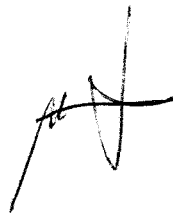


**LA DESCARBOXILACIÓN DEL GLUTAMATO EN *Synechocystis* sp.
PCC 6803: ENZIMAS IMPLICADAS Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA**

Trabajo presentado por el Licenciado
José Manuel Lucena Soto
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Sevilla



Sevilla, Julio de 2003

Director:

Pedro Candau Chacón

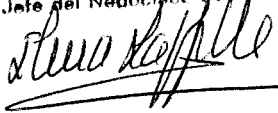
Dr. Pedro Candau Chacón

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al tomo 097 número 260 del libro
correspondiente.

Sevilla, 4 de Septiembre de 2003

El Jefe del Negociado de Teale



**A mis Padres,
por vuestro cariño**

**A Ana,
por estar siempre
a mi lado**

Debido a que considero que la Tesis es, ante todo, un paso más en el proceso de mi formación académica, han sido muchísimas las personas que me han enseñado y ayudado en el desarrollo de mi Tesis Doctoral. Por tanto, espero no olvidarme de nadie.

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular e Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Centro Mixto, Universidad de Sevilla – CSIC). Por tanto, mi agradecimiento a la Dra. Antonia Herrero, directora del centro al comienzo de este trabajo, y los Drs. Fco. Javier Florencio y Miguel García Guerrero, actuales directores.

Lo primero de todo es agradecer al Dr. Pedro Candau Chacón su decisión de dirigirme la Tesis, su colaboración en el desarrollo de la misma, así como su inestimable ayuda en su redacción. En definitiva, mi agradecimiento por haberme ayudado a trabajar en algo que siempre he deseado: investigar.

A los Drs. Javier Florencio, Agustín Vioque, José Carlos Reyes, Maribel Muro y Jesús de la Cruz, por haberme ayudado a despejar dudas y abrirme nuevos caminos en la investigación.

A los todos los compañeros de trabajo que he tenido: a los que ya son doctores y que me ayudaron especialmente en los comienzos, que nunca son fáciles: José Luis Crespo, Mario García-Domínguez, Alberto Pascual, Ana Peciña, Rosario Gómez, María Feio, Christian Lange, Anna Lindahl y, especialmente, a Eugenio Martín. Y a aquellos que están realizando el doctorado, Esther, Luis, M^a Jesús, Virginia y Elvira.

Por aguantarme cada vez que necesitaba evadirme en los ratos libres que uno tiene a lo largo del día, un recuerdo a Antonio Jesús, Gloria, Rosario, José Ramón, Cristina Ravina y, particularmente, a M^a Cruz, la mayoría ya doctores y los demás en vías de conseguirlo.

A los Doctores Enrique Flores y Antonia Herrero y a su grupo de investigación, particularmente a las Dras. Alicia Muro, Ana Valladares, M^a Félix Vázquez, M^a José Quintero y Silvia Picossi, quiero darles las gracias por ayudarme en los experimentos de TLC, sin ellas no hubiera podido realizarlos.

Como el tiempo es oro, quiero agradecer a todo el personal técnico que me ha ayudado: a Rocío, en los sistemas de cromatografía; a Eduardo, en el almacén; a M^a José, facilitándome el trabajo; y, en especial, a Mariana, por su inestimable ayuda en el laboratorio. A Pepa, Carmen, Antonia y Reyes por aguantarme y ayudarme en los problemas burocráticos.

Muy especialmente quiero agradecer a María Ceballos y Cristina Tous su inapreciable ayuda, tanto desde el punto de vista moral como profesional, sin el cual difícilmente esta Tesis hubiese llegado a buen puerto. También un recuerdo para Jorge, por tener que aguantar mis explicaciones y por aceptar continuar con mis investigaciones.

Como en estos años mi vida no solo se ha desarrollado en el laboratorio, quiero mencionar a los amigos que han estado conmigo apoyándome y animándome. A los compañeros de promoción: Pili, Mariano, Rocío, Nuria y Valle; y a los amigos de toda la vida, Tere, Yaye, Milagros y Paqui.

Y como no, yo no hubiese llegado hasta aquí sin mis padres y hermanos: Marta, Esther, Miguel Ángel y Rocío, mi cuñado Baldo y mi sobrinillo, Javier. Gracias, de todo corazón.

Finalmente, dedicar este trabajo a Ana, por ser mi apoyo básico y necesario para seguir adelante.

La financiación de este trabajo ha estado a cargo de los proyectos DGICYT PB94-1444 (1995/98) y DGICT PB97-0732 (1998/2001) de la DGSESIC (España) y de la Junta de Andalucía (Grupo CVI-0112), y ha sido posible gracias a una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador, que me fue concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. LAS CIANOBACTERIAS	15
1.1.1. Características generales	15
1.1.2. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	16
1.1.3. Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias	17
1.1.4. Metabolismo del carbono en cianobacterias	17
1.2. LAS GLUTAMATO DESHIDROGENASAS	20
1.2.1. Características generales de las glutamato deshidrogenasas	20
1.2.2. Distribución de las glutamato deshidrogenasas	20
1.2.3. Tipos estructurales de glutamato deshidrogenasas	21
1.2.4. Funciones de las glutamato deshidrogenasas	22
1.2.5. Las glutamato deshidrogenasas en <i>Synechocystis</i> sp. 6803	25
1.3. LA RUTA DEL γ -AMINOBUTIRATO	26
1.3.1. Glutamato descarboxilasa	26
1.3.2. γ -Aminobutirato transaminasa	29
1.3.3. Succinato semialdehído deshidrogenasa	29
1.3.4. Funciones de la ruta del γ -aminobutirato	30
1.4. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO	31
2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	35
2.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas	35
2.1.2. Medios y condiciones de cultivo de cianobacterias	35
2.1.3. Estirpes y plásmidos de <i>Escherichia coli</i>	36
2.1.4. Plásmidos y oligonucleótidos construidos en este trabajo	37
2.1.5. Medios y condiciones de cultivo de <i>Escherichia coli</i>	38
2.1.6. Métodos de recogida de células	39
2.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	39
2.2.1. Preparación de extractos celulares	39
2.2.1.1. Rotura por tratamiento con ultrasonidos	39
2.2.1.2. Rotura por vibración con perlas de vidrio	40

2.2.2. Cuantificación de proteínas	40
2.2.3. Fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio	40
2.2.4. Concentración de proteínas por ultrafiltración	40
2.2.5. Técnicas cromatográficas	41
2.2.5.1. Eliminación de sales por cromatografía de filtración en gel	41
2.2.5.2. Cromatografía de intercambio iónico	41
2.2.5.3. Cromatografía de filtración en gel y determinación de la masa molecular nativa	41
2.2.6. Electroforesis de proteínas	42
2.2.6.1. Electroforesis analíticas de proteínas en condiciones desnaturalizantes	42
2.2.6.2. Electroforesis analíticas de proteínas en condiciones nativas	42
2.2.6.3. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	43
2.3. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	43
2.3.1. Determinación de la actividad NADP-glutamato deshidrogenasa	43
2.3.2. Determinación de la actividad glutamato descarboxilasa	43
2.3.2.1. Ensayo de la actividad glutamato descarboxilasa mediante HPLC	43
2.3.2.2. Ensayo de la actividad glutamato descarboxilasa con [1- ¹⁴ C]-glutamato	44
2.3.3. Ensayo de actividad catalasa	45
2.3.4. Ensayo de actividad succinato semialdehído deshidrogenasa	45
2.3.5. Determinación de actividad γ -aminobutirato transaminasa	45
2.3.5.1. Ensayo de actividad γ -aminobutirato transaminasa mediante HPLC	45
2.3.5.2. Ensayo de actividad γ -aminobutirato transaminasa mediante radiactividad	45
2.4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA Y RNA <i>IN VITRO</i>	46
2.4.1. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala en <i>Escherichia coli</i>	46
2.4.1.1. Aislamiento de DNA plasmídico mediante lisis por ebullición	46
2.4.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina	46
2.4.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias	47
2.4.3. Determinación de la concentración de DNA y RNA	47
2.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	47
2.4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	48
2.4.6. Purificación de fragmentos de DNA	48
2.4.6.1. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa	48
2.4.6.2. Purificación de DNA en solución	48
2.4.7. Manipulación enzimática de DNA	48
2.4.8. Detección de fragmentos de DNA mediante hibridación <i>Southern</i>	49
2.4.9. Marcaje radiactivo de moléculas de DNA	50
2.4.10. Revelado de filtros radiactivos	50
2.4.11. Secuenciación de DNA	50

