera debida a la acción conjunta de otra endonucleasa de tamaño similar propia de *E. coli* y NucA actuando como exonucleasa. Para determinar si éste era el caso, se llevó a cabo el experimento que se muestra en la figura 23. En este experimento se ensayó la capacidad de producir incisiones en el ADN por parte de preparaciones de NucA, visualizando en electroforesis las distintas formas del plásmido suministrado como sustrato. Como se observa, la incubación de ADN plasmídico de pUC18 covalentemente cerrado con medio de cultivo procedente de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadoras del plásmido pCSAM28 (*nucA*) hacía que el plásmido pasara primero a la forma circular abierta (relajada) y luego a la forma lineal, resultando ésta última degradada si se continuaba la incubación. Por el contrario, el ADN plasmídico incubado con medio de cultivo de células portadoras del plásmido pCSAM1 (*nucA::npt*) permanecía en forma covalentemente cerrada. Así pues, se puede afirmar que la actividad endonucleasa mostrada en la figura 22 corresponde realmente a la proteína NucA.

Los resultados obtenidos con la proteína NucA expresada en *E. coli* confirman los ya obtenidos con la nucleasa procedente de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 y *A. variabilis* ATCC 29413 (ver figura 6).

### 3.4.3. Efecto de la proteína NucA sobre la transformación de *E. coli* con ADN plasmídico.

Se ha descrito que alguna de las nucleasas responsables de la dificultad de transformación de algunas bacterias dificultan asimismo la transformación de *E. coli* cuando se expresan en este organismo. Concretamente, la DNasa codificada por el gen *dns* de *Vibrio cholerae*, que se ha descrito como la principal causa de la dificultad para transformar esta bacteria con ADN plasmídico (Focareta y Manning, 1991), reduce también la frecuencia de transformación cuando se expresa en *E. coli* (Focareta y Manning, 1987). Por otro lado, la frecuencia de transformación mejora sensiblemente cuando *E. coli* presenta una mutación en el gen *endA*, que codifica para una



**Fig 23. Actividad endonucleasa de la proteína NucA expresada en *E. coli*.**

Se ensayó la actividad endonucleasa en el medio de cultivo de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo pCSAM28 o pCSAM1. Para ello, 1  $\mu$ g de ADN covalentemente cerrado del plásmido pUC18 se incubó, en un volumen final de 60  $\mu$ l, en presencia de 10  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo en fase estacionaria de células de *E. coli*, previamente concentrado 3,5 veces mediante centrifugación a través de microconcentradores. La mezcla completa, a excepción del sobrenadante de cultivo, se incubó a 37°C y, tras retirar una alícuota como t=0, se añadió la muestra de sobrenadante, continuándose entonces la incubación. Tras 5, 10 y 30 min de incubación, se retiraron muestras en las que la reacción se detenía mediante adición de EDTA (pH 8) a una concentración final de 50 mM. Los productos de la incubación se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% que, posteriormente, se sumergió en una disolución conteniendo bromuro de etidio y se fotografió con luz ultravioleta.

A la derecha se indican las tres formas del plásmido: (CCC) circular covalentemente cerrada, (CA) circular abierta y (L) lineal. A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

endonucleasa periplásmica (Hanahan, 1983), siendo muchas de las estirpes más utilizadas actualmente en estudios de biología molecular (DH1, DH5, etc.) mutantes en dicho gen.

Así pues, se decidió estudiar el efecto que tendría la presencia de la proteína NucA sobre la frecuencia de transformación de las células de *E. coli*. Para ello, se prepararon, mediante un procedimiento basado en el descrito por Hanahan (1983; ver Materiales y Métodos, aptdo. 2.4.2), dos series independientes de células competentes a partir de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo diversos plásmidos. Estos plásmidos contenían las diversas versiones o fragmentos del gen *nuca* que se indican en la tabla 5. Todas las células cuya frecuencia de transformación se quería determinar eran portadoras de plásmidos derivados de pBR322 y por lo tanto portadoras del replicón del plásmido pMB1 (Bolívar *et al.*, 1977). Dado que dos plásmidos pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad no se mantienen de forma estable en la misma célula (Datta, 1979), para determinar las frecuencias de transformación se escogieron plásmidos portadores de replicones compatibles con el replicón de pMB1 o, lo que es lo mismo, pertenecientes a un grupo de incompatibilidad distinto. Los plásmidos escogidos fueron pACYC184, un plásmido de 4,2 kb que confiere resistencia a cloranfenicol y tetraciclina y es portador del replicón del plásmido p15A (Chang y Cohen, 1978) y pCSAM13, de 13 kb, que confiere resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina y es portador del replicón del plásmido RK2. pCSAM13 se había obtenido sustituyendo el gen *npt* contenido en pDUCA7 (Buikema y Haselkorn, 1991), escindido mediante digestión con *Pst* I, por un fragmento que confiere resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina obtenido mediante digestión de pRL463 [pUC18/19/L.HEH1 (*Bam*H I)/C.S3, nomenclatura de Elhai y Wolk, 1988a] con *Pst* I.

La transformabilidad, con los plásmidos pACYC184 y pCSAM13, de las células de *E. coli* conteniendo diversos fragmentos de la región *nuca* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se muestra en la tabla 5. Como se observa en el experimento I, tanto cuando se encontraba en un inserto de gran tamaño (pRLA3) como cuando se trataba de un fragmento reducido (pCSAM28), la presencia del gen *nuca* intacto originaba un descenso apreciable en la frecuencia de transformación de las células de *E. coli* portadoras del mismo. Este descenso era más acusado en el caso de pCSAM28, en el que se había encontrado una actividad

**Experimento I**

Estirpe	ADN de <i>Anabaena</i> en el plásmido	transformabilidad con los siguientes plásmidos <sup>a</sup>	
		pACYC184	pCSAM13
DH5 $\alpha$	-	4,4 x 10 <sup>-1</sup>	5,8 x 10 <sup>-1</sup>
DH5 $\alpha$ (pRLA3.15)	8,7 kb ( <i>nucA::npt</i> )	1	1
DH5 $\alpha$ (pRLA3)	8,7 kb ( <i>nucA</i> completo)	3,8 x 10 <sup>-2</sup>	2,2 x 10 <sup>-3</sup>
DH5 $\alpha$ (pCSAM28)	2,0 kb ( <i>nucA</i> completo)	7,9 x 10 <sup>-3</sup>	3,6 x 10 <sup>-4</sup>

**Experimento II**

Estirpe	ADN de <i>Anabaena</i> en el plásmido	transformabilidad con los siguientes plásmidos <sup>a</sup>		transformabilidad con los siguientes plásmidos <sup>b</sup>	
		pACYC184	pCSAM13	pACYC184	pCSAM13
DH5 $\alpha$ (pBR322)	-	1	1	1	1
DH5 $\alpha$ (pCSAM26)	0,9 kb ( <i>nucA</i> incompleto)	9,8 x 10 <sup>-1</sup>	8,1 x 10 <sup>-1</sup>	7,9 x 10 <sup>-1</sup>	8,1 x 10 <sup>-1</sup>
DH5 $\alpha$ (pCSAM28)	2,0 kb ( <i>nucA</i> completo)	2,2 x 10 <sup>-3</sup>	2,4 x 10 <sup>-4</sup>	3,1 x 10 <sup>-3</sup>	4,6 x 10 <sup>-4</sup>
DH5 $\alpha$ (pRLA3)	8,7 kb ( <i>nucA</i> completo)	5,6 x 10 <sup>-2</sup>	4,0 x 10 <sup>-4</sup>	5,9 x 10 <sup>-2</sup>	6,2 x 10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup>Según conteo de transformantes/ $\mu$ g de ADN plasmídico.

<sup>b</sup>Según conteo de transformantes/célula viable.

**Tabla 5. Efecto de la proteína Nuca sobre la frecuencia de transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ .**

Se muestra la transformabilidad relativa de las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo los plásmidos indicados. La transformabilidad se expresa como el cociente entre las frecuencias obtenidas y la frecuencia a la que se asignaba el valor 1. La transformación se llevó a cabo con 15 ng del plásmido pACYC184 (seleccionando células resistentes a cloranfenicol) o con 6,25 ng del plásmido pCSAM13 (seleccionando células resistentes a estreptomycin y espectinomycin). Las frecuencias se determinaron en base al conteo de transformantes/ $\mu$ g de ADN o al conteo de transformantes/célula viable. Las frecuencias a las que se asignó el valor 1 fueron: experimento I, 4,06 x 10<sup>8</sup> transformantes/ $\mu$ g ADN plasmídico de pACYC184 y 1,58 x 10<sup>7</sup> transformantes/ $\mu$ g ADN plasmídico de pCSAM13; experimento II, 4,86 x 10<sup>7</sup> transformantes/ $\mu$ g ADN plasmídico de pACYC184 (1,61 x 10<sup>-3</sup> transformantes/célula viable) y 5,63 x 10<sup>6</sup> transformantes/ $\mu$ g de ADN plasmídico de pCSAM13 (5,9 x 10<sup>-3</sup> transformantes/célula viable).

nucleasa mayor que la de pRLA3. En esta primera serie se observó también que la transformabilidad de las células de *E. coli* no portadoras de plásmido es menor que la de las células de *E. coli* portadoras del plásmido pRLA3.15(*nucA::npt*). Este es un fenómeno que se había observado anteriormente en nuestro laboratorio y que era independiente de la presencia de un fragmento de ADN de *Anabaena* en el plásmido. Así pues, para suprimir la influencia de este fenómeno en los datos a comparar y para confirmar los resultados obtenidos, se llevó a cabo el experimento II, en el que se incluía como control DH5 $\alpha$  (pBR322), en el que de nuevo se determinaron las frecuencias de transformación con los plásmidos pACYC184 y pCSAM13 (ver tabla 5). Como se observa, el número de transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico disminuía apreciablemente en las células portadoras de pRLA3 y, aún más, en las células portadoras de pCSAM28. En este segundo experimento también se determinaron las frecuencias de transformación por célula viable, obteniéndose resultados similares. Así pues, se puede afirmar que la presencia del gen *nucA* dificulta la transformación con ADN plasmídico de las células de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### 3.5. GENERACION DE MUTANTES *nucA* DE *Anabaena* sp. PCC 7120.

En este apartado se describe la obtención de mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 carentes de la actividad de la proteína NucA. Dichos mutantes se generaron mediante inserción en el gen *nucA* de un gen de resistencia a neomicina.

#### 3.5.1. Generación de mutantes *nucA*.

Para obtener mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 carentes de la proteína NucA, se llevó a cabo la sustitución del gen *nucA* silvestre por una versión inactivada del mismo. Para ello se hizo uso de un vector que permite la selección de aquellas células de *Anabaena* en las que hubiese tenido lugar un evento doble de recombinación entre el cromosoma portador del gen silvestre y un plásmido portador del gen mutado. Esta selección se basa en la letalidad condicional del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* que codifica la enzima levansacarasa, una proteína cuya producción es inducida por la sacarosa (Gay *et al.*, 1985). La expresión del gen *sacB* de *B. subtilis* es letal para las células de algunas bacterias gram-negativas cuando éstas se cultivan en presencia de sacarosa al 5% en medio sólido (Gay *et al.*, 1983; Gay *et al.*, 1985; Ried y Collmer, 1987). Recientemente se ha descrito que esta letalidad condicional tiene también lugar en las células de *Anabaena* (Cai y Wolk, 1990). El vector empleado para la obtención de mutantes fué pRL277, un derivado de pRL270 (Maldener *et al.*, 1991). El plásmido pRL277 es portador de genes de resistencia a estreptomycin y espectinomycin, además del gen *sacB* de *B. subtilis* y la región *bom* ("basis of mobilization") del plásmido pBR322 (Cai y Wolk, comunicación personal). Esta última región permite que los plásmidos que contienen el vector pRL277 puedan ser movilizados, mediante conjugación, desde *E. coli* hasta *Anabaena*.

Los plásmidos conteniendo versiones inactivadas del gen *nucA* que se utilizaron para la obtención de mutantes fueron pRLA4 y pRLA5. pRLA4 contenía el vector pRL277 y, en el sitio *Sst* I del mismo, el inserto de ADN de *Anabaena* contenido en el plásmido pRLA3.15 (ver figura 12), en el que el gen de resistencia a kanamicina/neomicina del transposón Tn903 (*npt*) estaba insertado en el gen *nucA* a nivel del aminoácido Arg-93 de la proteína NucA



(ver figura 18). Además, dado que la resistencia a neomicina conferida por el gen *npt* de Tn903 no se había probado hasta el momento en *Anabaena* sp. PCC 7120, se usó también otro plásmido, pRLA5, en el que el gen *npt* presente en pRLA4 se había escindido mediante digestión con *Bam*H I y sustituido por el gen *npt* del transposón Tn5 contenido en la "cassette" C.K3 (Elhai y Wolk, 1988a). En esta "cassette", el promotor natural del gen *npt* de Tn5 se encuentra sustituido por la región promotora del gen *psbA* del cloroplasto de *Amaranthus hybridus* (Hirschberg y McIntosh, 1983). Este promotor confiere un alto nivel de expresión del gen *npt* en cianobacterias (Dzelzkalns *et al.*, 1984), habiéndolo sido usada la "cassette" C.K3 con anterioridad en la generación de mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 y *A. variabilis* ATCC 29413 (Maldener *et al.*, 1991).

El procedimiento seguido para la obtención de mutantes se muestra en la figura 24. Los plásmidos pRLA4 y pRLA5 sólo poseen secuencias para la replicación en *E. coli*, por lo que, tras ser introducidos en las células de *Anabaena* mediante conjugación, no pueden establecerse autónomamente en las mismas. Por ello, al seleccionar células de *Anabaena* resistentes a neomicina, sólo se obtienen aquellas en las que se haya producido un fenómeno de recombinación homóloga que resulte en la integración del plásmido completo en el cromosoma de *Anabaena*, o bien aquellas en las que, por un fenómeno de doble recombinación homóloga, se haya sustituido un fragmento del cromosoma de *Anabaena* por el fragmento homólogo contenido en pRLA4 o pRLA5, que contiene el gen *npt* que confiere resistencia a neomicina (figura 24). Tras esta primera fase de selección en presencia de neomicina se obtuvieron una serie de colonias de *Anabaena* sp. PCC 7120 resistentes a dicho antibiótico, en las que se habría producido alguno de los fenómenos de recombinación que se acaban de mencionar. La segunda fase para la selección de mutantes *nucA* (dobles recombinantes) consistió en la siembra en medios conteniendo neomicina y sacarosa al 5% de células de las colonias anteriormente seleccionadas como resistentes a neomicina. Como se muestra en la figura 24, las células en las que se hubiera producido un evento de doble recombinación habrían perdido todo el fragmento de ADN correspondiente a pRL277 (que incluye el gen *sacB* que confiere sensibilidad a sacarosa y los genes de resistencia a estreptomomicina y espectinomomicina). Por el

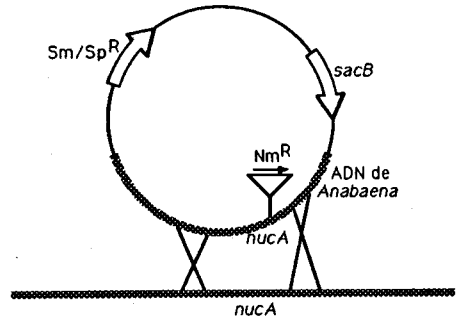
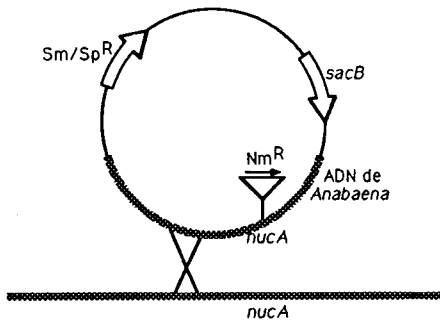
Introducción de pRLA4 o pRLA5 en *Anabaena* mediante conjugación

recombinación sencilla (integración)

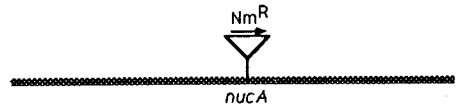
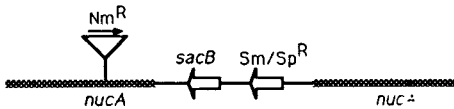
doble recombinación (sustitución)

plásmido pRLA4 o pRLA5

ADN genómico *Anabaena*



Selección de colonias Nm<sup>R</sup>



Nm<sup>R</sup>, sac<sup>S</sup>, Sm/Sp<sup>R</sup>  
2 copias *nucA*: *nucA* silvestre  
*nucA*::*npt*

Nm<sup>R</sup>, sac<sup>R</sup>, Sm/Sp<sup>S</sup>  
*nucA*::*npt*

Selección colonias sac<sup>R</sup>

NO CRECEN

MUTANTES *nucA*

**Fig. 24.** Obtención de mutantes *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante sustitución del gen silvestre por la copia mutante presente en pRLA4 o pRLA5.

En la figura se muestran los diferentes eventos de recombinación homóloga que permitirían la obtención de células resistentes a neomicina tras introducir pRLA4 o pRLA5 en las células de *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación (ver aptdo. 2.4.3). Para seleccionar aquellas células en las que la copia mutante de *nucA* introducida hubiera sustituido al gen silvestre se seleccionaron colonias resistentes a neomicina y, posteriormente, resistentes a sacarosa. Finalmente se escogieron colonias que eran sensibles a estreptomicina y espectinomicina (no se indica en la figura). Los detalles experimentales se recogen en Materiales y Métodos (aptdo. 2.4.8).

Abreviaturas: Nm, neomicina; sac, sacarosa; Sm, estreptomicina; Sp, espectinomicina.