2.4.12. Aislamiento y análisis de RNA total de cianobacterias	51
2.4.12.1. Extracción de RNA con perlas de vidrio	51
2.4.12.2. Detección de mRNA mediante hibridación con sondas de DNA radiactivas (hibridación <i>Northern</i>)	51
2.5. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS	52
2.5.1. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i> con plásmidos	52
2.5.1.1. Transformación de células competentes	52
2.5.1.2. Transformación por electroporación	53
2.5.2. Transformación de células de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	53
2.6. ENSAYOS CON METABOLITOS MARCADOS RADIATIVAMENTE	53
2.6.1. Determinación de $^{14}\text{CO}_2$ liberado de células	53
2.6.2. Determinación de radiactividad en las células	54
2.6.3. Determinación del destino metabólico de aminoácidos	54
2.6.4. Cromatografía en capa fina (TLC)	54
2.7. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS	55
2.7.1. Determinaciones espectrofotométricas	55
2.7.1.1. Espectros de absorción de células enteras	55
2.7.1.2. Espectros de absorción de la glutamato descarboxilasa	55
2.7.2. Medidas espectrofotométricas	56
2.7.3. Determinación de clorofila	56
2.7.4. Determinación de la relación C/N en células	56
2.7.5. Determinación de los niveles de glucógeno	56
2.7.6. Separación y determinación de aminoácidos mediante HPLC	57
2.7.6.1. Determinación de glutamato y γ -aminobutirato	57
2.7.6.2. Determinación de los niveles intracelulares de aminoácidos	57
2.7.7. Medidas de pH	58
2.7.8. Variación del pH externo en cultivos tras estrés ácido	58
2.7.9. Análisis de secuencias de DNA y proteínas	59
2.7.10. Procedencia de los compuestos químicos y bioquímicos	59
3. RESULTADOS	61
3.1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803	63
3.1.1. Expresión del gen <i>gdhA</i> a lo largo de un cultivo de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	63
3.1.2. Caracterización del mutante carente de actividad NADP-GDH (SCh11)	64
3.1.2.1. Espectros de absorción de las estirpes silvestre y SCh11 de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	64

3.1.2.2. Acumulación de glucógeno en las estirpes silvestre y SCh11 de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	66
3.1.2.3. Relación entre los contenidos de carbono y nitrógeno en las estirpes silvestre y SCh11 de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	66
3.1.3. Efecto de la luz sobre la NADP-glutamato deshidrogenasa	67
3.2. ACTIVIDAD GLUTAMATO DESCARBOXILASA EN EXTRACTOS CRUDOS DE <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803	69
3.2.1. Determinación de la actividad glutamato descarboxilasa mediante HPLC	69
3.2.1.1. Comparación de la actividad glutamato descarboxilasa medida por HPLC y radiactividad	71
3.2.2. Caracterización de la actividad glutamato descarboxilasa en extractos crudos de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	71
3.3. PURIFICACIÓN DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA DE <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803 SOBREENPRESADA EN <i>Escherichia coli</i> .	72
3.3.1. Clonación del gen <i>gadA</i> por PCR	72
3.3.2. Sobreexpresión del gen <i>gadA</i> de <i>Synechocystis</i> en <i>Escherichia coli</i>	73
3.3.3. Purificación de la proteína glutamato descarboxilasa de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	73
3.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA	76
3.4.1. Determinación del número de subunidades de la enzima	76
3.4.2. Propiedades catalíticas de la glutamato descarboxilasa	77
3.4.2.1. Efecto del pH	77
3.4.2.2. Constantes de Michaelis-Menten (Km)	77
3.4.3. Efecto de distintos compuestos sobre la actividad glutamato descarboxilasa	79
3.4.3.1. Cationes	79
3.4.3.2. Intermediarios del ciclo de Krebs	79
3.4.3.3. Efecto de inhibidores de otras glutamato descarboxilasas	79
3.4.3.4. Especificidad por el sustrato	80
3.4.4. Estudio de la interacción entre el fosfato de piridoxal y la glutamato descarboxilasa	80
3.4.4.1. Efecto del fosfato de piridoxal sobre la glutamato descarboxilasa	80
3.4.4.2. Purificación de la glutamato descarboxilasa libre de fosfato de piridoxal	83
3.4.4.3. Espectros de absorción	83
3.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803 CARENTE DE ACTIVIDAD GLUTAMATO DESCARBOXILASA	85
3.5.1. Generación de un mutante del gen <i>gadA</i> de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	85
3.5.2. Crecimiento de la estirpe MGAD de <i>Synechocystis</i> en diversos medios de cultivo	86

3.5.3. Niveles de glucógeno de las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	87
3.5.4. Niveles intracelulares de aminoácidos en las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	88
3.5.5. Efecto del pH en cultivos de las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	90
3.6. PRESENCIA DE LAS DEMÁS ENZIMAS DE LA RUTA DEL γ -AMINOBUTIRATO	91
3.6.1. Actividad succinato semialdehido deshidrogenasa y γ -aminobutirato transaminasa en extractos crudos de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	92
3.6.1.1. Actividad succinato semialdehido deshidrogenasa	92
3.6.1.2. Actividad γ -aminobutirato transaminasa	93
3.6.2. Clonación de la succinato semialdehido deshidrogenasa de <i>Synechocystis</i> sp. 6803	94
3.6.3. Obtención y caracterización de un mutante de <i>Synechocystis</i> sp. 6803 carente de actividad succinato semialdehido deshidrogenasa	95
3.7. CATABOLISMO DEL GLUTAMATO EN <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803	96
3.7.1. Liberación de $^{14}\text{CO}_2$ <i>in vivo</i> a partir de [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-glutamato en <i>Synechocystis</i> sp. 6803	96
3.7.2. Destino metabólico del [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-glutamato	97
3.8. ESTUDIO DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>gadA</i> DE <i>Synechocystis</i> SP. 6803	100
4. DISCUSIÓN	105
4.1. EL CICLO DE KREBS EN <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803	108
4.2. FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803	112
4.3. PRESENCIA Y FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL γ -AMINOBUTIRATO EN <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803	114
4.3.1. Presencia y caracterización de las enzimas de la ruta del γ -aminobutirato en <i>Synechocystis</i> sp. 6803	114
4.4. PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL γ -AMINOBUTIRATO EN EL METABOLISMO DE <i>Synechocystis</i> SP. PCC 6803	117
5. CONCLUSIONES	121
6. BIBLIOGRAFÍA	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de la ruta del γ -aminobutirato.	27
Figura 2.	Esquema de una vasija de Warburg con un brazo lateral.	44
Figura 3.	Niveles de transcrito <i>gdhA</i> a lo largo del crecimiento de un cultivo de <i>Synechocystis</i> .	64
Figura 4.	Espectros de absorción de cultivos de las estirpes silvestre y SCh11 de <i>Synechocystis</i> .	65
Figura 5.	Curva de crecimiento de las estirpes silvestre, SFC Ω 5, y mutante, SCh11, cultivadas con distinta iluminación.	68
Figura 6.	Expresión del gen <i>gdhA</i> en cultivos con distinta iluminación.	68
Figura 7.	Reacción OPA – aminoácido.	69
Figura 8.	Estabilidad de los complejos OPA-aminoácido.	70
Figura 9.	Ensayos de actividad glutamato descarboxilasa en <i>Escherichia coli</i> por HPLC.	71
Figura 10.	Purificación de la glutamato descarboxilasa de <i>Synechocystis</i> por cromatografía de intercambio iónico.	74
Figura 11.	Electroforesis desnaturalizante de proteínas de las distintas etapas de purificación de la glutamato descarboxilasa.	75
Figura 12.	Determinación de la masa molecular nativa de la glutamato descarboxilasa de <i>Synechocystis</i> .	76
Figura 13.	Efecto del pH sobre la actividad glutamato descarboxilasa.	77
Figura 14.	Determinación de las K_m de la glutamato descarboxilasa de <i>Synechocystis</i> para glutamato y fosfato de piridoxal.	78
Figura 15.	Perfil de elución en Superdex S-200 de una preparación de glutamato descarboxilasa pura sin preincubar con fosfato de piridoxal (A) y de la fracción F2 de la misma tras preincubarla con fosfato de piridoxal (B).	81
Figura 16.	Electroforesis nativa de las fracciones obtenidas en la filtración en gel (Figura 15).	82
Figura 17.	Espectros de absorción de la glutamato descarboxilasa en ausencia y presencia de fosfato de piridoxal.	83
Figura 18.	Espectros de absorción de la glutamato descarboxilasa con y sin cofactor, y estructuras químicas de la unión cofactor-enzima resultante.	84
Figura 19.	Análisis de la estructura genómica del mutante MGAD de <i>Synechocystis</i> .	85
Figura 20.	Crecimiento fotoheterotrófico de las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> en presencia de DCMU a distintas concentraciones.	87