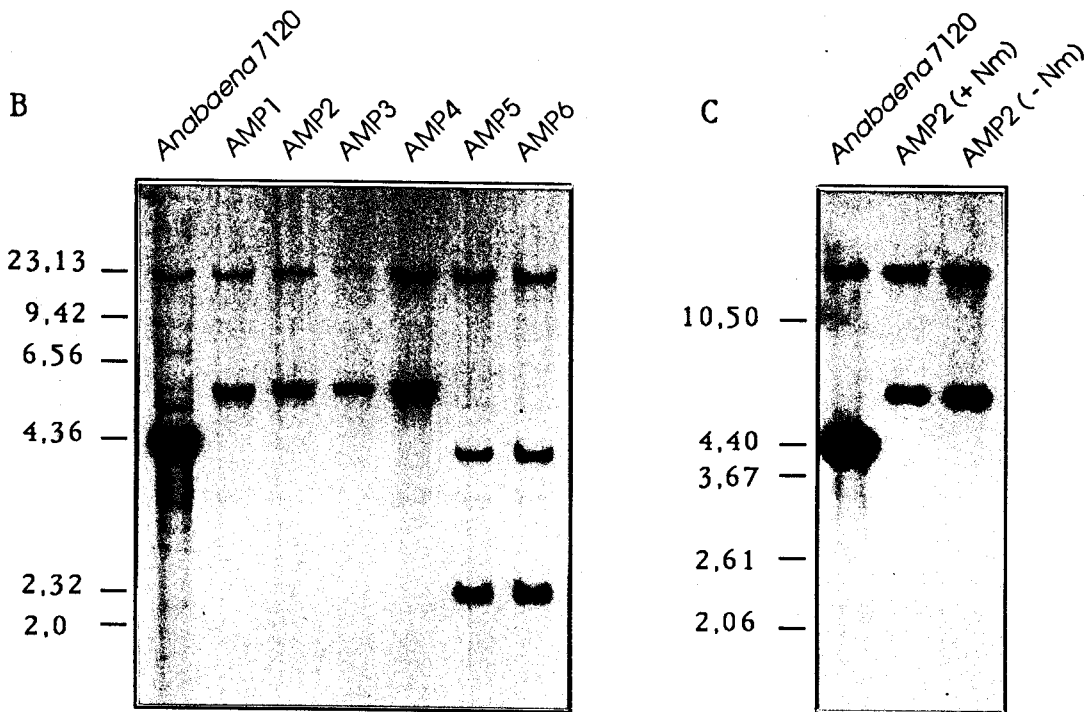
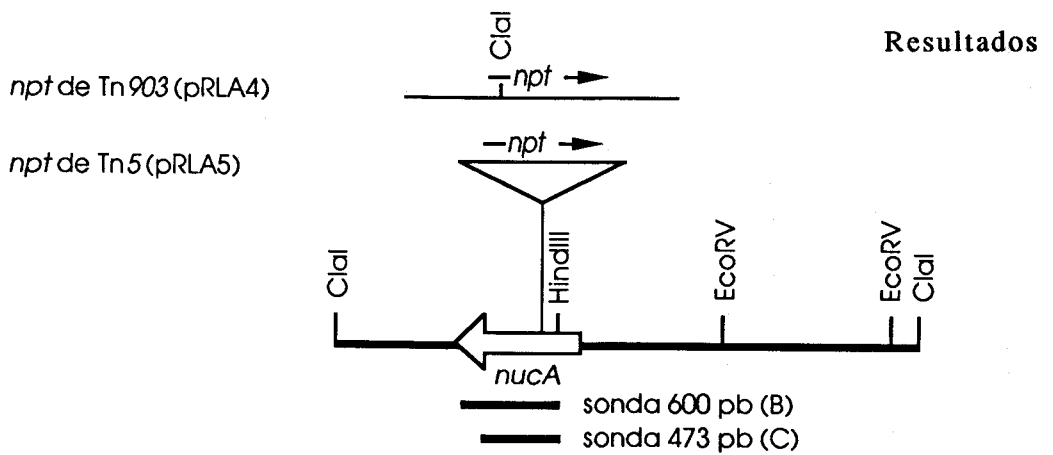
contrario, las células en las que se hubiera producido un fenómeno de integración del plásmido conservarían el gen *sacB* y serían por tanto sensibles a sacarosa. Finalmente, se comprobó que las células seleccionadas como resistentes a sacarosa eran también sensibles a estreptomycinina y espectinomycinina. Esta última comprobación tiene especial importancia, dado que el gen *sacB* puede ser inactivado espontáneamente en *Anabaena*, por ejemplo, por el salto de secuencias de inserción (Cai y Wolk, 1990). Si ésto ocurre, las células correspondientes son resistentes a sacarosa pero siguen siendo resistentes a estreptomycinina y espectinomycinina.

Tras llevar a cabo el proceso descrito, se obtuvieron una serie de colonias de *Anabaena* en las que presuntamente se habría producido la sustitución del gen *nuca* silvestre por una copia mutante y que se denominaron AMP1-AMP6. El fenotipo de estas colonias era: resistencia a neomicina, resistencia a sacarosa y sensibilidad a estreptomycinina y espectinomycinina.

### 3.5.2. Estructura cromosómica de los mutantes *nuca*.

Mediante el procedimiento ya reseñado se obtuvieron colonias de *Anabaena* derivadas de la estirpe PCC 7120 que debían contener las versiones mutantes del gen *nuca* presentes en pRLA4 y pRLA5. Con objeto de comprobar que en estos mutantes se había producido la sustitución del gen silvestre, se aisló ADN total de los mismos y, tras digestión con *Cla* I, electroforesis en gel de agarosa y transferencia a membrana de nylon, se hibridó éste con un fragmento de ADN interno del gen *nuca* marcado radiactivamente. Como se muestra en la figura 25A, la sonda empleada se extendía a ambos lados de las inserciones del gen *npt* en el gen *nuca*. El resultado obtenido tras la hibridación se muestra en la figura 25B. En el caso de los mutantes AMP1-AMP4, que contienen el gen *npt* procedente de C.K3 (Tn5), la banda de hibridación aumentaba en 1,1 kb, correspondientes al gen *npt* de C.K3. En los mutantes AMP5 y AMP6, que contienen el gen *npt* procedente del minitransposón *mini-kan* (Tn903), la banda de hibridación se dividía en dos fragmentos, dado que este gen *npt* aportaba un sitio de restricción adicional para la enzima *Cla* I. La suma de los tamaños de ambos fragmentos correspondía al tamaño del fragmento silvestre más 1,8 kb, correspondientes al gen *npt* de Tn 903. En ambos casos, aunque la cantidad de ADN genómico era similar en todos los carriles,

A



**Fig. 25. Estructura cromosómica de los mutantes *nuca* de *Anabaena* sp. PCC 7120.**

(A) Se muestra la región de ADN de *Anabaena* sp PCC 7120 en la que se localiza el gen *nuca*, las dos versiones del gen *npt* usadas para inactivar el gen *nuca* y la zona del gen *nuca* utilizada como sonda en las hibridaciones que se presentan a continuación.

(B) Hibridación de ADN total de *Anabaena* 7120 y seis estirpes mutantes derivadas de ésta (cultivadas en presencia de neomicina), digerido con *Cla* I, con una sonda (de aproximadamente 0,6 kb) que correspondía al fragmento *Bam*H I-*Hind* III comprendido entre la inserción del transposón mini-*kan* en pRLA2.13 y el único sitio *Hind* III de pRLA2 (ver figura 12), y, por lo tanto, contenía 70 pb del transposón mini-*kan*.

(C) ADN total de *Anabaena* 7120 y de la estirpe mutante AMP2 cultivada en presencia o ausencia de neomicina se digirió con *Cla* I y se hibridó con una sonda *Hind* III-*Bst*N I de 473 pb correspondiente a los aminoácidos 52-210 de la proteína Nuca.

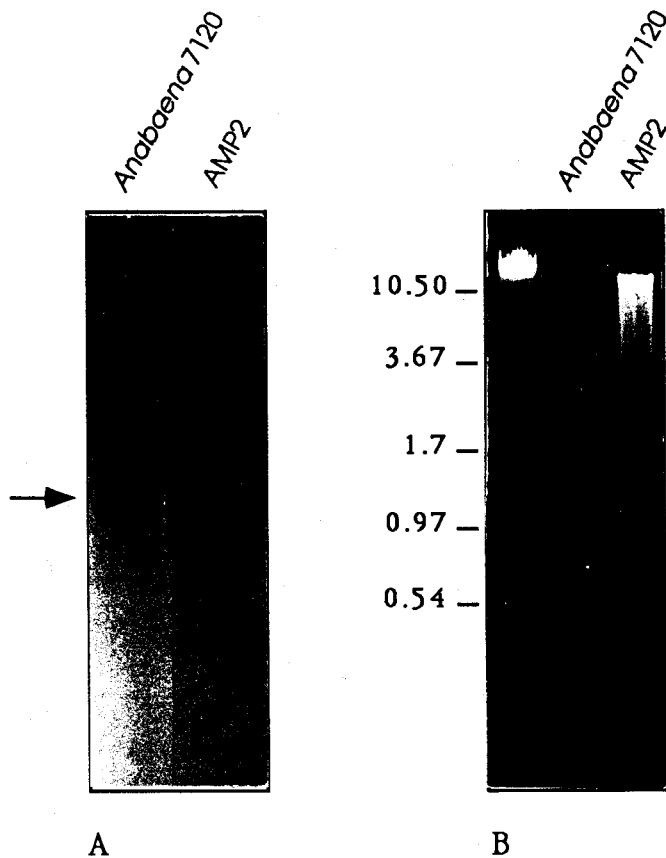
Las hibridaciones se llevaron a cabo a 65°C. Los detalles experimentales se recogen en Materiales y Métodos (aptdos. 2.4.4.5, 2.4.4.6 y 2.4.5.5). A la izquierda se indican en kb los patrones de tamaño empleados.

la hibridación obtenida con los mutantes era más débil que la obtenida con la estirpe silvestre. Esto se debe, probablemente, al hecho de que, mientras que en el caso de la estirpe silvestre la sonda utilizada hibridaba con un fragmento contínuo de ADN, en el caso de los mutantes la sonda hibridaba con dos fragmentos distantes 1,1 (mutantes AMP1-AMP4) o 1,8 kb (mutantes AMP5 y AMP6). También se observaba una banda de hibridación de aproximadamente el mismo tamaño en todos los carriles en torno a 23 kb. Esta banda no correspondía a una digestión parcial sino a un segundo fragmento genómico que hibridaba débilmente con *nuca*, como se demuestra en el aptdo. 3.7. Para posteriores estudios se escogió el mutante AMP2.

La cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta varias copias del genoma por célula (Cai y Wolk, 1990), por lo que era importante comprobar que, tras varias resiembras en medio sólido conteniendo neomicina, todos los cromosomas de la estirpe mutante AMP2 eran portadores de versiones mutantes del gen *nuca*. Para ello, se llevó a cabo una segunda hibridación en la que el ADN se aisló a partir de células del mutante AMP2 que se habían cultivado durante varias generaciones en presencia o ausencia de presión selectiva en favor de los cromosomas mutantes, es decir, en presencia o ausencia de neomicina. El resultado obtenido se recoge en la figura 25C. Como se observa, en ningún caso aparecía señal alguna en la zona correspondiente al fragmento *Cla* I silvestre, lo que indicaba que todos los cromosomas de la estirpe AMP2 eran portadores del gen *nuca* mutado.

### 3.5.3. Caracterización del mutante AMP2.

Se ensayó la actividad nucleasa de las células del mutante AMP2. Dicha actividad se determinó en extractos libres de células, utilizando el ensayo en geles de SDS-poliacrilamida, y en sobrenadantes de cultivos, utilizando el ensayo de degradación de ADN del fago lambda. Como se observa en la figura 26A, el mutante AMP2 no presentaba la banda de actividad asociada a la nucleasa de 29 kDa en geles de SDS-poliacrilamida, corroborándose por tanto que el gen *nuca* es el responsable de dicha actividad en *Anabaena* sp. PCC 7120. Igualmente, el ensayo realizado con sobrenadante de cultivos (figura 26B) mostraba una notable disminución de la actividad



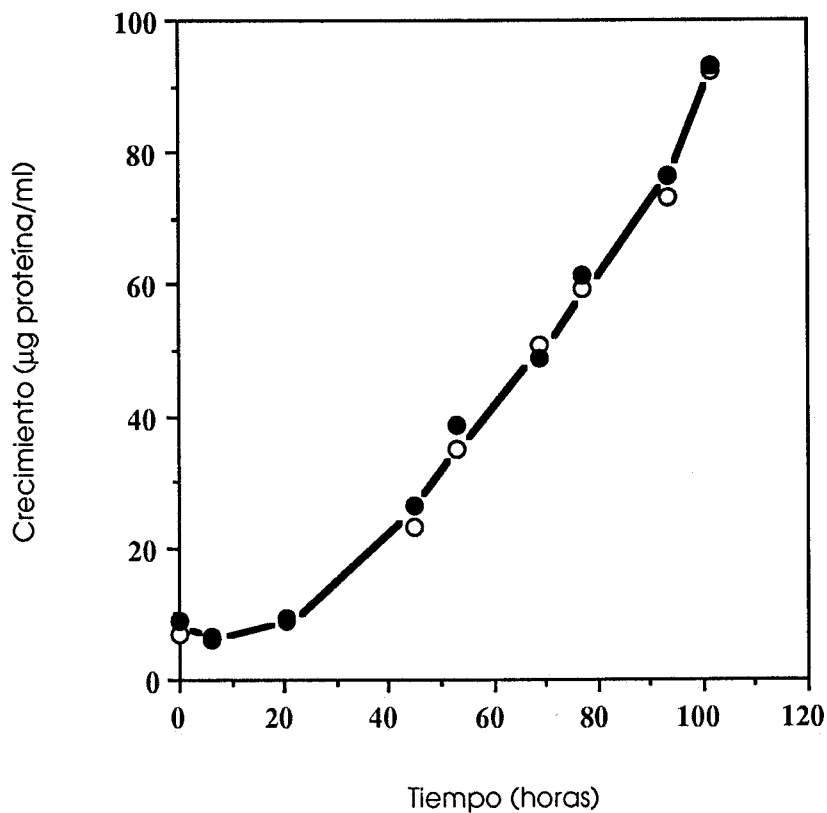
**Fig. 26. Actividad nucleasa de la estirpe mutante AMP2.**

(A) Ensayo de actividad nucleasa en geles de SDS-poliacrilamida de extractos libres de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 y la estirpe mutante AMP2. Las muestras contenían 10  $\mu\text{g}$  de proteína. La flecha señala la banda de actividad correspondiente a la proteína NucA.

(B) Ensayo de actividad nucleasa en los sobrenadantes de cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 (5,96  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml) y la estirpe mutante AMP2 (6,12  $\mu\text{g}$  de clorofila/ml). 0,5  $\mu\text{g}$  de ADN del fago lambda se incubaron, a 37°C durante 30 min, en presencia de 1,5  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de cada cultivo. Como comparación, se incluyó también en la electroforesis ADN del fago lambda sin digerir. A la izquierda se muestran, en kb, los patrones de tamaño empleados.

nucleasa total liberada en la estirpe mutante. No obstante, debe existir en el medio extracelular de *Anabaena* sp. PCC 7120 alguna otra nucleasa, distinta de NucA, dado que en el ensayo de la estirpe mutante AMP2 se aprecia una cierta degradación del ADN del fago lambda (figura 26B).

Finalmente, se estudió la velocidad de crecimiento de la estirpe AMP2 en comparación con la de la estirpe silvestre. Como se muestra en la figura 27, ambas estirpes presentan similar tasa de crecimiento, de lo que se deduce que la proteína NucA no es esencial para el crecimiento de *Anabaena* sp. PCC 7120 en condiciones de laboratorio.



**Fig. 27.** Crecimiento de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la estirpe mutante AMP2.

Células de las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7120 (○) y AMP2 (●) se resuspendieron en medio de cultivo BG11, a una densidad celular inicial de 0,1 µg de clorofila/ml, y se incubaron en condiciones de cultivo durante varios días. Periódicamente se tomaron muestras de los cultivos, en las cuales se determinó la concentración de proteína.



### 3.6. PRUEBAS DE LA EXISTENCIA DE UN INHIBIDOR DE LA PROTEÍNA NucA. IDENTIFICACION DEL GEN *nucA*.

En este apartado se describe la presencia de un inhibidor de la proteína NucA en extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de una serie de cianobacterias filamentosas y se presentan diversos experimentos encaminados a caracterizar la inhibición ejercida por los extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120. Por otro lado, se describe la presencia de un inhibidor de la proteína NucA en extractos de células de *E. coli* portadoras de diversos plásmidos conteniendo la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 en que se localiza el gen *nucA*. Finalmente, se describen experimentos encaminados a identificar el gen responsable de dicha inhibición.

#### 3.6.1. Presencia de un inhibidor de la proteína NucA en extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y otras cianobacterias filamentosas.

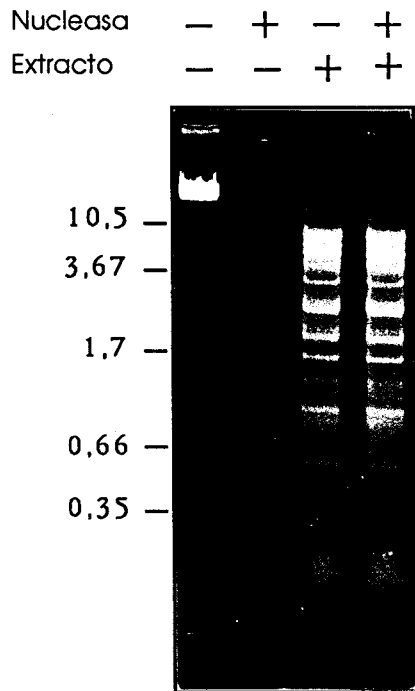
##### 3.6.1.1. Inhibición de la actividad nucleasa de la proteína NucA por extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y otras cianobacterias filamentosas.

Ya se ha mencionado que la nucleasa NucA de *Anabaena* spp. se encontraba, al menos en parte, en el medio extracelular. Por otro lado, cuando se ensayaba la actividad de los extractos de *A. variabilis* ATCC 29413 o *Anabaena* sp. PCC 7120 en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN aparecía también la banda de actividad identificada como NucA, indicando por tanto que dicha nucleasa inespecífica se encontraba también asociada a las células. Esta actividad se observaba tanto en extractos de células procedentes de cultivos sólidos (figura 4), como en extractos de células procedentes de cultivos líquidos (figura 26). Ahora bien, cuando se ensayaba la actividad de los extractos de *A. variabilis* ATCC 29413 sobre ADN del fago lambda (ver figura 2) no se observaba degradación inespecífica del mismo, como cabría esperar de la presencia de NucA en los extractos, sino únicamente la degradación ocasionada por la acción conjunta de las endonucleasas de restricción *Avr I* y *Avr II*.

La aparente discrepancia sobre la presencia de actividad nucleasa inespecífica en los extractos de *Anabaena* spp. se podría deber a las características de los dos tipos de ensayo empleados. Los ensayos de actividad sobre ADN del fago lambda y los ensayos en geles de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN son esencialmente diferentes. Mientras que en el primer caso la degradación del ADN observada puede ser el resultado de la acción conjunta de diversas moléculas presentes en la muestra, en el caso de los ensayos en SDS-poliacrilamida se visualiza la actividad correspondiente a la proteína NucA, no reflejándose el posible efecto que sobre la actividad de ésta pudieran tener otras proteínas presentes en la muestra. Existía pues la posibilidad de que los extractos de *Anabaena* spp. contuvieran alguna molécula inhibidora de la actividad de la proteína NucA, cuyo efecto no se manifestara en los ensayos en SDS-poliacrilamida pero sí en los ensayos convencionales sobre ADN del fago lambda.

Para averiguar si, en efecto, el extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120 contenía moléculas inhibidoras de la actividad de NucA, se llevó a cabo el experimento que se muestra en la figura 28. Se ensayó la actividad nucleasa de una muestra de proteína NucA obtenida de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pCSAM28) en presencia o ausencia de extracto de *Anabaena* sp. estirpe AMP2 (*nucA::npt* y, por lo tanto, carente de proteína NucA). El extracto de la cianobacteria inhibía por completo la actividad de la proteína NucA añadida, actividad que, como se muestra en la figura 28 (segundo carril), era capaz de degradar el ADN del fago lambda a fragmentos menores de 0,3 kb en ausencia de extracto de *Anabaena*. El patrón de bandas que se observaba en las muestras que contenían extracto correspondía a la digestión del ADN del fago lambda por las endonucleasas de restricción presentes en *Anabaena* sp. PCC 7120, *Ava* I, *Ava* II (Duyvesteyn *et al.*, 1983) y, presumiblemente, *Ava* III (resultados no publicados).

Por otra parte, se ensayó la presencia de moléculas inhibidoras de la actividad de la proteína NucA en los extractos de una serie de cianobacterias, que incluían varias estirpes de los géneros *Nostoc* y *Anabaena*, filogénicamente muy próximas a *Anabaena* sp. PCC 7120, así como otras dos cianobacterias formadoras de heterocistos (*Calothrix* sp. PCC 7601 y *F. muscicola* UTEX 1829) y dos cianobacterias unicelulares (*Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Synechococcus* sp. PCC 7942). Los resultados obtenidos se muestran



**Fig. 28.** Inhibición de la actividad de la proteína NucA por extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 (estirpe AMP2).

0,5  $\mu$ g de ADN del fago lambda se incubaron, como se indica en Materiales y Métodos, en presencia de proteína NucA (1  $\mu$ l), extracto de la estirpe AMP2 (150  $\mu$ g de proteína) o una combinación de ambos, durante 7 min a 37°C. Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. Se incluyó asimismo en la electroforesis ADN del fago lambda intacto. El contenido de las muestras ensayadas se indica encima de cada carril. La preparación de proteína NucA correspondía a sobrenadante de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pCSAM28) concentrado 200 veces. A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

en la figura 29. En cada caso se ensayó la actividad nucleasa, sobre ADN del fago lambda, de los diferentes extractos en presencia o ausencia de una muestra de proteína NucA. Como se observa, todos los extractos de estirpes formadoras de heterocistos eran capaces de inhibir la actividad de la proteína NucA añadida, no apreciándose diferencia entre las muestras que contenían únicamente extracto y sus equivalentes conteniendo extracto y proteína NucA. Los diferentes patrones de restricción observados correspondían a la digestión del ADN del fago lambda por las endonucleasas de restricción propias de cada estirpe. Las estirpes unicelulares ensayadas (PCC 6803 y 7942) no inhibían la actividad de la proteína NucA. En estos casos, la inclusión de proteína NucA en el ensayo sí provocaba la degradación del ADN del fago lambda.

Así pues, se puede afirmar que existen moléculas inhibitoras de la actividad de la proteína NucA en una serie de estirpes de los géneros *Nostoc* y *Anabaena*, todas ellas muy próximas a *Anabaena* sp. PCC 7120, y también en *Calothrix* sp. PCC 7601 y *F. muscicola* UTEX 1829. Sin embargo, las estirpes unicelulares ensayadas no mostraron efecto inhibitor alguno.

### 3.6.1.2. Caracterización de la inhibición ejercida por los extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 sobre la proteína NucA.

Para estudiar la naturaleza de la inhibición ejercida por los extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 sobre la proteína NucA se llevó a cabo la serie de experimentos que se presenta a continuación. En estos experimentos se emplearon extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 o de la estirpe mutante AMP2; aunque la inhibición ejercida por ambos extractos era idéntica, la utilización de la estirpe mutante AMP2 (carente de la nucleasa NucA) facilitaba en ocasiones la visualización de los resultados. Las muestras de nucleasa empleadas para los ensayos de inhibición procedían de sobrenadantes de cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadora del plásmido pCSAM28 (ver figura 21).

En primer lugar y para determinar si la inhibición era ejercida por algún metabolito dializable (sales, oligonucleótidos, etc.), se procedió a la diálisis del extracto frente a tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), empleando membranas de diálisis con un tamaño de poro que

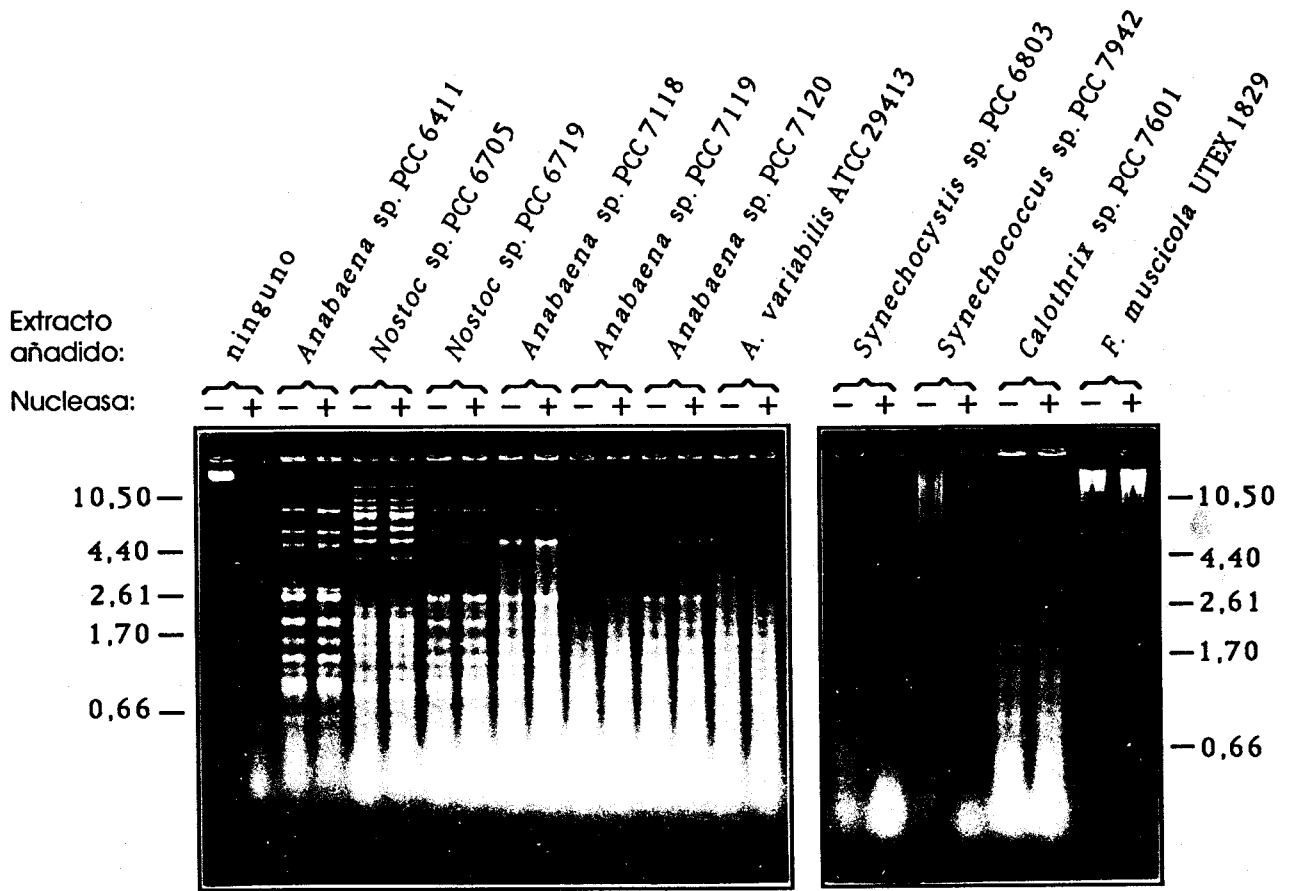


Fig. 29. Inhibición de la actividad de la proteína NuCA por extractos de diversas cianobacterias.

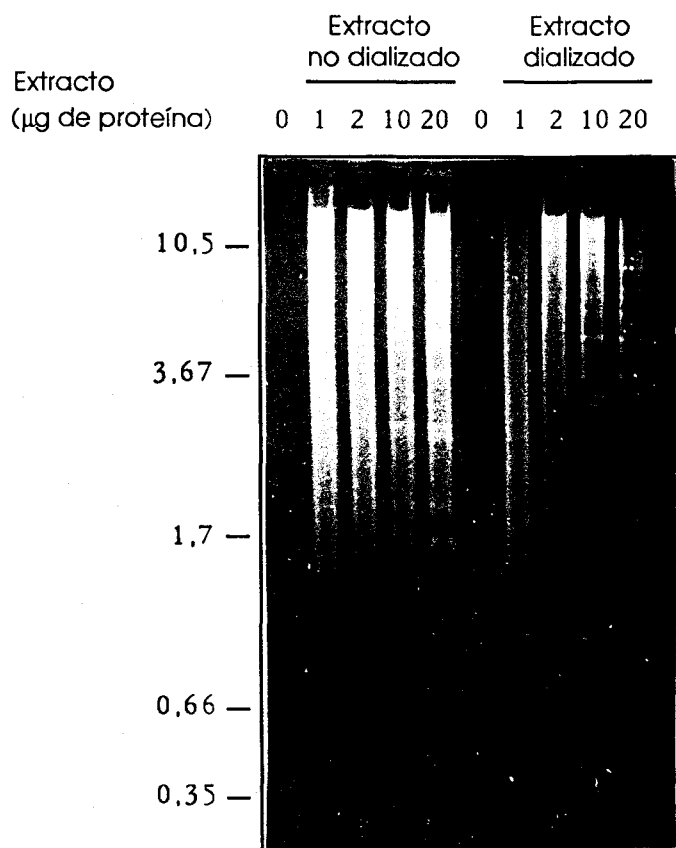
1  $\mu$ g de ADN del fago lambda se incubó, como se indica en Materiales y Métodos, en presencia de proteína NuCA (6  $\mu$ l), extracto de diferentes cianobacterias (100  $\mu$ g de proteína) o combinaciones de proteína NuCA y dichos extractos, durante 90 min a 37°C. Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. El contenido de las muestras ensayadas se indica encima de cada carril. La preparación de proteína NuCA correspondía a sobrenadante de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pCSAM28) concentrado 3,5 veces. A ambos lados se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

permitía el paso de moléculas cuyo peso fuera inferior a 8.000 Da. En la figura 30 se muestra el ensayo de la inhibición ejercida por cantidades iguales de extracto dializado y extracto no dializado sobre muestras idénticas de proteína NucA. Como se observa, la inhibición ejercida por ambos extractos resultó ser esencialmente igual, eliminándose pues la posibilidad de que dicha inhibición fuera debida a un metabolito de pequeño tamaño.

La molécula responsable de la inhibición observada resultó ser resistente al calor, al menos en presencia de las proteínas del extracto. Muestras de extracto libre de células de la estirpe AMP2 se hirvieron a 100°C durante distintos periodos de tiempo, ensayándose después la inhibición de la actividad de NucA por parte de las mismas. Como se observa en la figura 31, en todos los casos la actividad de NucA resultaba igualmente inhibida.

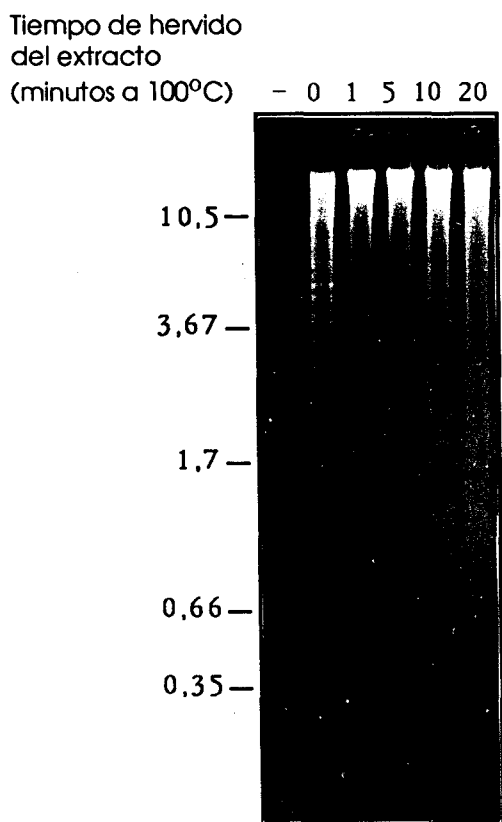
Se realizó a continuación un experimento encaminado a determinar si la inhibición observada se debía a los ácidos nucleicos (ADN y ARN) presentes en los extractos crudos. En primer lugar se llevó a cabo un aislamiento de los ácidos nucleicos presentes en el extracto de *Anabaena* sp. Para ello, extractos libres de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 se sometieron a tres extracciones sucesivas con fenol, fenol:cloroformo (1:1, v/v) y cloroformo. Los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa se precipitaron mediante adición de etanol y acetato sódico 0,3 M (pH 5,2) y se ensayó a continuación el efecto de estos ácidos nucleicos libres de proteína sobre la actividad de la proteína NucA. Como se muestra en la figura 32, los ácidos nucleicos añadidos no eran capaces de inhibir la actividad nucleasa, lo cual sugiere que el efecto inhibitorio de los extractos no era provocado por los ácidos nucleicos presentes en los mismos.

Para averiguar si la molécula inhibidora era de naturaleza protéica se llevó a cabo el experimento que se muestra en la figura 33. El extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120 se sometió a un tratamiento con proteinasa K (a 60°C) antes de ensayar la inhibición de la actividad de la proteína NucA por parte del mismo. Antes de llevar a cabo este ensayo y para evitar la degradación de la propia proteína NucA por parte de la proteasa añadida, la proteinasa K presente en el extracto se inactivó mediante calor (100°C, 10 min) y adición de PMSF 1 mM, tratamientos que se comprobó que no eliminaban el efecto inhibitorio de los extractos (de hecho, todos los ensayos de inhibición se



**Fig. 30.** Efecto de la diálisis del extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120 sobre la inhibición de la proteína NucA.

0,5  $\mu\text{g}$  de ADN del fago lambda se incubaron durante 30 min a 37°C, como se indica en Materiales y Métodos, en presencia de proteína NucA (1  $\mu\text{l}$ ) y diferentes cantidades (se indican en cada caso los  $\mu\text{g}$  de proteína añadidos) de extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120. Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. Donde se indica, las muestras de extracto añadidas procedían de un extracto dializado frente a tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). La preparación de proteína NucA correspondía a sobrenadante de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pCSAM28) concentrado 200 veces. A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

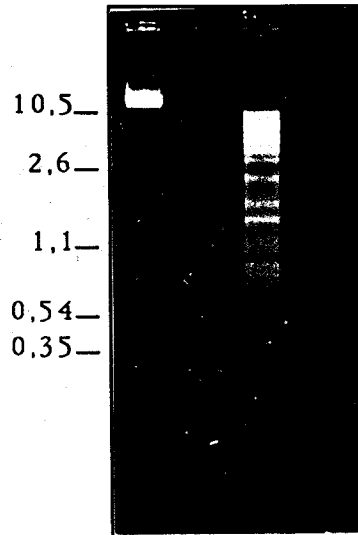


**Fig. 31.** Efecto del hervido del extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120 sobre la inhibición de la actividad de la proteína NucA.

0,5  $\mu$ g de ADN del fago lambda se incubaron durante 25 min a 37°C, como se indica en Materiales y Métodos, en presencia de proteína NucA (1  $\mu$ l) y, excepto en el carril -, extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120 estirpe AMP2 (10  $\mu$ g de proteína), previamente sometido a incubación a 100°C durante el tiempo que se indica en cada caso. Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. La preparación de proteína NucA correspondía a sobrenadante de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pCSAM28) concentrado 200 veces. A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.



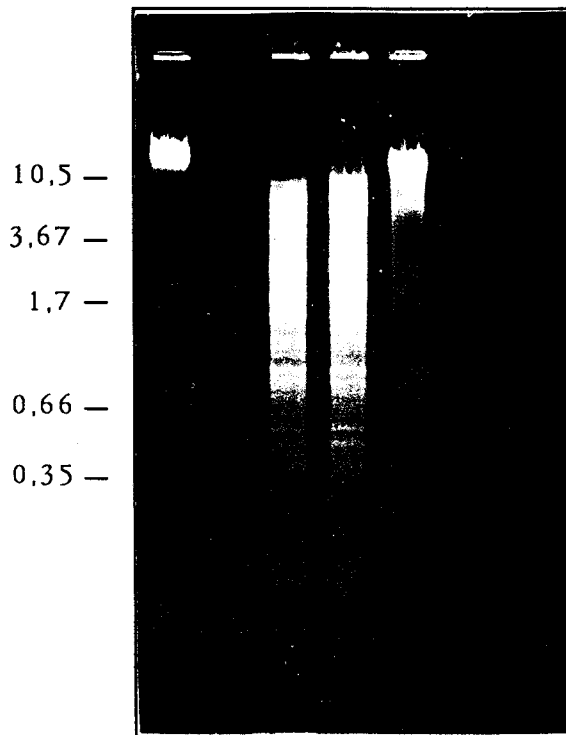
Nucleasa	-	+	+	+
Extracto de <i>Anabaena</i>	-	-	+	-
Acidos nucleicos obtenidos del extracto de <i>Anabaena</i>	-	-	-	+



**Fig. 32. Ausencia de inhibición de la actividad de la proteína NucA por parte de los ácidos nucleicos presentes en el extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120.**

0,5  $\mu$ g de ADN del fago lambda se incubaron durante 30 min a 37°C, como se indica en Materiales y Métodos, en presencia de proteína NucA (1  $\mu$ l), proteína NucA y extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120 (20  $\mu$ g de proteína) o proteína NucA junto con los ácidos nucleicos obtenidos de una muestra del mismo extracto (100  $\mu$ g de proteína). Los fragmentos generados se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. El contenido de las muestras ensayadas se indica encima de cada carril. Los ácidos nucleicos se obtuvieron mediante tres extracciones de las proteínas presentes en la muestra (fenol, fenol:cloroformo 1:1 y cloroformo), seguidas de precipitación de los ácidos nucleicos con etanol al 95% en presencia de acetato sódico 0,3 M (pH 5,2), a -80°C durante 15 min y centrifugación a 13.000 x g durante 20 min. La preparación de proteína NucA correspondía a sobrenadante de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pCSAM28) concentrado 200 veces. A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

Extracto	—	—	+	+	+	+	—
Proteínasa K	—	—	—	—	—	+	+
60°C durante 60 min	—	—	—	+	+	+	+
100°C durante 10 min	—	—	—	—	+	+	+
PMSF 1 mM	—	—	—	—	+	+	+
Nucleasa	—	+	+	+	+	+	+
	1	2	3	4	5	6	7



**Fig. 33.** Efecto del tratamiento con proteínasa K sobre la inhibición de la actividad de la proteína NucA ejercida por el extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120.