Figura 21. Acumulación de glucógeno en las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> .	88
Figura 22. Niveles intracelulares de glutamato, γ -aminobutirato y prolina, tras la adición de γ -aminobutirato al medio de cultivo.	89
Figura 23. Variación del pH externo en cultivos de las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> .	91
Figura 24. Sobreexpresión en <i>E. coli</i> de la succinato semialdehído deshidrogenasa de <i>Synechocystis</i> .	94
Figura 25. Análisis de la estructura genómica del mutante MSSDH.	95
Figura 26. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glutamato en las estirpes silvestre (A) y mutante, MGAD (B), de <i>Synechocystis</i> .	99
Figura 27. Árbol no enraizado de las glutamato descarboxilasas de todos los <i>phyla</i> .	100
Figura 28. Alineamiento de distintas secuencias de glutamato descarboxilasas.	102
Figura 29. Árbolo no enraizado de las glutamato descarboxilasas de eubacterias.	103
Figura 30. Ciclo de Krebs.	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estirpes de <i>Synechocystis</i> utilizadas en este trabajo.	35
Tabla 2. Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este trabajo.	36
Tabla 3. Vectores utilizados no construidos en este trabajo.	37
Tabla 4. Plásmidos construidos en este trabajo.	37
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	38
Tabla 6. Relación glucógeno/clorofila de las estirpes silvestre y Sch11.	66
Tabla 7. Relación carbono/nitrógeno de las estirpes silvestre y Sch11.	67
Tabla 8. Caracterización de la actividad glutamato descarboxilasa en <i>Synechocystis</i> .	72
Tabla 9. Purificación de la glutamato descarboxilasa de <i>Synechocystis</i> .	75
Tabla 10. Actividad glutamato descarboxilasa de <i>Synechocystis</i> en presencia de inhibidores.	79
Tabla 11. Actividad glutamato descarboxilasa en las fracciones obtenidas de la filtración en gel de la Figura 15 en presencia y ausencia de fosfato de piridoxal.	80
Tabla 12. Viabilidad en diferentes medios de cultivo de distintas estirpes mutante de <i>Synechocystis</i> .	86
Tabla 13. Niveles intracelulares de aminoácidos en las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> .	89
Tabla 14. Viabilidad de las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> en medio sólido a diferentes pHs.	90
Tabla 15. Caracterización de la actividad succinato semialdehído deshidrogenasa en <i>Synechocystis</i> .	92
Tabla 16. Actividad γ -aminobutirato transaminasa en <i>Escherichia coli</i> y <i>Synechocystis</i> con distintos aceptores del grupo amino.	93
Tabla 17. Transporte de [1- 14 C]-glutamato y desprendimiento de 14 CO ₂ en las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> .	97
Tabla 18. Transporte de [U- 14 C]-glutamato y desprendimiento de 14 CO ₂ en las estirpes silvestre y MGAD de <i>Synechocystis</i> .	98
Tabla 19. Presencia de las enzimas del ciclo de Krebs en el genoma de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	109
Tabla 20. Presencia de las enzimas del ciclo del glioxilato y de la ruta del γ -aminobutirato en el genoma de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	110

ABREVIATURAS

Act. esp.	Actividad específica
Ap ^r	Resistencia a ampicilina
AR	Resistencia a ácido
ATP	Trifosfato de adenosina
AU	Unidades de absorbencia
CAT	Cloramfenicol acetiltransferasa
chl	Clorofila
Cm ^r	Resistencia a cloramfenicol
CoA	Coenzima A
cpm	Cuentas por minuto
DCMU	3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DEAE	Dietilaminoetil
dNTP	Desoxirribonucleótido
DO	Densidad óptica
dpm	Desintegraciones por minuto
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ES	Estirpe silvestre
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas en alta presión
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad terrestre
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GABA	γ -Aminobutirato
GABA-T	γ -Aminobutirato transaminasa
GAD	Glutamato descarboxilasa
GC-MS	Cromatografía de gases - espectrometría de masas
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-2 etanosulfónico

HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
K _m	Constante de Michaelis-Menten
K _m ^r	Resistencia a kanamicina
LB	Luria-Bertani
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
min.	Minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MTA	Mezcla de bromuros de alquil-trimetilamonio
NAD	Nicotinamida-adenin-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenin-dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenin-dinucleótido-fosfato reducido
RMN	Resonancia magnética nuclear
Oc ₃ N-P	Fosfato de tri-n-octil-amonio
OPA	o-Ftaldialdehido
orf	Fase abierta de lectura
p/p	Peso/peso
p/v	Peso/volumen
PCA	Ácido perclórico
PCC	Colección de cultivos de Instituto Pasteur (París)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP _c	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PLP	Fosfato de piridoxal
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
prot.	Proteína
psi	Libra por pulgada cuadrada
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sr ^r	Resistencia a estreptomina
SSA	Succinato semialdehido
SSDH	Succinato semialdehido deshidrogenasa
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletildiamina
TES	Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
TLC	Cromatografía en capa fina

Tricina	Tris-(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
v/v	Volumen/volumen
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Bases nitrogenadas

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Aminoácidos

A	Ala	Alanina	L	Leu	Leucina
R	Arg	Arginina	K	Lys	Lisina
N	Asn	Asparagina	M	Met	Metionina
D	Asp	Aspartato	F	Phe	Fenilalanina
C	Cys	Cisteína	P	Pro	Prolina
E	Glu	Glutamato	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. INTRODUCCIÓN

1.1. LAS CIANOBACTERIAS

1.1.1. Características generales

Las cianobacterias constituyen el único grupo de organismos procariotas capaz de llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica similar a la que realizan las plantas superiores (Blankenship, 1992; Stanier y Cohen-Bazire, 1977), ya que poseen aparatos fotosintéticos situados en membranas tilacoidales y dos fotosistemas similares a los localizados en los cloroplastos. Se diferencian en que, excepto en proclorofitas, las cianobacterias carecen de clorofila *b* (Morden y Golden, 1991) y presentan pigmentos antena alternativos denominados ficobiliproteínas (Sherman *et al.*, 1987).

El origen de las cianobacterias data de hace aproximadamente 3.500 millones de años (Schopf, 1993) constituyendo, muy probablemente, el grupo biológico que desarrolló la fotosíntesis oxigénica. Su aparición provocó que la atmósfera terrestre se enriqueciese en oxígeno, lo que conllevó la aparición de la capa de ozono y, con ello, la evolución del resto de organismos. Por otro lado, las cianobacterias han desempeñado un papel esencial en el origen y evolución de las plantas superiores, ya que, de acuerdo con la teoría endosimbionte (Gray, 1989), dieron lugar a los cloroplastos a través de procesos de endosimbiosis.

Las cianobacterias se caracterizan por ser, desde un punto de vista metabólico, muy homogéneas, siendo en su mayor parte autótrofas estrictas, aunque hay algunas especies que crecen mixotróficamente (utilizando azúcares como fuente de carbono y energía a la vez que realizan la fotosíntesis), fotoheterotróficamente (utilizando sustratos orgánicos como fuente de poder reductor al tener inhibida la fotosíntesis no cíclica) o heterotróficamente (utilizando sustratos orgánicos en ausencia de luz) (Rippka *et al.*, 1979; Smith, 1983). No obstante, es la fotosíntesis el proceso principal para la generación del ATP y poder reductor necesarios para asimilar las formas inorgánicas del carbono, nitrógeno, azufre y los demás bioelementos. La fijación de CO₂ tiene lugar mediante el ciclo reductor de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). A destacar que algunos grupos de cianobacterias son capaces de fijar dinitrógeno atmosférico, proceso que en la mayoría de los casos tiene lugar en células especializadas llamadas heterocistos.

En cuanto a su taxonomía, las clasificaciones clásicas se realizan en virtud de su morfología, donde las cianobacterias son consideradas dentro de las bacterias Gram negativas, debido a la existencia en su pared de una membrana externa y una capa de peptidoglicano (Woese, 1987), aunque también poseen algunas características similares a la pared celular de las bacterias Gram positivas (Jurgens *et al.*, 1983). No obstante, nuevas revisiones (Gupta, 1998), presentan a las cianobacterias como un grupo taxonómico bien diferenciado del resto de eubacterias y, evolutivamente, a medio camino entre las Gram positivas (grupo más ancestral) y las Gram negativas o proteobacterias (grupo más evolucionado). Respecto a su taxonomía interna, la más aceptada (Rippka *et al.*, 1979) divide a las cianobacterias en cinco secciones,

basándose también en criterios morfológicos y en la forma de división. Las secciones I y II constituyen el grupo de cianobacterias unicelulares y se diferencian según su división por fisión binaria o múltiple, respectivamente. Las cianobacterias filamentosas constituyen las otras tres secciones restantes; la sección III agrupa a cianobacterias filamentosas no formadoras de heterocistos, mientras que las formadoras de heterocistos constituyen las secciones IV y V, diferenciándose, respectivamente, según se dividan en uno o en más planos. No obstante, mediante análisis de secuencias de RNA ribosómico 16S (Giovannoni *et al.*, 1988), se ha determinado que las secciones II, por un lado, y las IV y V por otro, son, además, filogenéticamente coherentes. En la actualidad, la taxonomía de las cianobacterias se encuentra en plena evolución apoyándose en estudios de marcadores quimiotaxonómicos (carotenoides, ácidos grasos,...) y análisis de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas).

Respecto a sus características genéticas, las cianobacterias presentan una amplia variedad en su contenido G+C (32 - 71%), cubriendo el intervalo de valores encontrados en procariotas. El tamaño de sus genomas es muy variable (2 - 13 Mb) pudiendo exceder el de cualquier grupo bacteriano (Herdman *et al.*, 1979). La mayoría son poliploides, ya que poseen en torno a 12 copias cromosómicas por célula.

1.1.2. *Synechocystis* sp. PCC 6803

Synechocystis sp. PCC 6803 es una cianobacteria unicelular no fijadora de dinitrógeno aislada de aguas dulces de California en 1968 (Stanier *et al.*, 1971), encuadrada en la sección taxonómica I, con tilacoides bien definidos y división binaria (Rippka *et al.*, 1979). Dentro de su género, pertenece al grupo que posee alta proporción de guaninas y citosinas en su material genético (47 - 50% de G+C).

En cuanto a su fisiología, *Synechocystis*, además de crecer fotoautotróficamente sin requerimientos orgánicos (Rippka *et al.*, 1979), puede hacerlo en condiciones mixotróficas o heterotrófica (Anderson y McIntosh, 1991), aunque en éste último caso se requieren pulsos diarios de luz fotosintéticamente no activa para el crecimiento en oscuridad. Por otro lado, es una cianobacteria móvil (Rippka *et al.*, 1979), con gran resistencia a la salinidad del medio (Hagemann, 1992), altamente poliploide, hasta 12 copias cromosómicas por célula (Labarre *et al.*, 1989), con frecuentes procesos de recombinación que han provocado que en su genoma haya numerosas copias diferentes de algunos genes. Una característica muy útil en estudios de Biología Molecular es su natural capacidad para ser transformada por DNA foráneo (Grigorieva y Shestakov, 1982) y mutada tanto de forma dirigida (Williams, 1988) como aleatoria (Labarre *et al.*, 1989). Además, el hecho de ser heterotrófico facultativo lo ha convertido en un organismo modelo en el estudio de mutantes afectados en los procesos fotosintéticos. Finalmente, su genoma fue el segundo en ser secuenciado en su totalidad (Kaneko *et al.*, 1996), lo que ha ampliado las posibilidades de estudio y el diseño teórico de rutas metabólicas.

1.1.3. Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias

Las principales fuentes de nitrógeno de las cianobacterias son de carácter inorgánico: nitrato, nitrito y amonio (Flores y Herrero, 1994), aunque algunas pueden utilizar fuentes orgánicas, como ciertos aminoácidos (principalmente Arg, Asn y Gln) o derivados de la urea. Además, como ya se ha indicado, muchas cianobacterias son capaces de crecer a expensas de dinitrógeno atmosférico como única fuente de nitrógeno, convirtiéndolo en amonio por la acción del complejo enzimático de la nitrogenasa.

De todas las fuentes de nitrógeno utilizadas por las cianobacterias, el amonio es la que utiliza con preferencia al requerir menor gasto energético para su asimilación. De hecho el amonio inhibe la utilización de las otras fuentes de nitrógeno a distintos niveles, como es el caso del transporte activo de nitrato a través de membrana, el cual se inhibe por la metabolización del amonio presente en el medio (Flores *et al.*, 1983; Lara *et al.*, 1987).

La asimilación de todas las fuentes de nitrógeno pasa por su conversión a amonio, que se incorpora a esqueletos carbonados principalmente mediante la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), ruta conocida como ciclo GS-GOGAT (Wolk *et al.*, 1976; Thomas *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1978). La GS cataliza la síntesis de glutamina dependiente de ATP a partir de glutamato y amonio (Standman y Ginsburg, 1974); y, a continuación, la GOGAT transfiere el grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, generando 2 moléculas de glutamato, con la utilización de 2 equivalentes de poder reductor. El proceso en su conjunto requiere una molécula de ATP y dos equivalentes de poder reductor para la síntesis neta de una molécula de glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato. Posteriormente, el grupo α -amino del glutamato sintetizado puede transferirse a otros oxoácidos y ser utilizado en la biosíntesis de otras moléculas, regenerándose el 2-oxoglutarato, que entra de nuevo en el ciclo. El ciclo GS/GOGAT constituye, por tanto, el principal punto de confluencia del metabolismo del carbono y del nitrógeno, por lo que su regulación es clave para el control metabólico de la célula. En este sentido, la glutamina sintetasa está finamente regulada a distintos niveles: la expresión del gen *glnA*, que codifica la glutamina sintetasa de tipo I, es activada en ausencia de amonio mediante NtcA, regulador de unión a DNA relacionado con el metabolismo del nitrógeno (Herrero *et al.*, 2001). Por otro lado, la actividad GS está modulada a través de una interacción proteína-proteína con dos pequeños polipéptidos, IF7-IF17, cuya unión inactiva la enzima, y que, a su vez, están reprimidos transcripcionalmente por NtcA en condiciones de deficiencia de nitrógeno (García-Domínguez *et al.*, 1999).

1.1.4. Metabolismo del carbono en cianobacterias

Las cianobacterias, aunque equipadas para un crecimiento con CO₂ como única fuente de carbono y luz como fuente de energía, presentan un amplio abanico en cuanto a formas

alternativas de obtención de energía y carbono, pudiendo ser autótrofas estrictas, mixotróficas, fotoheterotróficas y heterotróficas, desde un punto de vista metabólico (Rippka *et al.*, 1979; Smith, 1983).

Debido a que las cianobacterias realizan una fotosíntesis similar a la de plantas, en condiciones de iluminación el CO₂ constituye la principal fuente de carbono, para lo cual las cianobacterias poseen un mecanismo de concentración de CO₂ capaz de acumular altas concentraciones de carbono inorgánico dentro de las células y aumentar así la eficiencia de la fijación de CO₂ por parte de la Rubisco (Ogawa *et al.*, 1994). No obstante, debido al ciclo diario de luz-oscuridad, las cianobacterias se ven obligadas, en oscuridad, a movilizar sus reservas intracelulares para obtener energía y carbono, de las que el glucógeno es la principal. Pero hay, además, grupos de cianobacterias capaces de crecer en ausencia de luz, utilizando fuentes de carbono orgánicas para obtener energía. Se han realizado diversos estudios para determinar la forma en que las cianobacterias asimilan estas fuentes de carbono orgánicas, sobre todo glucosa, aunque también fructosa, glicerol y sacarosa (Rippka *et al.*, 1979), llegándose a la conclusión de que la glucosa es principalmente asimilada a través de la ruta de las pentosas fosfato, debido, sobre todo, a la ausencia de un ciclo de Krebs funcional, característica común a todas las cianobacterias estudiadas.

En los primeros estudios realizados, tanto en autótrofas estrictas, *Anacystis nidulans* (Smith *et al.*, 1967) y *Anabaena variabilis* (Pearce *et al.*, 1969), como en heterótrofas facultativas, *Synechocystis* sp. PCC 6714 (Pelroy *et al.*, 1972), se observó que la mayor parte del CO₂ derivado del metabolismo de la glucosa, tanto en luz como en oscuridad, procedía del C₁, vía descarboxilación del 6-fosfogluconato, en la ruta de las pentosas fosfato, frente al CO₂ liberado del C₆ que procedería del ciclo de Krebs. Algunos resultados parecen confirmar que el ciclo de los ácidos tricarbóxicos no es funcional, ya que no se ha encontrado actividad 2-oxoglutarato deshidrogenasa y que, cuando se incuban las células con acetato o 2-oxoglutarato marcados radiactivamente, en ningún caso se obtienen metabolitos radiactivos derivados de oxalacetato, como los aminoácidos de la familia del aspartato (Pearce *et al.*, 1969; Smith *et al.*, 1967).

Debido a que el metabolismo central del carbono es el mismo independientemente del tipo de cianobacteria, el hecho diferencial que provoca que una especie sea autótrofa estricta y otra heterotrófica facultativa es la capacidad de la segunda de transportar activamente la glucosa con gran eficiencia, frente a la baja tasa de entrada de glucosa en las autótrofas estrictas (Pelroy *et al.*, 1972; Beauclerk y Smith, 1978); de forma que la ausencia de sistema de transporte impide un crecimiento con glucosa como fuente de carbono y energía en ausencia de luz.

La secuenciación del genoma de *Synechocystis* ha posibilitado que, a través de técnicas como la determinación de la expresión de genes empleando microchips de DNA; el estudio de los niveles globales de proteínas con geles bidimensionales; y la determinación de metabolitos empleando RMN y GC-MS, se diseñen sistemas generales de flujos metabólicos de determinados compuestos en distintas condiciones de cultivo (Yang *et al.*, 2002b; Yang *et al.*, 2002a). De esta

forma, se han establecido las distintas rutas metabólicas de la glucosa en condiciones mixotróficas y heterotróficas. En oscuridad, la glucosa es metabolizada principalmente a través de la ruta de las pentosas, mientras que en luz, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, primera enzima de la ruta, está fuertemente inhibida por distintos compuestos, como la ribulosa 1,5 bisfosfato, fenómeno observado anteriormente en *Anabaena* sp. 7120 (Schaeffer y Stanier, 1978) y en *Nostoc* sp. ATCC 29133 (Summers *et al.*, 1995). También se ha determinado la existencia de una importante fijación de CO₂ a través de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, PEPc, así como una alta actividad de la enzima málica (Pearce *et al.*, 1969), lo que podría indicar que ambas enzimas estarían acopladas con el objetivo de surtir de CO₂ y NADPH al ciclo de Calvin, de una forma similar a la que realizan las plantas C4 (Yang *et al.*, 2002b).