0,5  $\mu$ g de ADN del fago lambda se incubaron, como se indica en Materiales y Métodos, durante 7 min a 37°C, en presencia de proteína NucA (1  $\mu$ l) y, cuando se indica, extracto de *Anabaena* sp. PCC 7120 (50  $\mu$ g de proteína) previamente sometido o no a tratamiento con proteínasa K. El tratamiento completo con proteínasa K incluía la incubación del extracto (50  $\mu$ g de proteína) con 20  $\mu$ g de proteínasa K libre de actividad DNasa a 60°C durante 1 h, seguida de incubación a 100°C durante 10 min y adición de PMSF 1 mM. Como controles se ensayaron también muestras de extracto sometidas a diversas fases del tratamiento mencionado y una muestra de tampón Tris-HCl sometida al tratamiento completo (séptimo carril). Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. La preparación de proteína NucA correspondía a sobrenadante de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pCSAM28) concentrado 200 veces. A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

realizaban con extractos que contenían PMSF). Como se observa en la figura 33 (carriles quinto y sexto), el tratamiento con proteinasa K eliminaba el efecto inhibitor del extracto sobre la actividad de la proteína NucA, pudiendo pues concluirse que dicho efecto inhibitor era producido por una molécula sensible a la acción de la proteinasa K y, por tanto, de naturaleza proteica. Los fragmentos de restricción que se observaban en los ensayos que contenían extracto sin hervir no aparecían en el ensayo que contenía extracto hervido, lo cual era indicativo de la sensibilidad al calor de las endonucleasas de restricción contenidas en el extracto, en contraste con la insensibilidad al calor del inhibidor de la proteína NucA.

**3.6.2. Presencia de un inhibidor de la actividad de la proteína NucA en extractos de *E. coli* conteniendo plásmidos portadores de la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 donde se localiza el gen *nucA*. Identificación de ORF-135 como el gen que codifica dicho inhibidor.**

**3.6.2.1. Inhibición de la actividad de la proteína NucA por extractos de *E. coli* conteniendo los plásmidos pCSAM1, pCSAM12 o pCSAM20.**

En el subapartado anterior se ha descrito la presencia de un inhibidor de la proteína NucA en los extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120. Cabía la posibilidad de que el gen que codificara dicho inhibidor se localizara en una región de ADN próxima al gen *nucA*. Dado que se disponía de la región que contenía el gen *nucA* clonada en *E. coli*, se podía ensayar si los extractos de dichas células de *E. coli* exhibían alguna inhibición de la proteína NucA. La realización de este tipo de ensayos se veía dificultada en el caso de células de *E. coli* que contuvieran plásmidos con el gen *nucA* silvestre, dado que dichas células contenían gran cantidad de proteína NucA. Sin embargo, sí se podían emplear células que contuvieran versiones inactivadas o incompletas del gen *nucA*.

En primer lugar, se ensayaron células de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadoras de los plásmidos pCSAM1 (que contenía 2,75 kb de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 y el gen *npt* insertado en el gen *nucA*; ver figura 21), pCSAM12 o pCSAM20 (que contenían ambos 1,65 kb de ADN de *Anabaena* que incluían sólo una parte del gen *nucA*; ver figura 15).

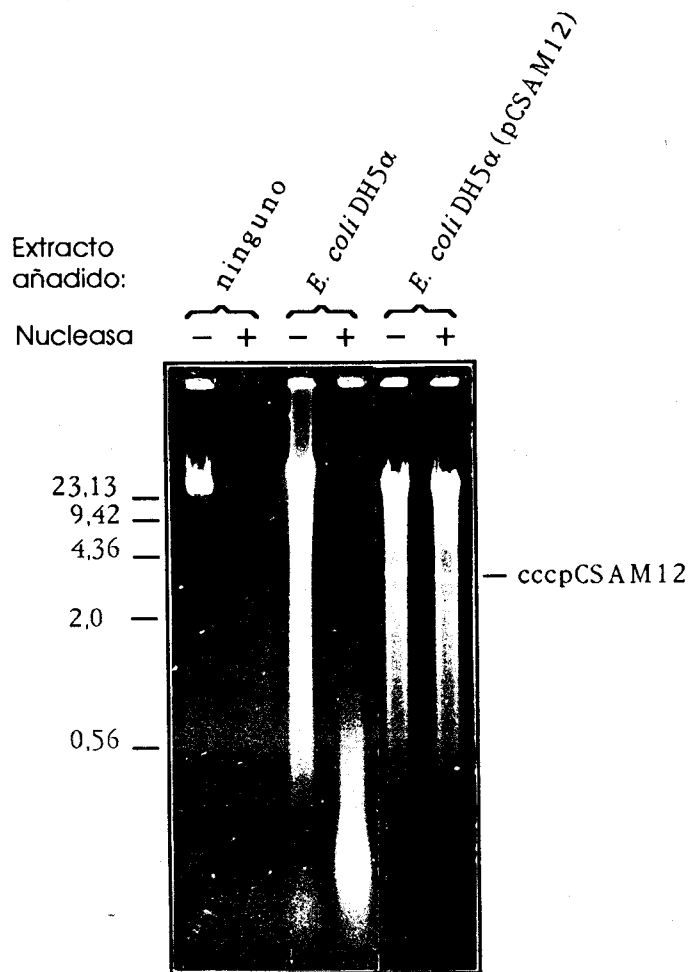
En los tres casos, los extractos de *E. coli* eran capaces de inhibir la actividad de la proteína NucA que se suministraba en los ensayos, de forma similar a la observada en los experimentos realizados con extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120. Como control se ensayó también extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$  sin ningún plásmido, que no producía efecto inhibitorio alguno. En la figura 34 se muestra el efecto del extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo el plásmido pCSAM12, que inhibía completamente la actividad de la proteína NucA. De hecho, no se apreciaba siquiera linearización del plásmido pCSAM12 contenido en el extracto, que permanecía en forma covalentemente cerrada en presencia de la proteína NucA.

Así pues, la presencia del fragmento de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 contenido en los plásmidos pCSAM12 o pCSAM20 confería a los extractos de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  la capacidad de inhibir la actividad de la proteína NucA.

### 3.6.2.2. Identificación de ORF-135 como el gen que codifica para un inhibidor de la proteína NucA.

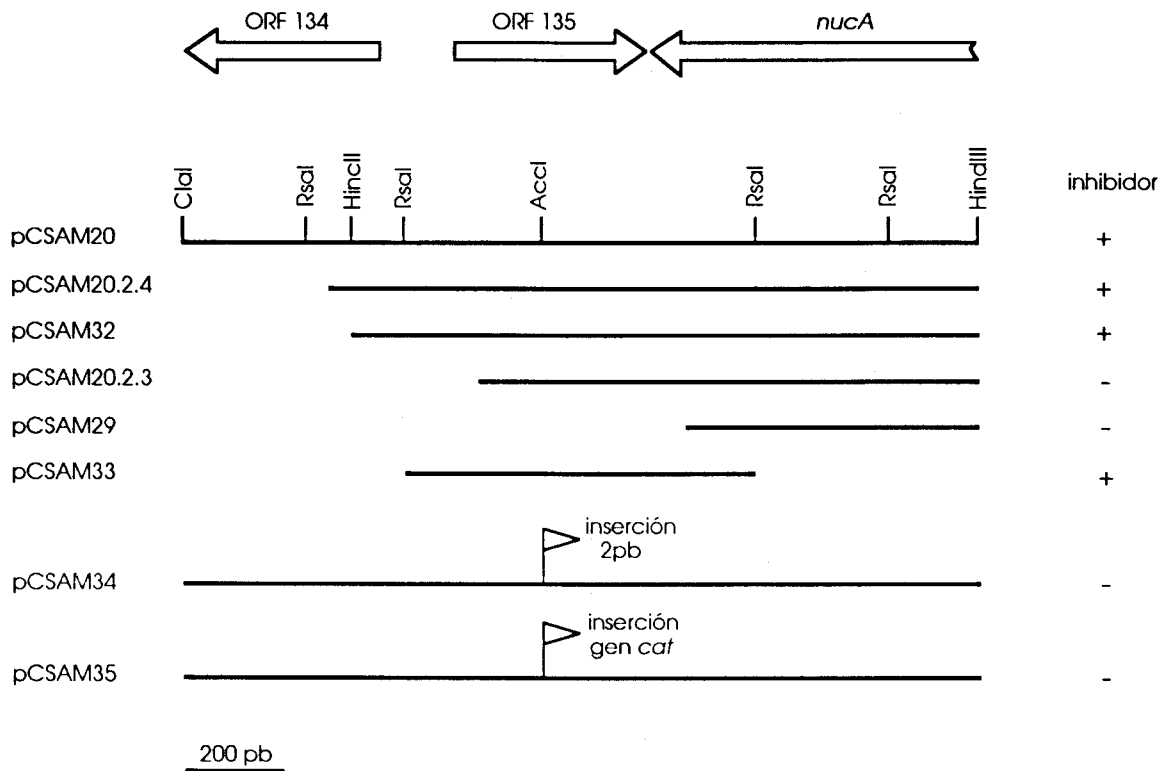
El inserto de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 contenido en pCSAM20 era de 1664 pb (había sido secuenciado en su totalidad; ver apartado 3.3). Este inserto contenía parte del gen *nucA*, correspondiente a los aminoácidos 52-274 de la proteína NucA, y dos ORFs que se habían denominado ORF-134 y ORF-135 (ver figura 17).

Para identificar la región de ADN responsable de la codificación de la proteína inhibidora se siguió una doble estrategia de subclonación y mutagénesis. En primer lugar se llevó a cabo una serie de ensayos de inhibición con células de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contenían plásmidos con versiones delecionadas del inserto contenido en pCSAM20 (pCSAM20.2.4, pCSAM32, pCSAM20.2.3, pCSAM29 y pCSAM33). Los insertos contenidos en estos plásmidos, así como los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la actividad de la proteína NucA por parte de los extractos de *E. coli* correspondientes, se recogen en la figura 35. Mientras los extractos de *E. coli* conteniendo pCSAM20.2.4 y pCSAM32 inhibían la actividad de NucA, los extractos de células portadoras de pCSAM20.2.3 no producían inhibición alguna. Según datos de secuenciación, el extremo que se muestra a la izquierda del inserto de pCSAM20.2.3 estaba situado 41



**Fig. 34. Inhibición de la actividad de la proteína Nuca por extractos de *E. coli* DH5α portadora del plásmido pCSAM12.**

0,5 µg de ADN del fago lambda se incubaron, como se indica en Materiales y Métodos, durante 10 min a 37°C, en presencia de proteína Nuca (1 µl), extracto de células de *E. coli* DH5α portadoras o no del plásmido pCSAM12 (aproximadamente 150 µg de proteína) o combinaciones de ambos. Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. Se incluyó asimismo en la electroforesis ADN del fago lambda intacto. El contenido de las muestras ensayadas se indica encima de cada carril. La preparación de proteína Nuca correspondía a sobrenadante de células de *E. coli* DH5α (pCSAM28) concentrado 200 veces. A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados. A la derecha se señala la posición del plásmido pCSAM12 covalentemente cerrado.



**Fig. 35.** Identificación de la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 responsable de la codificación del inhibidor de Nuca.

Se muestran los insertos de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 de los diversos plásmidos construidos, así como la presencia (+) o ausencia (-) de inhibición de la proteína Nuca por parte de extractos de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo cada uno de ellos. Asimismo, se muestran las ORFs localizadas en la región. pCSAM20.2.3 y pCSAM20.2.4 eran versiones delecionadas de pCSAM20, generadas mediante digestión con exonucleasa III (ver apartado 3.3.1.2 y figura 16). Para construir pCSAM32, se eliminó el fragmento *Hinc* II-*Sma* I de pCSAM20 mediante digestión con *Hinc* II y *Sma* I seguida de religación. Para construir pCSAM29, el fragmento *Bam* HI-*Hind* III de pCSAM2.13 (ver figura 12) se clonó en pUC19 digerido con *Bam* HI y *Hind* III (este plásmido contiene, por lo tanto, 70 pb del transposón mini-*kan*). Para construir pCSAM33, el fragmento *Rsa* I de 733 pb de pCSAM20 se clonó en pUC18 digerido con *Sma* I. Para construir pCSAM34, el plásmido pCSAM20 se digirió con *Acc* I y se religó tras rellenar los extremos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* (ver Materiales y Métodos). pCSAM34 carece pues del sitio *Acc* I de pCSAM20. Para construir pCSAM35, pCSAM20 se digirió con *Acc* I y, tras rellenar los extremos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli*, se ligó con el gen *cat* obtenido mediante digestión de pRL479 (S.A2/L.EHE2/C.C2, nomenclatura de Elhai y Wolk, 1988a) con *Hinc* II.

nucleótidos después del inicio de ORF-135 y, por lo tanto, dicho inserto carecía de la región de ADN correspondiente a los 14 primeros aminoácidos de la proteína que se derivaría de ORF-135 (ver figura 37). Los extractos de células conteniendo el plásmido pCSAM29, que carece de la región correspondiente a ORF-135, tampoco producían inhibición alguna. Por otro lado, los extractos de células que contenían el plásmido pCSAM33 sí inhibían la actividad de NucA. Uno de los extremos del inserto de dicho plásmido (ver figura 37) se localizaba 107 nucleótidos antes del inicio de ORF-135 y el otro dentro del gen *nucA*. Estos resultados indicaban que ORF-135 era el gen que codificaba el inhibidor de NucA.

Para confirmar esta identificación se construyeron otros dos plásmidos que contenían versiones mutantes de ORF-135. En el primero de ellos, pCSAM34, se introdujeron dos nucleótidos a nivel del sitio *Acc I* de pCSAM20 (en el centro de ORF-135, ver figura 37), lo que provocaba un desfase en la fase de lectura del gen (ver figura 35). En el segundo, pCSAM35, se introdujo en el mismo sitio *Acc I* y en ambas orientaciones el gen *cat* (cloranfenicol acetil transferasa) que confiere resistencia a cloranfenicol. Tanto en el caso de pCSAM34 como en el de pCSAM35 (ambas orientaciones), la interrupción de ORF-135 resultaba en la pérdida del efecto inhibidor por parte de los extractos de *E. coli*. Así pues, se confirmó que ORF-135 es el gen que codifica una proteína inhibidora de la actividad de NucA. Hemos denominado a dicho gen *nuiA* (*nui* de "nuclease inhibitor").

Utilizando células de *E. coli* portadoras del plásmido pCSAM33, se realizó un experimento que permitiera discernir si la inhibición ejercida por la proteína NuiA sobre la nucleasa NucA era debida a una modificación irreversible (por ejemplo degradación proteolítica) o, por el contrario, se trataba de una inhibición reversible. Para ello, se prepararon muestras conteniendo: (a) proteína NucA (b) extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo pCSAM33 o ningún plásmido y (c) proteína NucA y extracto de *E. coli* conteniendo pCSAM33 o ningún plásmido. Dichas muestras se incubaron a 37°C durante 10 min y se ensayó después su actividad nucleasa tanto en geles de SDS-poliacrilamida como sobre ADN del fago lambda en ensayos convencionales. Si se trataba de una inhibición irreversible, en el ensayo de actividad en gel de SDS-poliacrilamida no debía aparecer actividad de la proteína NucA. Si, por el contrario, se trataba de una inhibición reversible, al

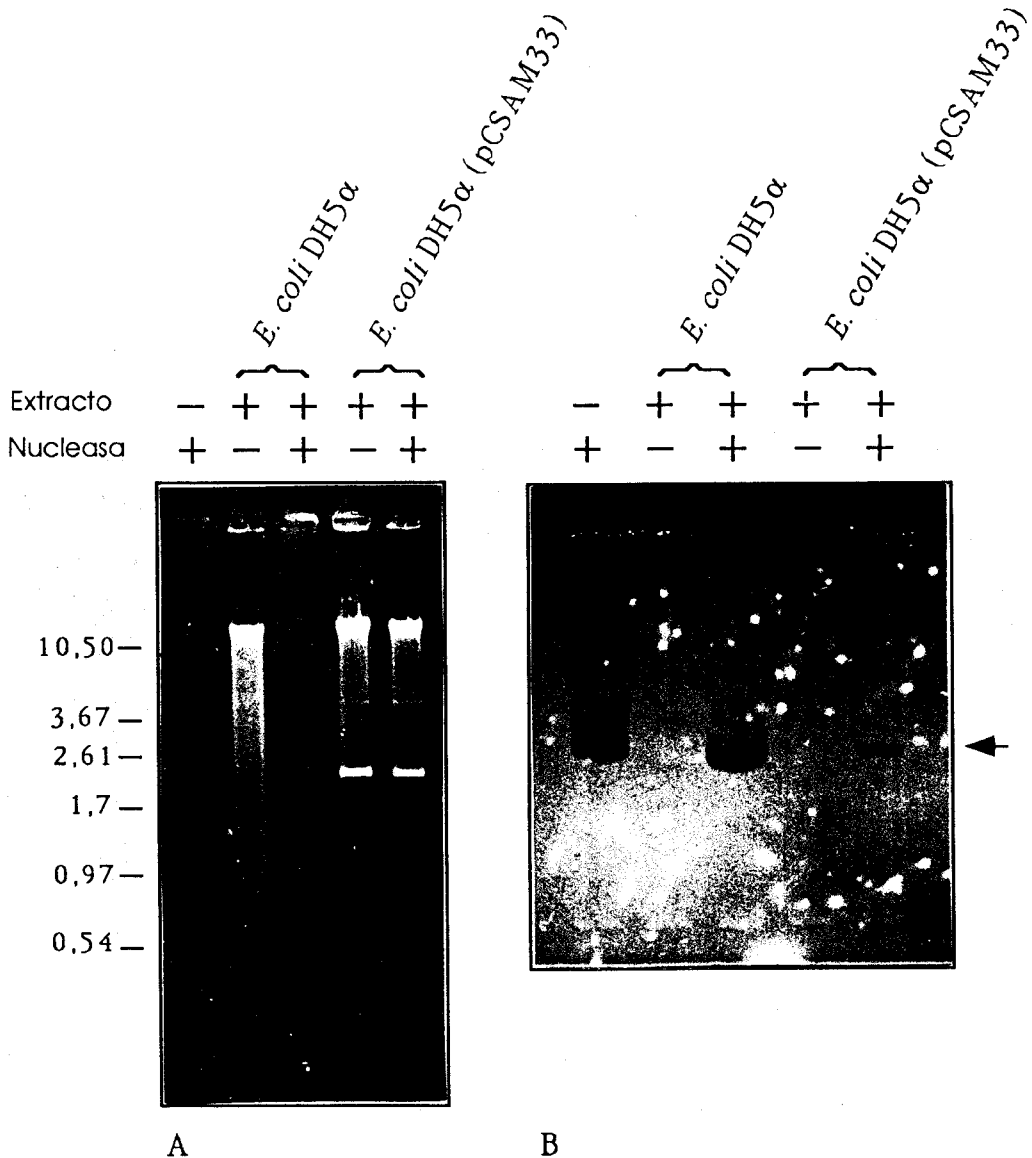
llevarse a cabo el ensayo en gel de SDS-poliacrilamida, tras la separación por tamaño de las proteínas presentes en la muestra, sí aparecería la actividad de la proteína NucA, es decir, no se observaría inhibición alguna en las muestras que contenían nucleasa y extracto inhibidor. Como se observa en la figura 36A, en el ensayo sobre ADN del fago lambda la actividad de la proteína NucA resultaba inhibida por el extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$  portadora de pCSAM33 (que contiene el gen *nuiA*), mientras que no era inhibida por los extractos de *E. coli* DH5 $\alpha$  que no contenían plásmido alguno. En el ensayo en gel de SDS-poliacrilamida (figura 36B), mientras que la banda de actividad correspondiente a la proteína NucA no resultaba afectada por la incubación con extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$ , resultaba sensiblemente reducida en la muestra que había sido incubada con extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCSAM33). Así pues, parece que la inhibición de la actividad de la proteína NucA por parte de los extractos se corresponde con una disminución de la cantidad de proteína NucA activa en el ensayo en gel de SDS-poliacrilamida. Esto podría deberse bien a destrucción irreversible de la proteína NucA por parte de la proteína inhibidora, bien a la formación de un complejo inactivo no disociable mediante el tratamiento aplicado para solubilizar las muestras antes de la electroforesis en SDS-poliacrilamida.

### 3.6.2.3. Análisis del gen *nuiA* (ORF-135).

La secuencia de nucleótidos de ORF-135 se analizó mediante la aplicación de un algoritmo ("Testcode") propuesto por Fickett (1982) contenido en la aplicación informática MacMolly. La aplicación de dicho algoritmo proporciona una estimación de la probabilidad de que una determinada secuencia de nucleótidos sea codificadora. Se considera que una región es codificadora, con una probabilidad mayor del 95%, cuando el valor obtenido tras la aplicación del algoritmo Testcode es superior a 0,95. En el caso de ORF-135, el valor obtenido fue de aproximadamente 1,05, lo cual indicaba que se trataba, con elevada probabilidad, de una región codificadora.

En la figura 37 se presenta la secuencia de nucleótidos del fragmento *Rsa* I de 733 pb contenido en pCSAM33, en la orientación en que dicho fragmento aparece en la figura 35. Se presenta también la secuencia de aminoácidos que se deduce de la secuencia de





**Fig. 36.** Inhibición de la actividad de la proteína NuCA por los extractos de *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo pCSAM33.

Mezclas conteniendo proteína NuCA (1  $\mu$ l), extracto de *E. coli* DH5 $\alpha$  o *E. coli* DH5 $\alpha$ (pCSAM33) (130  $\mu$ g de proteína) o ambos se incubaron en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) conteniendo MgCl<sub>2</sub> 10 mM durante 10 min a 37°C. Utilizando porciones de cada una de las mezclas mencionadas se ensayó la actividad nucleasa sobre ADN del fago lambda (A) o en gel de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN (B).

(A) Alícuotas conteniendo 6  $\mu$ l de las muestras arriba mencionadas se incubaron en presencia de 0,5  $\mu$ g de ADN del fago lambda durante 7 min a 37°C. Los fragmentos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,7%. A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

(B) Alícuotas conteniendo 1  $\mu$ l de las muestras arriba mencionadas se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida conteniendo ADN. La flecha señala la banda de actividad de la proteína NuCA.

El contenido de las muestras ensayadas se indica encima de cada carril. La preparación de proteína NuCA correspondía a sobrenadante de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (pCSAM28) concentrado 200 veces.

<u>GTACCGTTAGAAATAATTAAGTTTAAACAAAAATTCTGTTGCTGACCAAAATGCAGATAAAGAAGCAATACACTTTAT</u>	79
RsaI	
Met Thr Lys Thr Asn Ser Glu Ile Leu Glu Gln Leu Lys	
ACTTGATTGAATAACTCTCTTATGGTTTATG ACC AAA ACC AAC TCA GAA ATT TTA GAA CAG CTA AAA	146
13	
Gln Ala Ser Asp Gly Leu Leu Phe Met Ser Glu Ser Glu Tyr Pro Phe Glu Val Phe Leu	
CAG GCA TCC GAT GGC TTG TTA TTT ATG AGT GAG TCT GAA TAC CCA TTT GAG GTT TTT TTG	206
33	
Trp Glu Gly Ser Ala Pro Pro Val Thr His Glu Ile Val Leu Gln Gln Thr Gly His Gly	
TGG GAA GGA TCT GCA CCT CCT GTT ACA CAT GAA ATA GTT TTG CAG CAA ACA GGT CAC GGA	266
53	
Gln Asp Ala Pro Phe Lys Val Val Asp Ile Asp Ser Phe Phe Ser Arg Ala Thr Thr Pro	
CAA GAT GCG CCT TTT AAA GTG <u>GTA GAC</u> ATT GAC AGC TTT TTT AGC AGA GCC ACT ACT CCC	326
AccI	73
Gln Asp Trp Tyr Glu Asp Glu Glu Asn Ala Val Val Ala Lys Phe Gln Lys Leu Leu Glu	
CAA GAC TGG TAT GAG GAT GAA GAA AAT GCT GTA GTT GCT AAA TTT CAA AAA CTG CTA GAG	386
93	
Val Ile Lys Ser Asn Leu Lys Asn Pro Gln Val Tyr Arg Leu Gly Glu Val Glu Leu Asp	
GTA ATA AAA TCG AAC TTA AAA AAC CCG CAG GTG TAT CGA CTG GGT GAG GTA GAA CTT GAT	446
113	
Val Tyr Val Ile Gly Glu Thr Pro Ala Gly Asn Leu Ala Gly Ile Ser Thr Lys Val Val	
GTT TAT GTT ATT GGT GAA ACT CCA GCA GGA AAT TTA GCT GGT ATT TCT ACT AAA GTT GTG	506
133	
Glu Thr TER	*
GAA ACT TGACCTATTACTAATTATCAACTTTACTCTCAATACTTGTTTGAATATTGGGGAAACATTAGACAAAAA	583
135	
ATCATAACCCGTCAAACTTTCTAATTCATCAACACTGACTTTATAAGCCCTCCAGTCATTATTTAATTCTGGGTCGTTG	662
GGAATATTTACTGCGATAACGCGAGTATTAGCAGTAATACCTTCAAGCCCTGAGCCTGGGCTATCTAGTAC	733
RsaI	

**Fig. 37.** Secuencia de nucleótidos de la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 contenida en pCSAM33. Traducción del gen *nuiA* (ORF-135).

Se muestra la secuencia de nucleótidos de la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 contenida en pCSAM33. Se muestra también la secuencia de aminoácidos correspondiente a la traducción de ORF-135 (gen *nuiA*) y la posición del codón de terminación del gen *nucA* (\*). Asimismo, se indica el sitio *Acc I*, en el que se introdujeron mutaciones en pCSAM34 y pCSAM35.

nucleótidos de ORF-135. El gen *nuiA* presenta dos posibles codones de iniciación (Met-1 y Met-22), ninguno de los cuales se encuentra precedido de una secuencia de unión al ribosoma identificable. Como se observa, el final del gen *nuiA* está situado a sólo 14 nucleótidos del final del gen *nuca*, cuyo codón de terminación también se señala en la figura 37.

Como ya se mencionó en el apartado 3.3, no se encontraron secuencias homólogas a la proteína deducida a partir de la secuencia de *nuiA* en los bancos de datos disponibles.

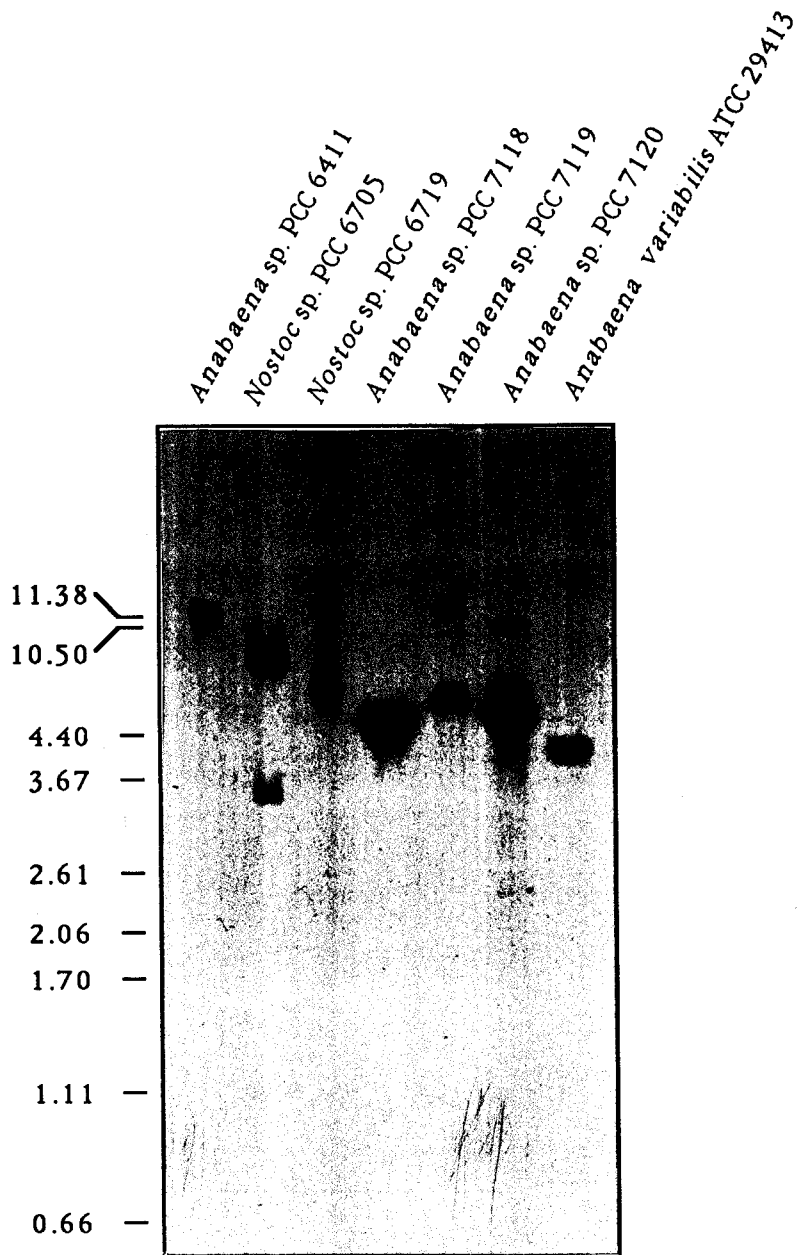
### 3.7. PRESENCIA DE SECUENCIAS HOMOLOGAS AL GEN *nucA* DE *Anabaena* sp. PCC 7120 EN EL GENOMIO DE DIVERSAS CIANOBACTERIAS. OBTENCION DE MUTANTES *nucA* DE *A. variabilis* ATCC 29413.

En este apartado se describe la presencia de secuencias homólogas al gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 en una serie de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos. Asimismo se describe la generación de mutantes *nucA* de la cianobacteria *A. variabilis* ATCC 29413 mediante recombinación entre el genomio de la misma y una copia inactivada del gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120.

#### 3.7.1. Secuencias homólogas al gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 en diversas cianobacterias.

Una vez que se dispuso de la secuencia del gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 y, por lo tanto, de una sonda interna del mismo, se procedió a estudiar la distribución de dicho gen en diversos grupos de cianobacterias mediante hibridación de la sonda mencionada con ADN total de diversas estirpes. El fragmento utilizado como sonda era de 473 pb (*Hind* III-*Bst*NI; ver figura 25) y correspondía a los aminoácidos 52-210 de la proteína NucA. Dicho fragmento incluía la zona de mayor conservación entre NucA y las nucleasas de *S. marcescens* y *S. cerevisiae* que se muestra en la figura 20 (aminoácidos 121-129 de NucA).

En un primer experimento de hibridación se emplearon algunas estirpes de los géneros *Nostoc* y *Anabaena* filogénicamente muy próximas a *Anabaena* sp. PCC 7120. Los genomios de las estirpes PCC 6411, 6705, 6719, 7118 y 7119 presentan un elevado grado de homología con el de la estirpe PCC 7120, según se deduce de estudios de reasociación de ADN (Lachance, 1981). Se incluyó además en este primer grupo *A. variabilis* ATCC 29413, que presenta algunas características fisiológicas diferentes a las estirpes anteriores. El resultado obtenido se muestra en la figura 38. Como se observa, el ADN de todas las cianobacterias pertenecientes a este grupo, incluyendo *A. variabilis* ATCC 29413, presentaba secuencias que



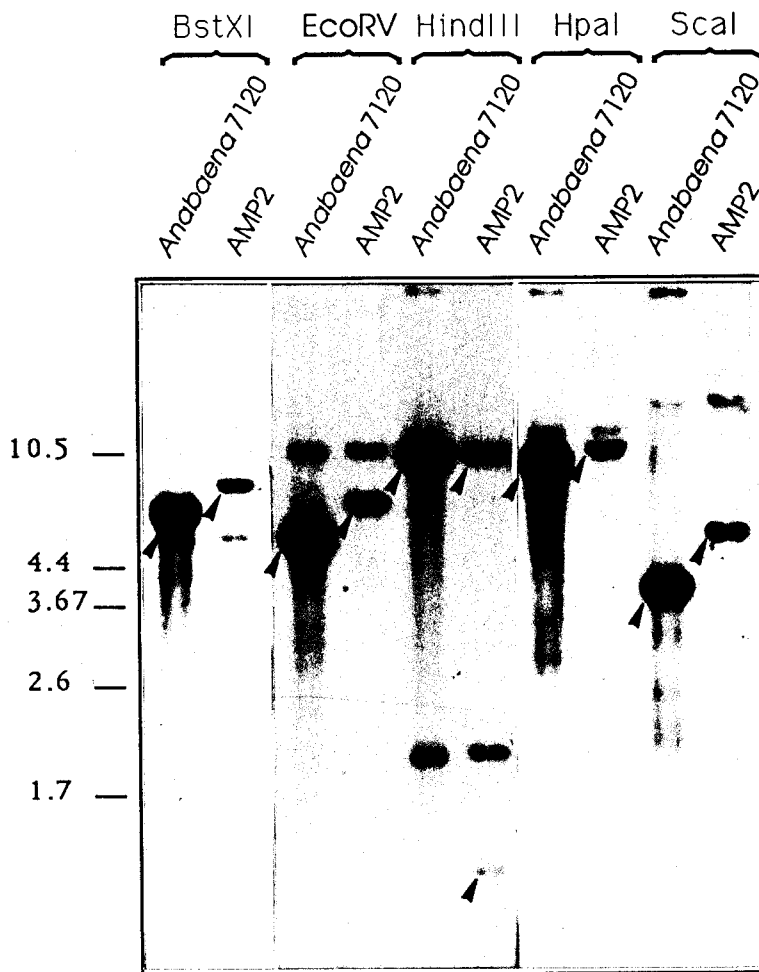
**Fig. 38.** Presencia de secuencias homólogas al gen *nucaA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 en estirpes de *Nostoc* y *Anabaena* filogénicamente próximas a la misma.

ADN total de las estirpes que se indican se digirió con *EcoR* V y se hibridó con una sonda *Hind* III-*Bst* N I de 473 pb correspondiente a los aminoácidos 52-210 de la proteína *NucA*.

La hibridación se llevó a cabo a 65°C. Los detalles experimentales se recogen en Materiales y Métodos (aptos. 2.4.4.5, 2.4.4.6 y 2.4.5.5). A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

hibridaban fuertemente con la sonda del gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Dado que la hibridación se llevó a cabo en condiciones de baja permisividad, las hibridaciones obtenidas pueden considerarse indicativas de un alto grado de homología entre las secuencias implicadas. De hecho, la hibridación obtenida en todos los casos era comparable a la obtenida con el ADN de la estirpe PCC 7120, de la que procedía la sonda usada y que se incluyó en el mismo experimento como control.

Además de la banda que mostraba fuerte hibridación, en el caso de las estirpes PCC 6705, 6719, 7119 y 7120 se observó una segunda banda (de aproximadamente 11 kb en la digestión *EcoR* V del ADN de la estirpe PCC 7120) que presentaba un grado de hibridación inferior con la sonda del gen *nucA*. En la estirpe PCC 7120, esta segunda banda de hibridación podría corresponder a alguna secuencia, diferente del gen *nucA*, que también hibridara con la sonda empleada o, por el contrario, ser el resultado de una digestión incompleta del ADN cromosómico y corresponder entonces al propio gen *nucA*. Para discernir entre ambas posibilidades, se digirió ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de la estirpe mutante AMP2 (*nucA::npt*), derivada de aquella, con diversas endonucleasas de restricción y se hibridó con la sonda interna del gen *nucA*. El resultado obtenido se muestra en la figura 39. Como se observa, además de la banda de hibridación correspondiente al gen *nucA* (que sufría un aumento de tamaño en la estirpe AMP2 debido a la inserción del gen *npt* en el gen *nucA*) se apreciaba en todos los casos una banda de hibridación débil que no correspondía al mapa de restricción de la región de ADN que contiene el gen *nucA*. Además, esta segunda banda de hibridación no mostraba aumento de tamaño en la estirpe mutante AMP2. Así pues, puede concluirse que existe en *Anabaena* sp. PCC 7120 una región de ADN, que no corresponde al gen *nucA*, que hibrida con una sonda interna de dicho gen. En cuanto al resto de las estirpes en que se encontró una segunda banda de hibridación, ésta puede corresponder, como en el caso de la estirpe PCC 7120, a otro gen diferente de *nucA*, o a la presencia de un sitio *EcoRV* en el gen *nucA* de las mismas.



**Fig. 39.** Presencia de secuencias homólogas al gen *nucA* en *Anabaena* sp. PCC 7120.

ADN total de las estirpes que se indican se digirió con *BstX* I, *EcoR* V, *Hind* III, *Hpa* I o *Sca* I, y se hibridó con una sonda de 0,6 kb, interna del gen *nucA*, que se muestra en la figura 25.

La hibridación se llevó a cabo a 65°C. Los detalles experimentales se recogen en Materiales y Métodos (aptos. 2.4.4.5, 2.4.4.6 y 2.4.5.5). A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados. Las flechas señalan las bandas correspondientes a la región que contiene al gen *nucA*.

En un segundo experimento se llevó a cabo la hibridación de la sonda del gen *nuca* de *Anabaena* sp. PCC 7120 con el ADN de una serie de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos [pertenecientes a las secciones IV y V de la clasificación propuesta por Rippka *et al.* (1979)] que presentaban diversos grados de proximidad filogénica con *Anabaena* sp. PCC 7120 (Lachance, 1981), menores en todo caso al de las estirpes incluídas en la figura 38. Por ello, la hibridación se realizó en condiciones más permisivas que las empleadas en el experimento mostrado en la figura 38. El resultado obtenido se muestra en la figura 40. Como se observa, los genomios de todas las cianobacterias filamentosas probadas presentaban secuencias que hibridaban en mayor o menor grado con la sonda interna del gen *nuca* de *Anabaena* sp. PCC 7120.