Por tanto, la existencia de un ciclo de Krebs incompleto parece indicar que las dos ramas que quedan separadas actuarían de forma independiente sin tener conexión alguna. Por una parte, el acetil-CoA que entra finalizaría en la síntesis de 2-oxoglutarato vía isocitrato deshidrogenasa, cuya regulación por NtcA parece indicar una estrecha relación con el metabolismo del nitrógeno (Muro-Pastor *et al.*, 1996). Por otro lado, el oxalacetato formado vía PEPc llegaría hasta succinato por la ruta inversa al ciclo de Krebs. Entre las funciones que podría desempeñar el succinato, además de estar implicado en la síntesis de diversos compuesto, se incluiría la de donar electrones al conjunto de quinonas que forma parte de la cadena de transporte respiratoria, vía succinato deshidrogenasa (Cooley *et al.*, 2000). No obstante, todavía quedan estudios por realizar dentro de este ciclo, ya que hay datos que indican la existencia de rutas alternativas que podrían cerrar el ciclo y que, aunque no tuviesen un importante significado cuantitativo, sí lo podrían tener desde un punto de vista cualitativo. Tales son los casos expuestos por Yang *et al.*, 2002a, donde se observa un posible flujo metabólico a través del ciclo del glioxilato aunque estas enzimas no parecen estar presentes en el genoma de *Synechocystis* ni haberse observado su actividad; o por Cooley *et al.*, 2000, donde en mutantes carentes de actividad succinato deshidrogenasa, al añadir 2-oxoglutarato se observó acumulación de succinato.

Finalmente, señalar que muchas cianobacterias, aunque no *Synechocystis* sp. PCC 6803, presentan diversos tipos de rutas fermentativas como son las homo- y heterolácticas o la fermentación de homoacetato, usando solo carbohidratos endógenos como glucógeno o poli- β -hidroxibutirato. Dicha capacidad fermentativa es constitutiva y no regulable, por lo que presentan un metabolismo anaerobio que actúa rápidamente ante cambios en el medio ambiente (Stal y Moezelaar, 1997).

1.2. LAS GLUTAMATO DESHIDROGENASAS

1.2.1. Características generales de las glutamato deshidrogenasas

Como ya se ha comentado anteriormente, la glutamato deshidrogenasa cataliza la interconversión de 2-oxoglutarato y glutamato en un proceso reversible. Según su especificidad por el piridín nucleótido, se distinguen enzimas estrictamente dependientes de NADP (EC 1.4.1.4), otras que sólo utilizan el NAD (EC. 1.4.1.2) y otras que son capaces de utilizar ambas coenzimas (EC 1.4.1.3). En todos los casos, el equilibrio de la reacción está muy desplazado hacia la síntesis de glutamato (Smith *et al.*, 1975).

Todas las GDHs estudiadas tienen pHs óptimos muy similares, tanto en dirección aminante (7,5 – 8,5) como en la desaminante (8,5 – 9,5). Sus valores de Km son similares para el 2-oxoglutarato y los piridín nucleótidos, pero no para glutamato y amonio, que varían ampliamente (Smith *et al.*, 1975; Stewart *et al.*, 1980); de hecho son las Km para el glutamato y el amonio las que indican la orientación de la reacción y, con ello, la función metabólica de la enzima en el organismo. Si la Km es baja para el amonio y alta para el glutamato, la reacción tenderá a ser aminante y, por tanto, la GDH tendrá una función anabólica y, en caso contrario, la dirección de la reacción será desaminante y la función tenderá a ser catabólica (Stewart *et al.*, 1980).

Respecto al mecanismo de acción de las GDHs, es el mismo en todas y está muy bien estudiado: condensación de una molécula de 2-oxoglutarato con el grupo ϵ -amino no cargado de un residuo de lisina para formar una base de Schiff, posterior ataque de un catión amonio a la base de Schiff, generando 2-iminoglutarato, el cual, finalmente, será reducido por el piridín nucleótido para liberar glutamato (Smith *et al.*, 1975; Stewart *et al.*, 1980).

1.2.2. Distribución de las glutamato deshidrogenasas

Los estudios realizados hasta el momento indican que la GDH es ubicua, aunque varía su localización y tipo según el grupo de organismos, siendo mayor la preferencia por NAD. Algunos eucariotas inferiores, como *Dictyostelium discoideum*, presentan dos enzimas con diferente especificidad por la coenzima, siendo una de ellas de localización mitocondrial (Pamula y Wheldrake, 1991b). En hongos, las GDHs tienen localización citosólica (Smith *et al.*, 1975), pero varían en cuanto a preferencia por la coenzima. Los hongos superiores, como ascomicetos y basidiomicetos, presentan los dos tipos de actividad en enzimas diferentes, mientras los hongos inferiores sólo poseen NAD-GDH (Pamula y Wheldrake, 1991a). En algas superiores y plantas existen dos tipos de GDH, una cloroplástica y específica para NADP y otra mitocondrial que utiliza ambas coenzimas pero con mayor preferencia por NAD (Stewart *et al.*, 1980). Finalmente, en animales superiores, sólo aparece una GDH, inespecífica para la coenzima y de localización mitocondrial (Smith *et al.*, 1975).

En procariontes, por el contrario, la distribución de las glutamato deshidrogenasas no es tan homogénea y aparecen organismos que carecen de ella. Incluso dentro de un mismo grupo, se puede dar el caso de especies que la tienen y otras que no, como ocurre en el género *Bacillus* (Hemmila y Mantsala, 1978), bacterias lácticas (Misono *et al.*, 1985) y en las cianobacterias. Lo habitual es que las bacterias tengan un solo tipo de GDH, bien dependiente de NADP, como en enterobacterias (Veronese *et al.*, 1975), bien de NAD, como en el género *Clostridium* (Rice *et al.*, 1985), o bien que utilicen indistintamente las dos coenzimas, como en el género *Bacteroides* (Glass y Hylemon, 1980). No obstante, hay algunos casos de coexistencia de dos tipos distintos de GDH, en general con distinta afinidad por uno de los cofactores, como *Pseudomonas fluorescens* (Miyamoto y Katsuki, 1992) o *Halobacterium halobium* (Bonete *et al.*, 1990).

En cianobacterias, la importancia del ciclo GS-GOGAT dentro del metabolismo del nitrógeno ha limitado el estudio de rutas alternativas como la de la GDH. De hecho, solo hay un trabajo (Neilson y Doudoroff, 1973), donde se ha realizado un estudio de la presencia de actividad GDH en un amplio espectro de cianobacterias y donde se aprecia que la glutamato deshidrogenasa no está presente en todas, siendo, en general, la NADP-GDH la forma más común. Hay excepciones como *Nostoc* PCC 7422 (Lindblad *et al.*, 1987) y *Chlorogloeopsis fritschii* (Sallal y Nimer, 1990), con actividad dependiente de NAD y *Synechocystis* sp. PCC 6803 y 6901, que presentan ambas enzimas. Solo se han realizado estudios más detallados en *Synechocystis* (Florencio, 1987; Chávez *et al.*, 1995) y en *Phormidium laminosum* (Martínez-Bilbao *et al.*, 1988).

1.2.3. Tipos estructurales de glutamato deshidrogenasas

Todas las glutamato deshidrogenasas estudiadas hasta ahora son enzimas oligoméricas. La clasificación básica de las GDHs las divide en dos grandes grupos dependiendo del número y tamaño de subunidades: las hexaméricas, con 6 subunidades idénticas de unos 50 kDa, y las tetraméricas, con 4 subunidades idénticas de unos 115 kDa.

Las GDHs tetraméricas incluyen a las NAD-GDH de eucariotas inferiores como hongos y protozoos que, al tener una K_m alta para el amonio, son de función claramente catabólica, como se ha demostrado en estudios de mutantes carentes de actividad (Miller y Magasanik, 1990). La aparición de un nuevo tipo de GDH tetramérica, caracterizada en *Streptomyces clavuligerus* (Miñambres *et al.*, 2000), y que, por homología, está presente en distintos grupos bacterianos, ha permitido reorganizar este grupo en dos subfamilias, las GDHs L_115 y GDH L_180, donde el número representa la masa molecular aproximada de cada subunidad en kDa. Esta nueva GDH se parece a las de hongos en su especificidad por NAD y su K_m alta por amonio, lo que indica una función catabólica, de hecho está regulada por fuente de nitrógeno, aumentando su actividad en presencia de glutamato como única fuente de nitrógeno y carbono. En cambio, se diferencia por utilizar AMP como activador esencial, además de tener una estructura oligomérica compuesta por subunidades de 183 kDa.

Las GDHs hexaméricas, a su vez, se dividen en dos subfamilias, I y II, atendiendo a cuestiones puramente evolutivas. Las del grupo I se encuentran en bacterias, hongos, protozoos y algas, mientras que el grupo II está presente en arqueas, bacterias y mitocondrias de vertebrados y plantas superiores.

Estudios tanto de homología de secuencia como de estructura tridimensional han permitido establecer un núcleo de residuos conservados dentro del centro activo asociándolo a las distintas subfamilias (Britton *et al.*, 1992; Benachenhou-Lahfa *et al.*, 1993). A partir de este dato, se ha establecido una historia evolutiva donde la GDH hexamérica de tipo II, al ser la única representada en arquea, se considera el tipo ancestral, de la que muy temprano, ya en bacterias, se diferenciaría la GDH hexamérica tipo I, por procesos de duplicación y divergencia. Al mismo tiempo se produciría también la diferenciación de la GDH L_180 por procesos más complejos que implicarían el aumento de tamaño de la subunidad, posiblemente por fusión de genes y, de la cual, surgiría la GDH L_115 en una rama de eucariotas inferiores (Miñambres *et al.*, 2000).