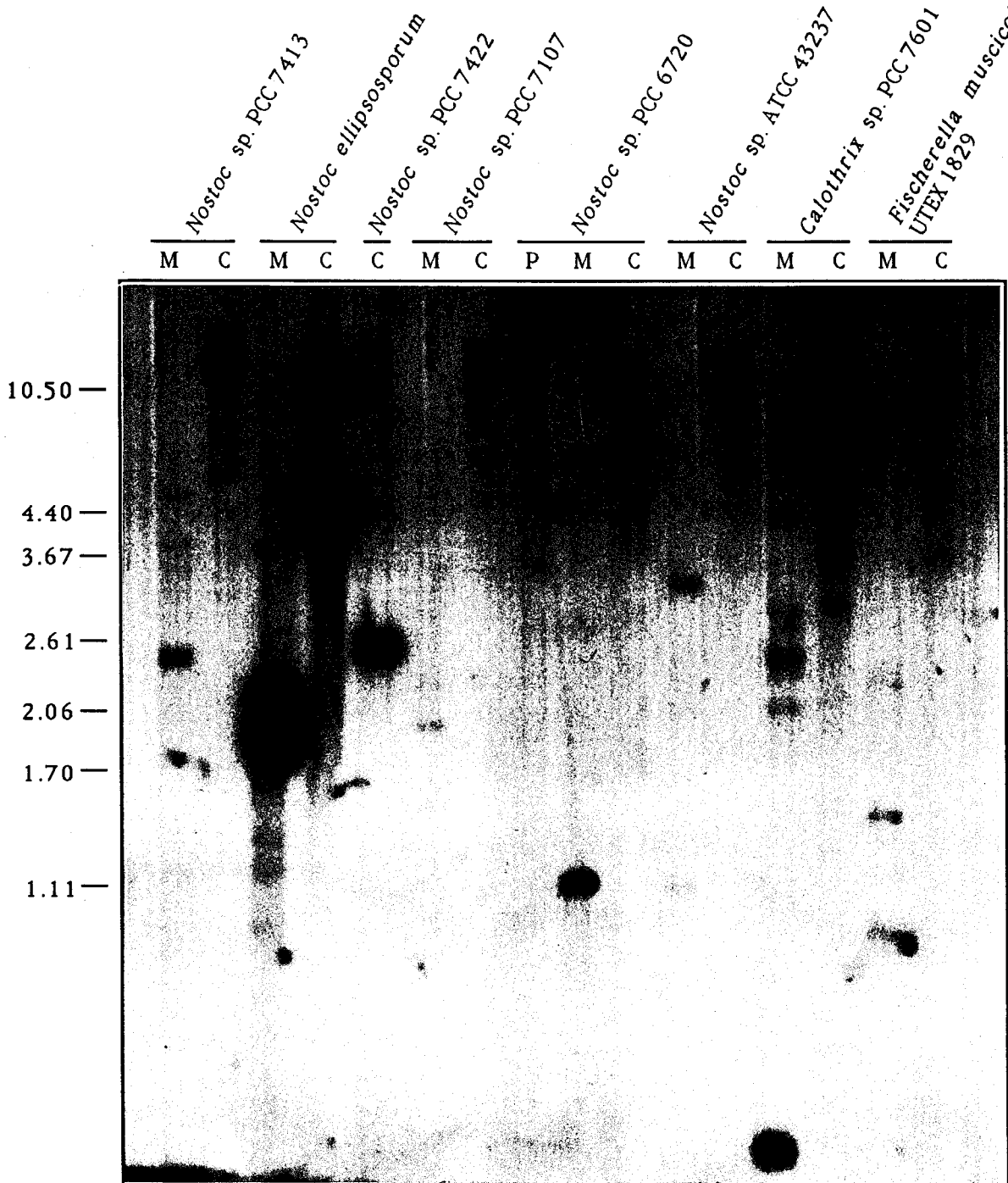
Finalmente, también se realizaron hibridaciones para determinar si había secuencias homólogas al gen *nuca* en una serie de cianobacterias unicelulares. En ninguna de las estirpes probadas (*Gloeobacter* sp. PCC 7421, *Synechococcus* spp. PCC 7202, 7425 y 7942 y *Synechocystis* spp. PCC 6308 y 6803) se obtuvieron bandas de hibridación (resultados no mostrados).

Así pues, de los experimentos descritos se deduce la presencia de secuencias homólogas al gen *nuca* en todas las cianobacterias filamentosas probadas, pero no en las estirpes unicelulares.

### **3.7.2. Obtención de mutantes *nuca* de *A. variabilis* ATCC 29413.**

Ya se ha mostrado que la sonda del gen *nuca* de *Anabaena* sp. PCC 7120 presentaba un alto grado de hibridación con el ADN de la estirpe *A. variabilis* ATCC 29413 (ver figura 38). Esta cianobacteria ha sido objeto de numerosos estudios fisiológicos, si bien los acercamientos de tipo genético se han visto dificultados en la misma por la elevada actividad nucleasa que manifiesta. La homología encontrada planteaba la posibilidad de obtener mutantes carentes de la proteína NucA mediante recombinación del ADN de *A. variabilis* ATCC 29413 con una copia inactivada del gen *nuca* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (ver figura 25).





**Fig. 40.** Presencia de secuencias homólogas al gen *nuca* de *Anabaena* sp. PCC 7120 en diversas estirpes de cianobacterias filamentosas.

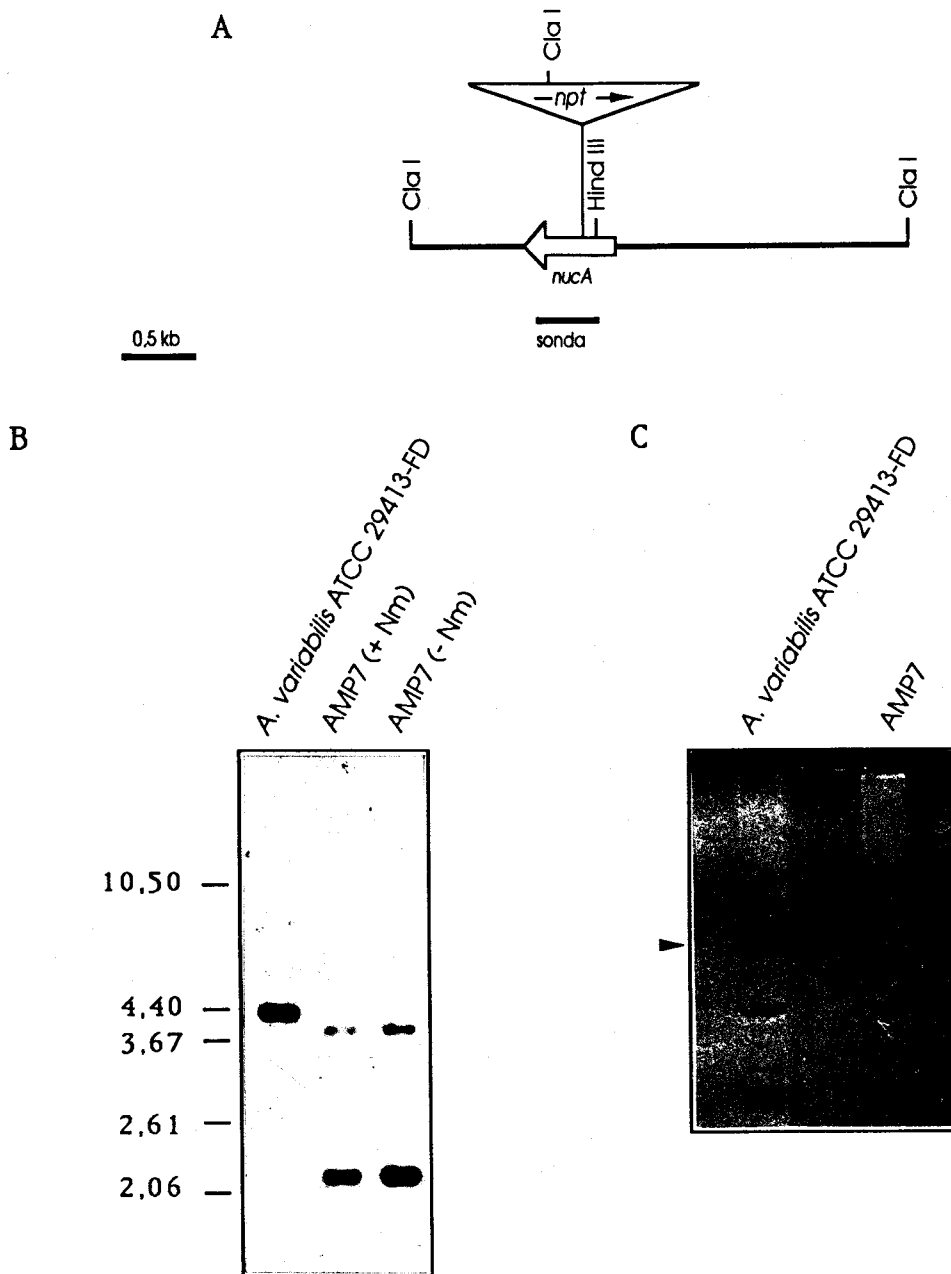
ADN total de las estirpes que se indican se digirió con *Cla* I (C), *Mva* I (M) o *Pvu* II (P) y se hibridó con una sonda *Hind* III-*Bst* N I de 473 pb correspondiente a los aminoácidos 52-210 de la proteína Nuca.

La hibridación se llevó a cabo a 55°C. Los detalles experimentales se recogen en Materiales y Métodos (aptdos. 2.4.4.5, 2.4.4.6 y 2.4.5.5). A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

Para generar mutantes *nucA* de *A. variabilis* ATCC 29413 se siguió una estrategia similar a la empleada en la obtención de mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 (ver aptdo 3.5). Dicha estrategia consistió en la introducción en *Anabaena*, mediante conjugación desde *E. coli*, de un plásmido (como pRLA4) conteniendo el gen *nucA* mutado y la selección de dobles recombinantes mediante el uso de un vector que contenía el gen *sacB* de *B. subtilis* (ver Materiales y Métodos). El plásmido a transferir a *Anabaena* era metilado antes de la conjugación por la presencia simultánea en la *E. coli* que lo contenía del plásmido pRL528, que contiene genes que codifican para enzimas que metilan las dianas de *Ava* I y *Ava* II.

La estirpe *A. variabilis* ATCC 29413 presenta dos endonucleasas de restricción (*Avr* I y *Avr* II, ver figura 2), siendo la primera de ellas un isoesquizómero de *Ava* I. Dado que el plásmido pRL528 no contiene genes de metilasas que metilen los sitios reconocidos por *Avr* II, el plásmido pRLA4 (que contenía un sitio *Avr* II) no estaría protegido frente a la digestión por la endonucleasa *Avr* II cuando fuese introducido en *A. variabilis* ATCC 29413. Se construyó un plásmido (pRL6), derivado de pRL4, en el cual el sitio *Avr* II se destruyó por digestión con las endonucleasas *Spe* I y *Avr* II y posterior recircularización (la secuencia obtenida tras ligar los extremos generados por *Spe* I y *Avr* II no es reconocida por *Avr* II). Finalmente, para llevar a cabo la conjugación hubo de emplearse la estirpe FD de *A. variabilis* ATCC 29413 (Currier y Wolk, 1979) cultivada a 40°C. Esta estirpe es la única con la que previamente se había tenido éxito en la transferencia de ADN a *A. variabilis* ATCC 29413 mediante conjugación (Maldener *et al.*, 1991; Murry y Wolk, 1991).

En la figura 41A se muestra un diagrama de la versión inactivada del gen *nucA*, contenida en pRLA6, que se utilizó para obtener mutantes de *A. variabilis* ATCC 29413. Siguiendo el procedimiento de selección de dobles recombinantes descrito en la figura 24, se obtuvieron estirpes mutantes carentes de actividad de la proteína NucA (AMP7 a AMP14). La caracterización genética de uno de estos mutantes, la estirpe AMP7, se presenta en la figura 41. El análisis de hibridación con la sonda del gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 mostró que en el mutante se había producido la sustitución del gen silvestre por la versión inactivada introducida en *A. variabilis*



**Fig. 41.** Obtención de mutantes *nucA* de *A. variabilis* ATCC 29413-FD mediante sustitución del gen silvestre por una copia mutada del gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Estructura cromosómica y actividad nucleasa de la estirpe mutante AMP7.

(A) Se muestra la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 que contiene la versión inactivada del gen *nucA* empleada para obtener mutantes de la estirpe ATCC 29413 y la zona del gen *nucA* utilizada como sonda en la hibridación que se presenta.

(B) Estructura cromosómica de la estirpe mutante AMP7. ADN total de *A. variabilis* ATCC 29413-FD y de la estirpe mutante derivada de ésta AMP7 (cultivada en presencia o ausencia de neomicina) se digirió con *Cla* I y se hibridó con la sonda *Hind* III-*Bst* N I de 473 pb que se indica en (A). A la izquierda se indican, en kb, los patrones de tamaño empleados.

(C) Ensayo de actividad nucleasa en gel de SDS-poliacrilamida de extractos libres de células de *A. variabilis* ATCC 29413-FD y de la estirpe mutante AMP7. Las muestras contenían 40  $\mu$ g de proteína. La flecha señala la banda de actividad correspondiente a la proteína NucA.

ATCC 29413-FD (ver figura 41B). Este mutante carecía totalmente de actividad de la proteína NucA visualizada en geles de SDS-PAGE (ver figura 41C).

Dado que en la estirpe mutante se había producido un evento de doble recombinación entre el ADN de *A. variabilis* ATCC 29413-FD y el fragmento de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 introducido, ha de considerarse que existe una elevada homología entre las secuencias de la región que contiene el gen *nucA* en ambas estirpes.

Al igual que ocurría en el caso del mutante AMP2, derivado de *Anabaena* sp. PCC 7120, (ver figura 27), el mutante AMP7 presentaba idénticas características de crecimiento que la estirpe silvestre de la que deriva (resultados no mostrados).

## **4. DISCUSSION**

Se ha identificado y caracterizado un polipéptido con actividad nucleasa presente en las células y el medio de cultivo de las cianobacterias filamentosas *Anabaena* sp. PCC 7120 y *A. variabilis* ATCC 29413. Dicho polipéptido presentaba un peso molecular de aproximadamente 29.000 y un punto isoeléctrico de 5,8, datos ambos que se confirmaron una vez que se dispuso de su secuencia de aminoácidos.

Para la identificación y caracterización de dicha enzima ha sido fundamental la utilización de un ensayo de actividad en geles de SDS-poliacrilamida. Se habían descrito diversos ensayos para enzimas con actividad nucleasa que incluyen la separación de las proteínas de la muestra mediante electroforesis desnaturizante. En algunos de ellos la electroforesis se realiza en geles que contienen un sustrato embebido en la matriz, cuya digestión se visualiza mediante adición de bromuro de etidio (Rosenthal y Lacks, 1977) o autorradiografía, si se trata de un sustrato marcado radiactivamente (Harosh *et al.*, 1991). En otros casos, la electroforesis se realiza en ausencia del sustrato y, posteriormente, el gel se incuba sobre otro gel que contiene el sustrato, en el que se visualiza la actividad (Focareta y Manning, 1987). De entre estos ensayos, se escogió la modalidad en la que la electroforesis se lleva a cabo en presencia del sustrato y la actividad se revela mediante la adición de bromuro de etidio. Este ensayo permite utilizar como sustrato cualquier tipo de ácido nucleico, incluyendo ADN de cadena doble y plásmidos circulares covalentemente cerrados, además de ADN de cadena sencilla o ARN.

La utilización de este tipo de ensayos permite identificar cuál o cuáles son los polipéptidos responsables de una determinada actividad. Utilizando geles que contenían diversos sustratos se han podido identificar diferentes actividades llevadas a cabo por la nucleasa obtenida a partir de las células de *Anabaena* spp. Se ha determinado que esta nucleasa es activa frente a diversos tipos de sustratos, que incluyen ADN de doble cadena o cadena sencilla y ARN, degradándolos a fragmentos de muy pequeño tamaño. Además, esta nucleasa es capaz de degradar ADN circular covalentemente cerrado, lo que indica que posee actividad endonucleasa. La nucleasa de *Anabaena* sp. PCC 7120 clonada en *E. coli* exhibe igualmente todas las actividades mencionadas. Utilizando nucleasa clonada se determinó además que la actividad endonucleasa tenía lugar, en primera

instancia, por el corte de una de las dos cadenas del ADN, más que mediante la rotura de la doble cadena, dado que se observaba en primer lugar la conversión del plasmido circular cerrado covalentemente en circular abierto y, posteriormente, la linearización de este último (ver figura 23). Los ensayos realizados sobre ADN del fago lambda parecen indicar que se trata de una nucleasa inespecífica, si bien no se puede excluir la posibilidad de que la nucleasa de *Anabaena* spp. muestre un cierto grado de especificidad por alguna secuencia corta en el ADN. Este fenómeno se ha observado en una nucleasa aparentemente inespecífica de *Streptomyces glaucescens* que sin embargo muestra fuerte preferencia por dinucleótidos CC (Aparicio *et al.*, 1992).

Utilizando ensayos en geles de SDS-poliacrilamida se ha determinado también que la nucleasa de *Anabaena* spp. exhibe un requerimiento estricto por cationes. De los cationes divalentes ensayados, el  $Mn^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$  eran los que proporcionaban mayor actividad, seguidos del  $Co^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$ , mientras que el  $Zn^{2+}$  no permitía que se desarrollara la actividad. El requerimiento por cationes divalentes, y, sobre todo, el requerimiento por  $Mg^{2+}$ , está muy extendido entre diversos tipos de enzimas con actividad nucleasa. Así, por ejemplo, es un requerimiento estricto de todas las endonucleasas de restricción (Yuan, 1981).

Se ha clonado un fragmento de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 que contiene el gen que codifica la nucleasa que se describe en este trabajo, al que hemos denominado *nucA*. La nucleasa mencionada, a la que denominamos NucA, se expresa correctamente en *E. coli* cuando el vector empleado es de bajo número de copias, no presentando las células portadoras alteración alguna en su crecimiento. Sin embargo, la clonación de este gen en vectores de muy alto número de copias parecía ser inviable, como ponía de manifiesto el que se produjeran reordenaciones en los plásmidos, las cuales resultaban en la pérdida de dicho gen. Este hecho se deriva, muy probablemente, del desequilibrio que introduce en las células de *E. coli* la elevada expresión de una nucleasa, cuya actividad debe ser estrictamente regulada. La proteína NucA expresada en *E. coli* se excretaba al medio extracelular, al igual que ocurría con dicha proteína en *Anabaena* spp. De hecho, en la región amino terminal de la misma se encuentra una secuencia típica para la excreción de proteínas en bacterias gram-

negativas, como se discutirá más adelante. Esta excreción al medio extracelular probablemente contribuye a que la nucleasa clonada, al menos en plásmidos de bajo número de copias, no sea letal para las células de *E. coli*.