1.2.4. Funciones de las glutamato deshidrogenasas

Como ya se ha comentado, el hecho de que la reacción de la GDH sea reversible implica que, dependiendo del sentido de la reacción, tenga una función catabólica, si metaboliza glutamato para liberar amonio, o anabólica, dentro del proceso de asimilación de amonio. Partiendo de esta premisa, en muchos casos se presupone la función catabólica o anabólica de la GDH a partir de su Km para el amonio y el glutamato, como en *Streptomyces clavuligerus* (Miñambres *et al.*, 2000) o *Streptomyces fradiae* (Vancurova *et al.*, 1989).

En bacterias, donde se ha encontrado una mayor variabilidad de GDH, la mayor parte de los estudios se ha realizado en enterobacterias donde predominan las NADP-GDH, con una función anabólica en la síntesis de glutamato (Tyler, 1978). La importancia de la GDH dentro de la síntesis de glutamato, en los casos donde coexista con el ciclo GS-GOGAT, ha sido estudiada en profundidad en *Synechocystis* sp. 6803 (Chávez *et al.*, 1995), y en *Escherichia coli* (Helling, 1994, Helling, 1998, Helling, 2002). A partir de estudios cinéticos, actividad enzimática en distintas condiciones de crecimiento y estudios de mutantes, se ha demostrado que el ciclo GS-GOGAT tiene dos funciones básicas que la GDH no puede sustituir: puede asimilar amonio cuando la concentración en el exterior es baja y puede reducir la concentración de glutamina cuando ésta sea muy alta (Reitzer *et al.*, 1987). En cambio, la necesidad de la GDH no es tan crítica, de forma que en *Escherichia coli* su importancia se explica en condiciones de limitación de energía y exceso de amonio y fosfato (Helling, 1994), donde el mutante carente de actividad GDH tiene una tasa de crecimiento menor que la estirpe silvestre cuando se realizan experimentos de competencia. Esto se debe a que en el ciclo GS-GOGAT, para la síntesis de glutamato se requiere ATP además de poder reductor, mientras que la GDH sólo requiere piridín-nucleótido, lo que implica un menor costo energético. Por otra parte, la GDH requiere cantidades altas de amonio al tener una Km

mayor para el amonio que la GS. La duplicidad de vías, sobre todo las que implican síntesis o consumo de ATP, y donde se puede englobar el ciclo GS-GOGAT y la GDH, es típica de los procariotas y tiene como objetivo controlar la velocidad y eficiencia del crecimiento (Calhoun *et al.*, 1993), proporcionándole una ventaja selectiva frente a posibles competidores.

Casi la totalidad de las NAD-GDHs bacterianas que se han estudiado, corresponden a bacterias Gram positivas, habiéndose purificado algunas de ellas, como las de *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Hornby y Engel, 1984) y *Clostridium symbiosum* (Baker *et al.*, 1992). Su función es preferentemente catabólica, aunque sólo en *Bacillus subtilis* se ha estudiado en mayor profundidad mediante la construcción de mutantes (Belitsky y Sonenshein, 1998), llegándose a la conclusión de que está implicada en la degradación de arginina, ornitina y prolina y contribuye a la utilización de estos compuestos como fuente de carbono y nitrógeno. Existen algunas excepciones como *Corynebacterium glutamicum*, con un importante interés industrial en la producción de aminoácidos ácidos, donde la mayor parte del glutamato se obtiene vía NAD-GDH y sólo en mutantes sin actividad GDH se activa la GOGAT (Tesch *et al.*, 1999); y en *Bacillus macerans*, bacteria fijadora de dinitrógeno, que también utiliza una NAD-GDH como principal vía de asimilación de amonio (Kanamori *et al.*, 1987).

Las GDHs con doble especificidad por NAD y NADP se han detectado y estudiado en distintos procariotas, siendo típico el caso de *Bacteroides*, donde constituye la principal ruta de asimilación del amonio (Yamamoto *et al.*, 1987) y se regula por inactivación en presencia de amonio en el medio. También hay excepciones como *Prevotella ruminicola* B₄, que juega un papel primordial en la degradación de proteínas en la digestión de los rumiantes, cuya actividad GDH aumenta hasta 10 veces en respuesta a una limitación de amonio (Wen y Morrison, 1996).

En arqueobacterias, las glutamato deshidrogenasas han sido ampliamente utilizadas como modelo para el estudio de la termoestabilidad de las enzimas, siendo la primera enzima del metabolismo del nitrógeno caracterizada. Las GDHs de arqueas se caracterizan por tener una actividad dual para NADP y NAD, aunque hay excepciones como *Pyrobaculum islandicum* (Kujo *et al.*, 1999) cuya GDH es solo dependiente de NAD. Muchas GDH han sido expresadas y purificadas en forma de proteína recombinante en *Escherichia coli* como las de *Pyrococcus furiosus* (Consalvi *et al.*, 1991), *Pyrococcus horikoshii* (Wang *et al.*, 2003), *Thermococcus litoralis* (Ma *et al.*, 1994) o *Halobacterium salinarum* (Hayden *et al.*, 2002) e incluso han sido cristalizadas (Britton *et al.*, 1999), lo que ha permitido deducir que existe una relación entre pares iónicos y estabilidad térmica, lo que implica que son este tipo de interacciones, que se establecen entre residuos muy conservados, las que estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas a altas temperaturas. Respecto a su posible función en el metabolismo de arqueobacterias, cabe destacar que tanto en *Pyrococcus furiosus* como en *Thermococcus profundus* pueden llegar a constituir el 20% de la proteína total, lo que da una medida de su importancia. No obstante, su función metabólica parece diferir, pues en *Thermococcus profundus*, al carecer de glutamina sintetasa, tiene una función anabólica en la formación de glutamato (Kobayashi *et al.*, 1995), mientras que en

Pyrococcus furiosus, al igual que en la mayoría de las arqueas con GDH, su función es catabólica pues es capaz de utilizar péptidos como fuente de carbono y nitrógeno, donde la GDH formaría parte del metabolismo fermentativo del glutamato que liberaría NH_3 , acetato, CO_2 e H_2 (Robb *et al.*, 1992). La importancia de la GDH dentro del metabolismo del glutamato se pone de manifiesto por el hecho de que las arqueobacterias que carecen de GDH son incapaces de degradar glutamato (Robb *et al.*, 2001).

En hongos y levaduras, al igual que sucede en bacterias, a la actividad NADP-GDH se asocia una función anabólica y a la NAD-GDH, función catabólica. De hecho, esto sucede en especies que contienen ambas formas como *Neurospora crassa* (Blumenthal y Smith, 1975) y *Saccharomyces cerevisiae* (DeLuna *et al.*, 2001), donde se observan fenómenos de interacción con amonio (Wootton, 1983), activación alostérica, así como, regulación de la expresión génica según la fuente de nitrógeno (Cardoza *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 1983).

En plantas, el estudio funcional de la glutamato deshidrogenasa, de localización mitocondrial, se ha enfocado de distintas maneras: purificación y caracterización (Sakakibara *et al.*, 1995; Turano *et al.*, 1997), estudios de fenotipo en mutantes (Magalhaes *et al.*, 1990), en mitocondrias aisladas (Yamaya y Oaks, 1987), o en células intactas (Robinson *et al.*, 1992). De todo esto se han obtenido resultados contrapuestos, ya que mientras que en los estudios con células intactas y en semillas germinadas la función de la GDH es primordialmente catabólica como fuente de nitrógeno y carbono (Robinson *et al.*, 1992), en estudios con mitocondrias aisladas, se concluyó que la dirección predominante de la reacción es en sentido aminante, apoyándose en el hecho de que en condiciones de estrés la GDH puede participar en la asimilación de amonio (Srivastava y Singh, 1988). Finalmente, los últimos estudios de RMN realizados con ^{31}P y ^{13}C en mitocondrias aisladas han llegado a la conclusión que la GDH realiza una doble función, anabólica y catabólica según sean las necesidades de la célula y en concordancia con la aspartato aminotransferasa. Esta enzima realiza la misma reacción que la GDH solo que el grupo amino proviene del aspartato y el aceptor de dicho grupo es el 2-oxoglutarato. La actividad de la GDH está, por tanto, en estrecha relación con el conjunto de ácidos carboxílicos del ciclo de Krebs (Aubert *et al.*, 2001).

Finalmente, en animales, la GDH se ha localizado en multitud de órganos, existiendo dos isoformas de distinto origen genético, una que se expresa homogéneamente en todos los tejidos y otra de expresión exclusiva en células neuronales, siendo mayor en los astrocitos (Shashidharan *et al.*, 1997). Ambas isoenzimas se caracterizan por tener un complejo sistema de regulación alostérica por GTP, NADH, leucina, ATP, etc.... (Colman, 1991), realizando una doble función, tanto catabólica como anabólica según necesidades, al igual que en plantas. En la formación de glutamato, aunque cuantitativamente la mayor parte es sintetizado vía transaminasas, se ha comprobado en tejido nervioso que, en situaciones de exceso de amonio, la GDH puede incorporarlo dando lugar a glutamato (Kanamori y Ross, 1995). Con respecto a la oxidación del glutamato vía GDH, se utiliza, bien cuando se requiere 2-oxoglutarato en el ciclo de Krebs, o bien

cuando se necesita reciclar el glutamato si éste se encuentra en exceso. Esta última función también la lleva a cabo la GS, de forma que, según el estado energético de la célula, utiliza la GS (que requiere consumo de ATP) o la GDH, razón por la cual el ADP actúa como activador (Plaitakis *et al.*, 2000).

1.2.5. Las glutamato deshidrogenasas en *Synechocystis* sp. 6803

Las glutamato deshidrogenasas en cianobacterias, como ya se ha comentado, se caracterizan por su heterogeneidad de distribución y formas, aunque su estudio ha sido bastante escaso en cuanto a caracterización enzimática y funcional. De todas las especies cianobacterianas donde la GDH ha sido estudiada, es en *Synechocystis* sp. PCC 6803 donde se ha realizado una caracterización más exhaustiva (Florencio, 1987; Chávez y Candau, 1991; Chávez *et al.*, 1995).

Synechocystis se caracteriza por tener dos glutamato deshidrogenasas, con especificidad diferente, una por NAD y otra por NADP. La NAD-GDH ha sido purificada y sus datos cinéticos indican una gran diferencia con otras NAD-GDH: es hexamérica y, a partir de los valores de Km, podría indicar una tendencia aminorante de la reacción (Chávez y Candau, 1991), contraria a la función catabólica de la mayoría de las NAD-GDH. No obstante, los bajos niveles de actividad, detectados independientemente de las condiciones fisiológicas, así como, la falta en el genoma de *Synechocystis* de homología con las NAD-GDH hasta ahora secuenciadas (Kaneko *et al.*, 1996), indican que, o bien la actividad NAD-GDH corresponde a alguna actividad secundaria de otra enzima, o bien se trata de una GDH de un nuevo tipo.

Por otro lado, la NADP-GDH de *Synechocystis* ha sido purificada y caracterizada (Florencio, 1987) y su gen, *gdhA*, clonado (Chávez *et al.*, 1995). La enzima es una GDH hexamérica del grupo I con unos valores de Km para 2-oxoglutarato, amonio y glutamato de 1,5, 3,7 y 12,0 mM, respectivamente y donde el Ca²⁺ puede participar en la catálisis pues en su presencia la actividad NADP-GDH es mayor. Por lo demás, no presenta un comportamiento alostérico ni se ha encontrado ningún activador ni represor. Su actividad no se altera cuando el organismo se cultiva con distintas fuentes de nitrógeno o en condiciones fotoheterotróficas, mixotróficas o heterotróficas. Solamente se observa un importante aumento de actividad cuando el cultivo entra en la fase estacionaria de crecimiento. El estudio del promotor del gen *gdhA* tampoco indica la presencia de posibles cajas reguladoras, aunque presenta dos zonas promotoras, de las que una de ellas da lugar a que se cotranscriba con un gen, *slr0709*, presente aguas arriba del gen *gdhA*, y parece ser la más activa de las dos. Con el objetivo de dilucidar la función fisiológica de la NADP-GDH, se obtuvo un mutante carente de actividad NADP-GDH mediante disrupción del gen *gdhA*. Como se esperaba, dicho mutante (SCh11) segregó perfectamente, indicando que la actividad GDH no es esencial para el organismo. De su estudio fenotípico, se concluyó que solo

cuando el cultivo está en fase estacionaria el mutante muestra una mayor limitación en su crecimiento, en comparación con la estirpe silvestre (Chávez, 1992).

La existencia en *Synechocystis* de una vía preferente de asimilación de amonio, el ciclo GS/GOGAT, supone una dificultad adicional en la comprensión de la función fisiológica de unas glutamato deshidrogenasas de carácter anabólico.

1.3. LA RUTA DEL γ -AMINOBTIRATO

La ruta que convierte glutamato en succinato vía γ -aminobutirato (GABA) se denomina ruta del GABA y fue descrita originalmente en animales (Balazs *et al.*, 1970). La primera enzima de la ruta es la glutamato descarboxilasa (GAD, EC 4.1.1.15) que cataliza la conversión de glutamato en GABA y CO₂ siendo, por tanto, una reacción irreversible; a continuación, la γ -aminobutirato transaminasa (GABA-T, EC 2.6.1.19) cataliza la transferencia del grupo amino del GABA a un oxoácido, generalmente 2-oxoglutarato, para dar lugar a succinato semialdehído y glutamato. Finalmente, la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSDH, EC 1.2.1.24) lleva a cabo la oxidación, dependiente de piridín nucleótido, del succinato semialdehído (SSA) para dar lugar a succinato. El GABA es el compuesto más importante en esta ruta debido a su amplia variedad de funciones (apartado 1.3.4) y, en general, es en relación con este compuesto como se regulan las enzimas del ciclo. Es de destacar que una de las funciones de este ciclo es la de sustituir a la 2-oxoglutarato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs, cuando éste no se encuentre activo, para ello el 2-oxoglutarato pasaría a glutamato vía glutamato deshidrogenasa, para luego incorporarse a la ruta del GABA (Figura 1).

1.3.1. Glutamato descarboxilasa

La glutamato descarboxilasa (GAD) es una enzima que ha sido aislada y caracterizada en una amplia variedad de organismos: bacterias, hongos, plantas y animales. En general, todas las GADs estudiadas tienen en común la utilización como cofactor del fosfato de piridoxal (PLP) unido a la enzima por un residuo de lisina mediante una base de Schiff, como ocurre en la mayoría de las descarboxilasas. Presentan una alta especificidad por glutamato como sustrato; unos valores de Km para el glutamato que no fluctúan en exceso (0,5 a 5 mM); y una masa molecular de la subunidad en torno a 50 kDa. En bacterias y hongos, la forma activa es hexamérica (300 kDa), mientras en plantas y animales es dimérica (100 kDa). Según se ha deducido de estudios teóricos de sus secuencias, las glutamato descarboxilasas parecen tener una estructura similar en cuanto a sus centros activos, a pesar de tener una baja homología entre los distintos grupos de bacterias, plantas y animales (Areshev *et al.*, 2000).

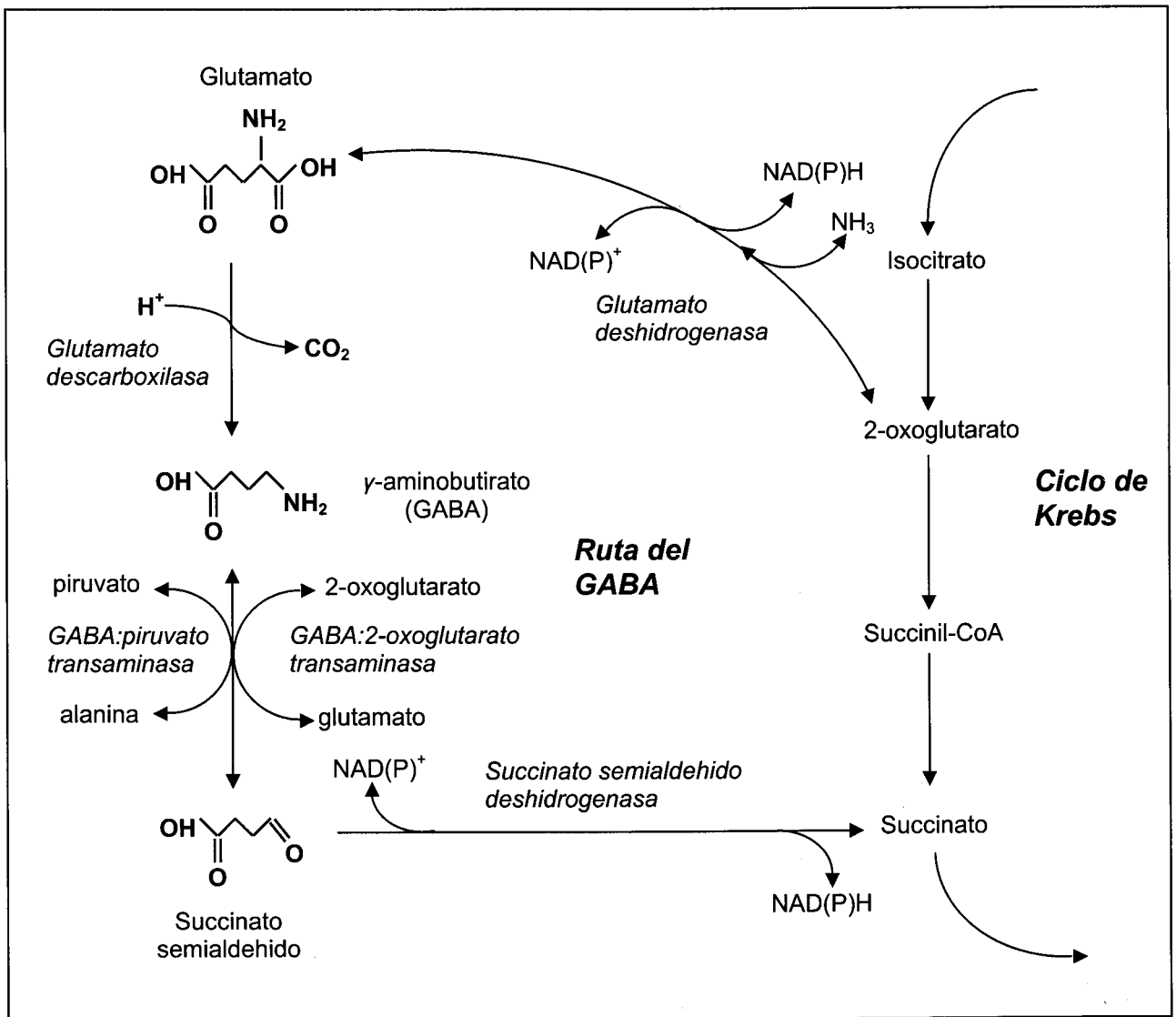


Figura 1. Esquema de la ruta del γ -aminobutirato.