El gen *nucA* se localizó en el fragmento clonado mediante mutagénesis con un transposón y determinación de la actividad nucleasa que conferían en *E. coli* los plásmidos mutagenizados. La secuenciación de la región en la que se había localizado el gen permitió identificar una zona de lectura abierta en la que se localizaban dos de las inserciones del transposón que resultaban en la pérdida de actividad nucleasa. La proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de este gen consta de 274 aminoácidos y tiene un peso molecular de 29.650, el cual se corresponde con el peso molecular determinado previamente mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína NucA con las secuencias de proteínas contenidas en los bancos de datos disponibles reveló que ésta es homóloga a otras dos proteínas, ambas con actividad nucleasa. La primera de ellas es el producto del gen *nuc* de la enterobacteria *Serratia marcescens*, una nucleasa extracelular (Ball *et al.*, 1987). La otra proteína es el producto del gen *NUC1* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una nucleasa de codificación nuclear (Vincent *et al.*, 1988) que se localiza en la membrana interna de la mitocondria (Dake *et al.*, 1988). Las tres proteínas mencionadas tienen aproximadamente el mismo tamaño (entre 266 y 329 aminoácidos) y la similitud entre sus secuencias de aminoácidos se extiende a lo largo de toda su longitud. Las nucleasas de *S. marcescens* y *Anabaena* sp. presentan 64 residuos idénticos mientras que las nucleasas de *S. cerevisiae* y *Anabaena* sp. presentan 70 residuos idénticos. Sin embargo, las nucleasas de *S. marcescens* y *S. cerevisiae* sólo presentan 48 identidades entre sí, por lo que se desconocía hasta ahora que estas proteínas fueran homólogas. La secuencia de la proteína NucA de *Anabaena* sp. PCC 7120 permite definir una nueva familia de nucleasas homólogas que incluye las tres nucleasas mencionadas. Es interesante el hecho de que la nucleasa de *Saccharomyces*, que es codificada por un gen nuclear, sea homóloga a dos proteínas procarióticas. Cabe hipotetizar que el gen *NUC1* de *Saccharomyces* se haya transferido en el curso de la evolución desde



el genomio de la mitocondria al del núcleo, como se ha sugerido, en general, para los genes nucleares codificadores de proteínas que se localizan en algún orgánulo, ya sea la mitocondria o, en algas y plantas superiores, el cloroplasto (Weeden, 1981).

Además de la homología que se deduce de la comparación de sus secuencias, las nucleasas de *Anabaena* sp., *S. marcescens* y *S. cerevisiae* presentan características catalíticas similares. Todas ellas manifiestan una baja especificidad de sustrato. Ya se ha mencionado que la nucleasa NucA era capaz de degradar ADN (de cadena doble o sencilla) y ARN. La nucleasa extracelular de *S. marcescens* degrada ácidos nucleicos de cadena doble o sencilla, independientemente de que se trate de ADN o ARN (Eaves y Jeffries, 1963; Nestle y Roberts, 1969a, 1969b). La nucleasa mitocondrial de *S. cerevisiae*, por su parte, muestra múltiples actividades que incluyen una actividad RNasa sobre ARN de cadena sencilla, una actividad endonucleasa sobre ADN de cadena doble o sencilla y una actividad 5' exonucleasa sobre ADN de cadena doble (Dake *et al.*, 1988). Por otro lado, las tres nucleasas mencionadas exhiben un requerimiento similar por cationes divalentes, obteniéndose altos niveles de actividad con  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ . A medida que se clonen y secuencien nuevos genes que codifiquen nucleasas, es probable que se encuentre que esta familia de nucleasas incluya otras proteínas, dado que se han encontrado nucleasas funcionalmente similares a la mitocondrial de *S. cerevisiae* en *Neurospora crassa* (Chow y Fraser, 1983) y en mitocondrias de músculo cardíaco bovino (Cummings *et al.*, 1987).

La nucleasa de *S. marcescens* presenta una secuencia señal típica en su extremo amino terminal, que parece ser la que dirige a la proteína al medio extracelular a través de la membrana plasmática (Ball *et al.*, 1987). Asimismo, la secuencia amino terminal de la proteína NucA presenta las características de una secuencia señal de exportación al medio extracelular, como se muestra en la figura 19, aunque desconocemos si esta secuencia señal es procesada en las células de *Anabaena* sp. o si, por el contrario, permanece en la proteína una vez secretada ésta. Desafortunadamente, no hemos podido llevar a cabo la secuenciación del extremo amino terminal de la proteína NucA, debido a la existencia de algún tipo de bloqueo en el mismo. Por último, la región amino terminal de la nucleasa de *S. cerevisiae* corresponde a una zona de elevada hidrofobicidad, que,

presumiblemente, dirige el paso de esta proteína a través de la membrana externa de la mitocondria hasta llegar a la membrana interna de la misma (Vincent *et al.*, 1988). Las secuencias señal que dirigen a las proteínas a través de la membrana plasmática de las bacterias gram-negativas presentan una disposición característica de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos (ver aptdo. 3.3 y von Heijne, 1985), al igual que ocurre con las secuencias que dirigen a las proteínas a través de las membranas mitocondriales (von Heijne, 1986b). En cianobacterias, las secuencias señal para el paso a través de la membrana plasmática descritas hasta el momento presentan características similares a las de otras bacterias gram-negativas, si bien en general son de mayor longitud (Laudenbach y Grossman, 1991; Laudenbach *et al.*, 1991; Omata, 1991). Este hecho se atribuye a la necesidad de una mayor especificidad en las secuencias señal en las cianobacterias (Laudenbach y Grossman, 1991), dado que estos organismos poseen, además de la membrana plasmática, una red interna de membranas tilacoidales, debiendo existir mecanismos que permitan dirigir correctamente las proteínas a uno u otro tipo de membrana (Omata, 1991). En cualquier caso, no existen requerimientos estrictos en cuanto a la identidad de los aminoácidos implicados en un tipo determinado de péptido señal. Esto hace que las secuencias señal no sean zonas estrictamente conservadas entre proteínas homólogas y podría ser la causa de las diferencias observadas en la región amino terminal de las tres nucleasas alineadas en este trabajo.

Aunque las identidades entre las tres nucleasas se distribuyen a lo largo de toda la secuencia, el alineamiento de las mismas muestra una zona de elevada conservación que comprende los aminoácidos 121-129 de la proteína NucA (DRGHQAPLA). En esta región de nueve aminoácidos se localizan 7 de los 29 aminoácidos conservados en las tres proteínas. Se han observado también regiones altamente conservadas en otras familias de nucleasas, en las que las identidades en las secuencias polipeptídicas no están homogéneamente distribuidas a lo largo de dichas secuencias. En estas otras familias, mientras que el entorno y los residuos implicados en el sitio activo de las nucleasas están altamente conservados, las zonas de la proteína no implicadas en la catálisis muestran una elevada variabilidad (Nakamura *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1989).

Los residuos de histidina se han identificado, tanto mediante procedimientos bioquímicos como mediante mutagénesis dirigida, como parte del centro activo de diversas nucleasas pertenecientes a distintas familias. Así por ejemplo, entre las RNasas existen enzimas que, aunque no muestren homología entre sí, contienen residuos de histidina como parte del sitio activo. Se han identificado residuos de histidina en el sitio activo de la RNasa A de páncreas bovino (Blackburn y Moore, 1982), la RNasa T1 de *Aspergillus oryzae* (Nishikawa *et al.*, 1987) y la RNasa extracelular de *Bacillus amyloliquefaciens* (Paddon y Hartley, 1987). En cuanto a DNasas, se ha identificado también un residuo de histidina en el sitio activo de la DNasa I bovina (Price *et al.*, 1969). El hecho de que se encuentre un residuo de histidina (His-124 en la proteína NucA) en un entorno de residuos altamente conservados sugiere que este aminoácido pudiera estar implicado en la catálisis mediada por las nucleasas pertenecientes a la familia definida en este trabajo. De hecho, el entorno del residuo de histidina implicado en la reacción llevada a cabo por la DNasa I bovina (VALHSAPSD) contiene varios aminoácidos idénticos a los encontrados en el entorno de la His-124 de la proteína NucA y de las histidinas correspondientes en las nucleasas de *S. marcescens* y *S. cerevisiae*.

Como se describe en los apartados 3.5 y 3.7, se han obtenido mutantes *nucA* a partir de *Anabaena* sp. PCC 7120 y *A. variabilis* ATCC 29413, mediante sustitución del gen silvestre por una copia mutada del mismo. Estos mutantes carecen de la nucleasa NucA. En ambos casos, los mutantes obtenidos mostraban idénticas características de crecimiento que la estirpe silvestre correspondiente, por lo que la proteína NucA no parece ser esencial para el crecimiento de estas cianobacterias en condiciones de laboratorio. La función de la nucleasa NucA se desconoce por el momento. Como enzima extracelular y degradativa podría tener un papel nutricional. Sin embargo, según uno de los pocos estudios realizados a este respecto, *Anabaena* sp. PCC 7118, una estirpe no fijadora de N<sub>2</sub> muy próxima a *Anabaena* sp. PCC 7120 (Lachance, 1981), no puede usar nucleósidos como fuente de nitrógeno (Neilson y Larsson, 1980). Por otra parte, no se ha investigado si la nucleasa NucA tiene algún papel en la asimilación de fósforo.

Los mutantes *nucA* de *Anabaena* que se han generado en este trabajo pueden resultar útiles en experimentos de biología molecular, en aspectos como el aislamiento de ácidos nucleicos o la transferencia de ADN. Por ejemplo, podrían representar un primer paso hacia la obtención de estirpes transformables de *Anabaena* sp. Recientemente se ha podido transformar *Vibrio cholerae*, una bacteria no transformable en su estado natural, gracias a la inactivación de dos genes que codifican nucleasas extracelulares (Focareta y Manning, 1991). Una de estas nucleasas, clonada en *E. coli*, dificultaba la transformación de dichas células (Focareta y Manning, 1987). Un fenómeno similar se ha observado en la transformación de células de *E. coli* portadoras del gen *nucA*, las cuales muestran una frecuencia de transformación disminuida (ver tabla 5). Finalmente, se puede mencionar que el empleo de los mutantes obtenidos ha de facilitar el estudio de otras enzimas relacionadas con el metabolismo de los ácidos nucleicos.

Como se describe en el apartado 3.6, se ha encontrado un efecto inhibitorio de la actividad de la proteína NucA en los extractos de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. Este efecto inhibitorio impide observar la actividad nucleasa correspondiente a la proteína NucA en ensayos convencionales de actividad de los extractos crudos de dicha cianobacteria sobre ADN del fago lambda, y es también capaz de inhibir la actividad de la proteína NucA cuando ésta se añade en exceso al ensayo. La presencia en los extractos celulares de moléculas inhibitorias asociadas a diversas proteínas con actividad nucleasa se ha descrito previamente (Blackburn y Moore, 1982; Moore, 1981; Hartley, 1988). En muchos otros casos, si bien no se han identificado dichas moléculas, se presume que puedan existir y ejercer un papel clave en la regulación de la actividad de las nucleasas (Puyet *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 1990). La presencia de un inhibidor intracelular podría constituir un sistema eficiente de protección del ADN genómico de la cianobacteria frente a la degradación por parte de la proteína NucA. Cabe mencionar que no se ha descrito la presencia de inhibidores para las nucleasas correspondientes ni en *S. marcescens* ni en *S. cerevisiae*. Por otro lado, y como ya se ha mencionado, la proteína NucA se exporta al exterior de las células de *Anabaena* spp., pudiendo representar éste asimismo un mecanismo de protección.

Los inhibidores de nucleasas pueden actuar esencialmente de dos formas distintas. Por un lado, el efecto inhibitorio puede llevarse a cabo a nivel del ADN, uniéndose el inhibidor al mismo e impidiendo el ataque por parte de la nucleasa. Es el caso, por ejemplo, de la proteína gam del fago Mu, que se une a los extremos del ADN lineal de dicho fago e impide la digestión de dicho ADN por parte de las exonucleasas de *E. coli* durante el proceso de infección (Akroyd *et al.*, 1986). El otro mecanismo, quizá más frecuente entre los sistemas descritos en la literatura, consiste en la interacción, reversible o no, de la molécula inhibidora con la nucleasa, de forma que el complejo es inactivo. Este es el caso del inhibidor de la RNasa pancreática (Blackburn y Moore, 1982), del inhibidor de la DNasa I (Moore, 1981), del inhibidor de la RNasa extracelular de *B. amyloliquefaciens* (Hartley, 1988) y de las proteínas de inmunidad asociadas a las colicinas con actividad nucleasa (Luria y Suit, 1987). Alguno de los complejos nucleasa-inhibidor mencionados se conocen desde hace algunos años y han sido empleados como modelos para el estudio de las interacciones proteína-proteína (Hartley, 1989).

Se ha determinado que la inhibición ejercida por los extractos de *Anabaena* es debida a material de naturaleza proteica, y se ha identificado un gen (*nuiA*), contiguo al gen de la nucleasa NucA de *Anabaena* sp. PCC 7120, como responsable de la codificación de un inhibidor de la misma. Se desconoce, sin embargo, si dicha proteína es la única responsable de la inhibición observada en los extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 o si hay algún otro inhibidor implicado. La generación de mutantes de *Anabaena* sp. afectados en el gen de dicho inhibidor permitirá discernir entre ambas posibilidades. Se desconoce asimismo el mecanismo de la inhibición ejercida por los extractos de *Anabaena* sp. sobre la actividad de la proteína NucA, aunque los experimentos de inhibición realizados con extractos de *E. coli* portadores del gen *nuiA* parecen indicar que el producto de dicho gen interacciona de algún modo con la proteína NucA. Así, después de la incubación de mezclas de preparaciones de la proteína NucA y extractos conteniendo el inhibidor NuiA, se reduce la cantidad de proteína NucA activa que se detecta en geles de SDS-poliacrilamida (ver figura 36). Esta reducción de actividad podría deberse a la formación de un complejo nucleasa-inhibidor no disociable en las

condiciones ensayadas o bien a una inactivación irreversible de la nucleasa por parte de la proteína inhibidora.

Todas las estirpes filamentosas formadoras de heterocistos probadas presentan en su ADN secuencias homólogas al gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 y, en todos los casos en que se ensayó la actividad nucleasa en geles de SDS-poliacrilamida, la presencia de dichas secuencias se correspondía con la presencia de una nucleasa de aproximadamente 29 kDa (ver figura 4). La única excepción resultó ser *F. muscicola* UTEX 1829, una estirpe de la sección V, que es la filogénicamente más alejada de *Anabaena* sp. PCC 7120 entre las cianobacterias formadoras de heterocistos probadas (Giovannoni *et al.*, 1988), que no presentaba actividad nucleasa en el ensayo en geles de SDS-poliacrilamida, bien porque dicho ensayo no fuera apropiado para la nucleasa de esta estirpe, bien porque las secuencias homólogas al gen *nucA* observadas en la misma no codificaran una proteína activa. Los extractos de esta estirpe, sin embargo, sí mostraban efecto inhibidor de la actividad de NucA. Asimismo, los extractos de todas las estirpes que exhibían actividad de la proteína NucA en el ensayo en SDS-poliacrilamida eran capaces de inhibir la actividad de la proteína NucA de *Anabaena* sp. PCC 7120 (ver figura 29). Las estirpes unicelulares ensayadas no mostraban actividad nucleasa en geles de SDS-poliacrilamida ni ejercían efecto inhibidor sobre la proteína NucA de *Anabaena*. De hecho, ninguna de ellas contenía secuencias homólogas al gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Cabe concluir, por lo tanto, que la nucleasa de baja especificidad de sustrato investigada en este trabajo se encuentra ampliamente distribuida entre las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, que forman un grupo filogénicamente coherente dentro de las cianobacterias (Giovannoni *et al.*, 1988), sin que se pueda afirmar que su presencia sea general en estos organismos.

El gen *nucA* parece estar localizado en el megaplásmido  $\alpha$  de *Anabaena* sp. PCC 7120 (C. P. Wolk, comunicación personal). Este plásmido, de 410 kb, es el mayor de los tres grandes plásmidos encontrados en esta cianobacteria mediante técnicas de electroforesis en campo pulsante (Bancroft *et al.*, 1989). Hasta el momento, no se conocían funciones asociadas a ninguno de estos plásmidos, por lo que, al no disponerse de ningún marcador, no se había podido investigar si existen mecanismos de conjugación mediante los cuales pudieran

transferirse los mismos a otras cianobacterias. En experimentos preliminares, hemos observado la transferencia del gen *nucA* marcado (*nucA::npt*) entre cianobacterias. En el caso de que dicha transferencia se confirme, la amplia distribución del gen *nucA* entre las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos podría ser el reflejo de eventos de transferencia del plásmido  $\alpha$  entre estirpes relacionadas. Esto podría facilitar la explicación de la recombinación heteróloga observada entre la región de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 que contiene el gen *nucA* y el ADN de *A. variabilis* ATCC 29413, dado que los plásmidos presentes en ambas estirpes podrían ser filogénicamente más próximos entre sí que el ADN cromosómico de las mismas. Este hecho podría asimismo facilitar la obtención, mediante recombinación con una versión mutada del gen *nucA* de *Anabaena* sp. PCC 7120, de mutantes en el gen *nucA* derivados de otras estirpes de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos.

## **5. CONCLUSIONES**



1. Se ha identificado un polipéptido de aproximadamente 29 kDa como responsable de al menos parte de la actividad nucleasa observada en una serie de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, entre las que se encuentran *Anabaena* sp. PCC 7120 y *A. variabilis* ATCC 29413.
2. La nucleasa de 29 kDa degrada tanto ADN (de cadena doble o sencilla) como ARN y muestra asimismo actividad endonucleasa sobre moléculas de ADN circular cerradas covalentemente. La reacción catalizada presenta un requerimiento por cationes divalentes, siendo el  $Mg^{2+}$  y el  $Mn^{2+}$  los que proporcionan mayor actividad.
3. Se ha clonado y secuenciado el gen *nucA* que codifica esta nucleasa en *Anabaena* sp. PCC 7120. La mutación de dicho gen resulta en la desaparición de la nucleasa de 29 kDa en las dos estirpes de *Anabaena* mencionadas.
4. La proteína NucA presenta una posible secuencia señal para su exportación al exterior del citoplasma. De hecho, esta nucleasa se ha encontrado en el medio de cultivo de las dos estirpes de *Anabaena* estudiadas y, en cultivos de estirpes con el gen *nucA* clonado, en el de *Escherichia coli*.
5. La proteína NucA, según la secuencia de aminoácidos deducida a partir del gen *nucA*, es homóloga a otras dos nucleasas, una de la enterobacteria *Serratia marcescens* y otra de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Se ha encontrado un inhibidor de la proteína NucA en los extractos de una serie de cianobacterias filamentosas. Asimismo, se ha secuenciado un gen (*nuiA*), contiguo al gen *nucA*, que codifica una proteína inhibidora de NucA.
7. Tanto el gen *nucA* como el inhibidor de la nucleasa NucA se encuentran ampliamente distribuidos entre las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos.

## **6. REFERENCIAS**

- Akroyd, J.E., Clayson, E. y Higgins, N.P. (1986) Purification of the *gam*-gene product of bacteriophage Mu and determination of the nucleotide sequence of the *gam* gene. *Nucl. Acids Res.* 17, 6901-6914.
- Anderson, M.A., McFadden, G.I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G., Fernley, R. y Clarke, A.E. (1989) Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell* 1, 483-491.
- Aparicio, J.F., de los Reyes-Gavilán, C.G., Barbés, C., Hardisson, C. y Sánchez, J. (1988) A non-specific deoxyribonuclease with restriction function in *Streptomyces glaucescens*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2345-2351.
- Aparicio, J.F., Freije, J.M., López-Otin, C., Cal, S. y Sánchez, J. (1992) A *Streptomyces glaucescens* endodeoxyribonuclease which shows a strong preference for CC dinucleotide. *Eur. J. Biochem.* 205, 695-699.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G. Smith, J.A. y Struhl, K. (eds.) (1992) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Ball, T.K., Saurugger, P.N. y Benedik, M.J. (1987) The extracellular nuclease gene of *Serratia marcescens* and its secretion from *Escherichia coli*. *Gene* 57, 183-192.
- Bancroft, I., Wolk, C.P. y Oren, E.V. (1989) Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 171, 5940-5948.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blackburn, P. y Moore, S. (1982) Pancreatic ribonuclease. En *The Enzymes*, tercera edición (P.D. Boyer, ed), vol XV, pp 317-433. Academic Press, New York.
- Blaschek, H.P. y Klacik, M.A. (1984) Role of DNase in recovery of plasmid DNA from *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 178-181.
- Bogorad, L. (1975) Evolution of organelles and eukaryotic genomes. *Science* 188, 891-898.
- Bolívar, F. (1978) Construction and characterization of new cloning vehicles. III. Derivatives of plasmid pBR322 carrying unique *EcoR* I sites for selection of *EcoR* I generated recombinant DNA molecules. *Gene* 4, 121-136.
- Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. y Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.

- Borthakur,D. y Haselkorn,R.** (1989) Tn5 mutagenesis of *Anabaena* sp. strain PCC 7120: isolation of a new mutant unable to grow without combined nitrogen. *J. Bacteriol.* **171**, 5759-5761.
- Boyer,H.W. 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.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Buikema,W.J. y Haselkorn,R.** (1991) Isolation and complementation of nitrogen fixation mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **173**, 1879-1885.
- Cai,Y. y Wolk,C.P.** (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* **172**, 3138-3145.
- Chang,A.C.Y. y Cohen,S.N.** (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**, 1141-1156.
- Chow,T.Y.-K. y Fraser,M.J.** (1983) Purification and properties of single strand DNA-binding endo-exonuclease of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **258**, 12010-12018.
- Cobley,J.** (1985) Chromatic adaptation in *Fremyella diplosiphon*. I. Mutants hypersensitive to green light. II. Construction of mobilizable vectors lacking sites for *Fdi* I and II. En *Vth International Symposium on Photosynthetic Prokaryotes*, Grindelwald (Suiza), p 105.
- Cummings,O.W., King,T.C., Holden,J.A. y Low,R.L.** (1987) Purification and characterization of the potent endonuclease in extracts of bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 2005-2015.
- Currier,T.C. and Wolk,C.P.** (1979) Characteristics of *Anabaena variabilis* influencing plaque formation by cyanophage N-1. *J. Bacteriol.* **139**, 88-92.
- D'Alessio,G., Di Donato,A., Parente,A. y Piccoli,R.** (1991) Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 104-106.
- Dake,E., Hofmann,T.J., McIntire,S., Hudson,A. y Zassenhaus,H.P.** (1988) Purification and properties of the major nuclease from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**, 7691-7702.

- Datta,N.** (1979) Plasmid classification: incompatibility grouping. En *Plasmids of medical, environmental and commercial importance*, (Timmis,K.N. y Pühler,A. eds.), pp 3-12. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Datta,N., Hedges,R.W., Shaw,E.J., Sykes,R.B. y Richmond, M.H.** (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **108**, 1244-1249.
- de los Reyes-Gavilán,C.G., Aparicio,J.F., Barbés,C., Hardisson,C. y Sanchez,J.** (1988) An exocyttoplasmic endonuclease with restriction function in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **170**, 1339-1345.
- Deutscher,M.P.** (1985) *E. coli* RNases: making sense of an alphabet soup. *Cell* **40**, 731-732.
- Devereux,J., Haeberli,P. y Smithies,O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**, 387-395.
- Doolittle,R.F.** (1986) Searching through data banks. En *Of URFs and ORFs. A primer on how to analyze derived amino acid sequences*, pp 3-24. University Science Books, Mill Valley (California).
- Duyvesteyn,M.G.C., Korsuize,J., de Waard,A., Vonshak,A. y Wolk,C.P.** (1983) Sequence-specific endonucleases in strains of *Anabaena* and *Nostoc*. *Arch. Microbiol.* **134**, 276-281.
- Dzelzkalns,V.A., Owens, G.C. y Bogorad,L.** (1984) Chloroplast promoter driven expression of the chloramphenicol acetyltransferase gene in a cyanobacterium. *Nucl. Acids Res.* **12**, 8917-8925.
- Eaves,G.N. y Jeffries,C.D.** (1963) Isolation and properties of an exocellular nuclease of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **85**, 273-278.
- Elhai,J. y Wolk,C.P.** (1988a) 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.
- Elhai,J. y Wolk,C.P.** (1988b) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**, 747-754.
- Fickett,J.W.** (1982) Recognition of protein coding regions in DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* **10**, 5303-5318.
- Flores,E. y Wolk,C.P.** (1985) Identification of facultatively heterotrophic, N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. *J. Bacteriol.* **162**, 1339-1341.

- Floriano,B., Herrero,A. y Flores,E. (1992) Isolation of arginine auxotrophs, cloning by mutant complementation, and sequence analysis of the *argC* gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol* 6, 2085-2094.
- Focareta,T. y Manning,P.A. (1987) Extracellular proteins of *Vibrio cholerae*: molecular cloning, nucleotide sequence and characterization of the deoxyribonuclease (DNase) together with its periplasmic localization in *Escherichia coli* K-12. *Gene* 53, 31-40.
- Focareta,T. y Manning,P.A. (1991) Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and development of a transformation system. *Mol. Microbiol.* 5, 2547-2555.
- Garrard,W.T. (1971) Selective release of proteins from *Spirillum itersonii* by tris(hydroxymethyl)aminomethane and ethylenediaminetetraacetate. *J. Bacteriol.* 105, 93-100.
- Gay,P., Le Coq,D., Steinmetz,M., Ferrari,E. y Hoch,J.A. (1983) Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 153, 1424-1431.
- Gay,P., Le Coq,D., Steinmetz,M., Berkelman,T. y Kado,C.I. (1985) Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 164, 918-921.
- Giovannoni,S.J., Turner,S., Olsen,G.J., Barns,S., Lane,D.J. y Pace,N.R. (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170, 3584-3592.
- Glazer,A.N. (1984) Phycobilisome: a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 768, 29-51.
- Hagan,C.E. y Warren,G.J. (1982) Lethality of palindromic DNA and its use in selection of recombinant plasmids. *Gene* 19, 147-151.
- Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hansen,F.G. y von Meyenburg,K. (1979) Characterization of the *dnaA*, *gyrB* and other genes in the *dnaA* region of the *Escherichia coli* chromosome on specialized transducing phages  $\lambda$ tna. *Mol. Gen. Genet.* 175, 135-144.
- Harosh,I., Binniger,D.M., Harris,P.V., Mezzina,M. y Boyd,J.B. (1991) Mechanism of action of deoxyribonuclease II from human lymphoblasts. *Eur. J. Biochem.* 202, 479-484.

- Hartley,R.W. (1988) Barnase and barstar. Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *J. Mol. Biol.* **202**, 913-915.
- Hartley,R.W. (1989) Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *TIBS* **14**, 450-454.
- Haselkorn,R. (1978) Heterocysts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**, 311-344.
- Hawley,D.K. y McClure,W.R. (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* **11**, 2237-2255.
- Henikoff,S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**, 351-359.
- Herrero,A. y Wolk,C.P. (1986) Genetic mapping of the chromosome of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. Proximity of the structural genes for nitrogenase and ribulose-bisphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **261**, 7748-7754.
- Hirschberg,J. y McIntosh,L. (1983) Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science* **222**, 1346-1348.
- Holmes,D.S. y Quigley,M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197.
- Houmard,J. y Tandeau de Marsac,N. (1988) Cyanobacterial genetic tools: current status. *Methods Enzymol.* **167**, 808-847.
- Karu,A.E., Sakaki,Y., Harrison,E. y Linn,S. (1975) The g protein specified by bacteriophage  $\lambda$ . Structure and inhibitory activity for the *recBC* enzyme of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**, 7377-7387.
- Kyte,J. y Doolittle,R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Lachance,M.-A. (1981) Genetic relatedness of heterocystous cyanobacteria by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid reassociation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**, 139-147.
- Lacks, S. (1970) Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and other activities possibly pertinent to genetic transformation. *J. Bacteriol.* **101**, 373-383.
- Lacks,S.A., Springhorn,S.S. y Rosenthal A.L. (1979) Effect of the composition of sodium dodecyl sulfate preparations on the renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **100**, 357-363.

- Lammers,P.J., Golden,J.W. y Haselkorn,R. (1986) Identification and sequence of a gene required for a developmentally regulated DNA excision in *Anabaena*. *Cell* **44**, 905-911.
- Laudenbach,D.E. y Grossman,A.R. (1991) Characterization and mutagenesis of sulfur-regulated genes in a cyanobacterium: evidence for function in sulfate transport. *J. Bacteriol.* **173**, 2739-2750.
- Laudenbach,D.E., Ehrhardt,D., Green,L. y Grossman,A. (1991) Isolation and characterization of a sulfur-regulated gene encoding a periplasmically localized protein with sequence similarity to rhodanese. *J. Bacteriol.* **173**, 2751-2760.
- Ligon,P.J.B., Meyer,K.G., Martin, J.A. y Curtis, S.E. (1991) Nucleotide sequence of a 16S rRNA gene from *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Nucl. Acids Res.* **19**, 4553.
- Lin, H.-J., Cannon,G.C. y Heinhorst,S. (1990) Purification and characterization of a DNA polymerase from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6659-6663.
- Linn,S.M. (1982) Tabulation of some well-characterized enzymes with deoxyribonuclease activity. En *Nucleases*, (Linn,S.M. y Roberts,R.S. eds.), pp 341-357, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. y Randall,R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Luria,S.E. y Suit,J.L. (1987) Colicins and Col plasmids. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. Ingraham,J.L., Low,K.B., Magasanik,B., Schaechter,M. y Umberger,H.E., eds. pp 1615-1624. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- MacKinney,G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**, 315-322.
- Maldener,I., Lockau,W., Cai,Y. y Wolk,C.P. (1991) Calcium-dependent protease of the cyanobacterium *Anabaena*: molecular cloning and expression of the gene in *Escherichia coli*, sequencing and site-directed mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* **225**, 113-120.
- Maniatis,T., Fritsch,E.F. y Sambrook,J. (eds.) (1982) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Markwell M.A.K., Haas,S.M., Bieber,L.L. y Tolbert,N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* **87**, 206-210.



- Marsh, J.L., Erfle, M. y Wykes, E.J. (1984) The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* 32, 481-485.
- McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A. y Clarke, A.E. (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 347, 757-760.
- 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.
- Mock, M., Miyada, C.G. y Collier, R.J. (1984) Genetic analysis of the functional relationship between colicin E3 and its immunity protein. *J. Bacteriol.* 159, 658-662.
- Moore, S. (1981) Pancreatic DNase. En *The Enzymes*, tercera edición (P.D. Boyer, ed), vol XIV, pp 281-296. Academic Press, New York.
- Murray, N.E. y Kelley, W.S. (1979) Characterization of  $\lambda$ polA transducing phages; effective expression of the *E. coli* polA gene. *Mol. Gen. Genet.* 175, 77-87.
- Murry, M.A. y Wolk, C.P. (1991) Identification and initial utilization of a portion of the smaller plasmid of *Anabaena variabilis* ATCC 29413 capable of replication in *Anabaena* sp. M-131. *Mol. Gen. Genet.* 227, 113-119.
- Nakamura, K.T., Iwahashi, K., Yamamoto, Y., Iitaka, Y., Yoshida, N. y Mitsui, Y. (1982) Crystal structure of a microbial ribonuclease, RNase St. *Nature* 299, 564-566.
- Neilson, A.H. y Larsson, T. (1980) The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiol. Plant.* 48, 542-553.
- Nestle, M. y Roberts, W.K. (1969a) An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. I. Purification and some properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244, 5213-5218.
- Nestle, M. y Roberts, W.K. (1969b) An extracellular nuclease from *Serratia marcescens*. II. Specificity of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244, 5219-5225.
- Nishikawa, S., Morioka, H., Kim, H.J., Fuchimura, K., Tanaka, T., Uesugi, S., Hakoshima, T., Tomita, K., Ohtsuka, E. y Ikehara, M. (1987) Two histidine residues are essential for ribonuclease T<sub>1</sub> activity as is the case for ribonuclease A. *Biochemistry* 26, 8620-8624.
- Omata, T. Cloning and characterization of the *nrtA* gene that encodes a 45-kDa protein involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant. Cell Physiol.* 32, 151-157.

- Paddon,C.J. y Hartley,R.W.** (1987) Expression of *Bacillus amyloliquefaciens* extracellular ribonuclease (barnase) in *Escherichia coli* following an inactivating mutation. *Gene* **53**, 11-19.
- Pearson,W.R. y Lipman,D.J.** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.
- Price,P.A., Moore,S. and Stein,W.H.** (1969) Alkylation of a histidine residue at the active site of bovine pancreatic deoxyribonuclease *J. Biol. Chem* **244**, 924-928.
- Puyet,A., Greenberg,B. y Lacks,S.A.** (1990) Genetic and structural characterization of EndA. A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **213**, 727-738.
- Ried,J.L. y Collmer,A.** (1987) An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene* **57**, 239-246.
- Rippka,R., Deruelles,J., Waterbury,J.B., Herdman,M. y Stanier,R.Y.** (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1-61.
- Rosenberg,M. y Court,D.** (1979) Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Ann. Rev. Genet.* **13**, 319-353.
- Rosenthal,A.L. y Lacks,S.A.** (1977) Nuclease detection in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **80**, 76-90.
- Sambrook,J. Fritsch,E.F. y Maniatis,T. (eds)** (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger,F., Nicklen,S. y Coulson,A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schaller,K. y Nomura,M.** (1976) Colicin E2 is a DNA endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3989-3993.
- Schleif,R.F. y Wensink,P.C.** (1981) Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. En *Practical methods in molecular biology*, pp 78-84. Springer-Verlag, New York.
- Schneider,G.J., Tumer,N.E., Richaud,C., Borbely,G y Haselkorn,R.** (1987) Purification and characterization of RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **262**, 14633-14639.

- Serrano,A., Giménez,P., Scherer,S. y Böger,P. (1990) Cellular localization of cytochrome c553 in the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* **154**, 614-618.
- Shine,J. y Dalgarno,L. (1974) The 3' terminal sequence of *E. coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1342-1346.
- Sluyterman,L.A. y Elgersma,O. (1978) Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion exchange columns. I. General principles. *J. Chromatogr.* **150**, 17-30.
- Srivastava,S.K., Cannistraro,V.J. y Kennell,D. (1992) Broad-specificity endoribonucleases and mRNA degradation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**, 56-62.
- Stal,L.J. y Krumbein,W.E. (1987) Temporal separation of nitrogen fixation and photosynthesis in the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Arch. Microbiol.* **149**, 76-80.
- Stanier,R.Y. y Cohen-Bazire,G. (1977) Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**, 225-274.
- Tandeau de Marsac,N. y Houmard,J. (1987) Advances in cyanobacterial molecular genetics. En *The cyanobacteria* (Fay,P. y van Baalen,C. eds.), pp 251-302. Elsevier Science Publishers, New York.
- Thiel,T. y Poo,H. (1989) Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bacteriol.* **171**, 5743-5746.
- Thiel,T. y Wolk,C.P. (1987) Conjugal transfer of plasmids to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **153**, 232-243.
- Turner,S., Burger-Wiersma,T., Giovannoni,S.J., Mur,L.R. y Pace,N.R. (1991) The relationship of a prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* to green chloroplasts. *Nature* **337**, 380-382.
- Vincent,R.D., Hofmann,T.J. y Zassenhaus,H.P. (1988) Sequence and expression of *NUC1*, the gene encoding the mitochondrial nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **16**, 3297-3312.
- von Heijne,G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105.
- von Heijne,G. (1986a) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* **14**, 4683-4690.
- von Heijne,G. (1986b) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *The EMBO Journal* **5**, 1335-1342.

- Way, J.C., Davis, M.A., Morisato, D., Roberts, D.E. y Kleckner, N. (1984) New Tn10 derivatives for transposon mutagenesis and for construction of lacZ operon fusions by transposition. *Gene* 32, 369-379.
- Weeden, N.F. (1981) Genetic and biochemical implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast. *J. Mol. Evol.* 17, 133-139.
- Williams, J.A., Yeggy, J.P. y Markovetz, A.J. (1980) Role of nucleases in the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid from *Pseudomonas cepacia* 4G9. *J. Bacteriol.* 143, 1057-1059.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-171.
- Wolk, C.P. (1973) Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* 37, 32-101.
- Wolk, C.P. (1982) Heterocysts. En *The biology of cyanobacteria*, (Carr, N.G. y Whitton, B.A., eds.), pp 359-386. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wolk, C.P. (1991) Genetic analysis of cyanobacterial development. *Current Opinion in Genetics and Development* 1, 336-341.
- Wolk, C.P. y Kraus, J. (1982) Two approaches to obtaining low, extracellular deoxyribonuclease activity in cultures of heterocyst-forming cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 131, 302-307.
- Wolk, C.P., Cai, Y. y Panoff, J.-M. (1991) Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5355-5359.
- Wolk, C.P., Cai, Y., Cardemil, L., Flores, E., Hohn, B., Murry, M., Schmetterer, G., Schrautemeier, B. y Wilson, R. (1988) Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *J. Bacteriol.* 170, 1239-1244.
- Wolk, C.P., Vonshak, A., Kehoe, P. y Elhai, J. (1984) Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1561-1565.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yoshida, M. y Toyama, S. (1987) A new method to isolate protoplasts from the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J. Plant. Physiol.* 129, 301-310.

**Yuan,R.** (1981) Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 285-315.

**Zhu,L., Gangopadhyay,T., Padmanabha,K.P. y Deutscher,M.P.** (1990) *Escherichia coli rna* gene encoding RNase I: cloning, overexpression, subcellular distribution of the enzyme, and use of an *rna* deletion to identify additional RNases. *J. Bacteriol.* **172**, 3146-3151.

ALICIA MARIA MURO PASTOR  
Nuc A, UNA NUCLEOTA DE BATA ESPECIFICIDAD  
DE SUSTRATO DE LAS CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS  
FORMADORAS DE HETEROCISTOS  
APTO "CUM LAUDO"  
POR UNANIMIDAD  
22                      SEPTIEMBRE                      92

Salvador López  
[Signature]

Jesús Sánchez

J. Vieira

[Signature]

Alcides Moreno



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



403968