En bacterias, la GAD parece ser rara en comparación con otras descarboxilasas como las dependientes de lisina, arginina y ornitina, estando presente sobre todo en bacterias que forman parte de la flora microbiana del tracto digestivo de animales. La GAD ha sido purificada en diversas especies, como *Mycobacterium leprae* (Prabhakaran *et al.*, 1983), *Lactococcus lactis* (Nomura *et al.*, 1999) y *Lactobacillus brevis*, única GAD bacteriana que presenta una conformación nativa dimérica (Ueno *et al.*, 1997), pero ha sido en *Escherichia coli* donde se ha realizado la mayor parte de los estudios tanto de caracterización estructural como funcional. Las GADs de bacterias se caracterizan por tener un pH óptimo ácido (3,5 a 5,5), desapareciendo casi

completamente su actividad a pHs superiores a 6. Este efecto es debido a que la base de Schiff que se establece entre el fosfato de piridoxal y el residuo de lisina se forma solo a pHs inferiores a 6, pues a pHs superiores la unión del cofactor implica la formación de enlaces no deseados (ver esquema en la Figura 18). Esto se observa perfectamente en los espectros de absorción, donde la enzima activa presenta un máximo a 420 nm, mientras que en la enzima inactiva, el máximo de absorción se da a 330 nm (Strausbauch y Fischer, 1970; O'Leary y Brummund, 1974). La actividad GAD se ve inhibida por compuestos que interaccionan con el PLP como aminooxiacetato y por determinados ácidos carboxílicos (Fonda, 1972).

En cuanto a la función que lleva a cabo en el metabolismo bacteriano, como ya se ha comentado, la GAD está presente en organismos que se desarrollan a pHs ácidos; de hecho, en *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* (Small y Waterman, 1998) y *Listeria monocystogenes* LO28 (Cotter *et al.*, 2001), que tienen dos genes que codifican sendas GADs, éstas forman parte del sistema de resistencia a ácido (AR), mecanismo desarrollado por diversas bacterias que les permite sobrevivir en condiciones de exceso de acidez en el medio, como la provocada en el estómago o la resultante de la fermentación. Se ha comprobado que en estos organismos, uno de los genes que codifican la GAD, *gadB*, forma un operón con *gadP*, que codifica un antiportador glutamato-GABA (Castanie-Cornet *et al.*, 1999). La expresión de este operón se encuentra finamente controlada por diversos reguladores (Tramonti *et al.*, 2002) y aumenta por estrés ácido y salino y en fase estacionaria (De Biase *et al.*, 1999). Basándose en lo anterior, se ha concluido que la glutamato descarboxilasa, en condiciones que impliquen una acidificación del medio, evita que se acidifique el citosol, ya que los protones que entran son consumidos en la reacción, al tiempo que el GABA que se forma es excretado al exterior a través del sistema GadP en intercambio con glutamato, que será consumido por la GAD para continuar tamponando el citosol. De hecho, se cree que este sistema ha sido transferido entre las distintas bacterias que residen en el tracto intestinal (Castanie-Cornet *et al.*, 1999).

En hongos, la GAD ha sido estudiada en *Trichoderma viride* (Strigacova *et al.*, 2001) y *Neurospora crassa* (Hao y Schmit, 1991) y se caracteriza por tener un pH óptimo de 5. Funcionalmente, la GAD está asociada a la germinación del conidio, pues se ha observado que en esta etapa bajan los niveles de glutamato en paralelo a la formación de GABA.

En plantas, la glutamato descarboxilasa se ha estudiado en diversas especies como *Solanum tuberosum* (Satyanarayan y Nair, 1985) o *Arabidopsis thaliana* (Turano y Fang, 1998). En general, estas glutamato descarboxilasas presentan características intermedias entre las de animales y bacterias, como es tener un pH óptimo alrededor de 6, pero sobre todo, se caracterizan por una fuerte regulación de su actividad por Ca^{2+} y calmodulina (Zik *et al.*, 1998). Por último, en animales, se han estudiado sobre todo las GADs de humanos y ratones (Wu *et al.*, 1973; Blindermann *et al.*, 1978), aislándose preferentemente de cerebro, presentando un pH óptimo neutro, en torno a 7, y una conformación nativa dimérica. Respecto a la función fisiológica de la

GAD, tanto en animales como en plantas los estudios parecen indicar que forma parte de la ruta del GABA y, por tanto, su regulación está asociada al metabolismo del GABA (ver apartado 1.3.4).

1.3.2. γ -Aminobutirato transaminasa

La γ -aminobutirato transaminasa (GABA-T) es conocida desde hace bastante tiempo como la única enzima capaz de metabolizar GABA. Sin embargo, apenas se han realizado estudios de caracterización enzimática de la misma y ha sido purificada en pocos organismos, *Pseudomonas* sp. F-126 (Yonaha y Toyama, 1980), *Streptomyces griseus* (Yonaha *et al.*, 1985), *Nicotiana tabacum* que utiliza piruvato como aceptor del grupo amino (Van Cauwenberghe, 1999) y, sobre todo, en animales como humanos y ratón (Churchich y Moses, 1981). La GABA-T utiliza fosfato de piridoxal como cofactor, también típico de las aminotransferasas; su K_m suele ser mayor para el GABA (1 - 3 mM) que para el 2-oxoglutarato (0,1 - 2 mM), con un pH óptimo ligeramente básico, en torno a 8. Su forma activa es la dimérica, cuya subunidad suele tener una masa molecular de unos 55 kDa. Al ser la única vía de degradación de GABA, su función fisiológica está estrechamente ligada a las necesidades del organismo de controlar los niveles de GABA y se tratará en el apartado 1.3.4.

1.3.3. Succinato semialdehido deshidrogenasa

La succinato semialdehido deshidrogenasa (SSDH) es la última enzima de la ruta del GABA y cataliza la reacción de interconversión de succinato semialdehido (SSA) y succinato de manera reversible, aunque tiene preferencia por la oxidación de SSA. La SSDH está presente en algunas bacterias, hongos, plantas y vertebrados y ha sido purificada en *Pseudomonas putida* (Sánchez *et al.*, 1988), *Escherichia coli* (Donnelly y Cooper, 1981), *Clostridium kluyveri* (Sohling y Gottschalk, 1993), *Solanum tuberosum* (Satyanarayan y Nair, 1985), *Arabidopsis thaliana* (Busch y Fromm, 1999) y en vertebrados, como humanos (Blaner y Churchich, 1979). Las SSDHs tienen preferencia por utilizar NAD como piridín nucleótido, aunque también hay SSDH que utilizan NADP. La K_m para el succinato semialdehido varía entre 1 y 10 μ M, su pH óptimo es de 8,5 a 9,5 y existen en forma dimérica (bacterias) y tetramérica (plantas y bacterias NADP-dependientes).

La función fisiológica de las succinato semialdehido deshidrogenasas es diferente según el organismo. En bacterias, concretamente en *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*, además de participar en el metabolismo del GABA, se ha encontrado que interviene en el metabolismo de *p*-hidroxifenilacetato, cuando es utilizado como única fuente de carbono. De hecho, ambos organismos tienen dos SSDHs, una dependiente de NAD (dimérica) y otra de NADP (tetramérica), de forma que mientras que la segunda participa en el metabolismo del GABA, la primera está implicada en la degradación de *p*-hidroxifenilacetato (Skinner y Cooper, 1982; Sánchez *et al.*,

1988). En plantas y vertebrados, al igual que la GABA transaminasa, la succinato semialdehído deshidrogenasa está asociada al metabolismo del GABA formando parte de la ruta del GABA.

1.3.4. Funciones de la ruta del γ -aminobutirato

El estudio de la ruta del GABA en cuanto a su función fisiológica ha sido abordado en muchos organismos, pero especialmente en vertebrados y plantas y se ha llegado a la conclusión de que su función, en general, está asociada al metabolismo del GABA, pues este compuesto tiene una gran variedad de funciones dependiendo del organismo. En cambio, la ruta del GABA, como sustituto de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs, se ha encontrado en pocos organismos, de hecho la glutamato deshidrogenasa apenas se ha estudiado en el marco de la ruta del GABA, cuando, para completar el ciclo de Krebs podría constituir la primera enzima del ciclo como principal fuente de glutamato.

En bacterias, la mayor parte de los estudios se han realizado en *Escherichia coli*, observándose que no existe una relación entre todas las enzimas de la ruta, pues mientras que la glutamato descarboxilasa tiene una función relacionada con el estrés, sobre todo, ácido (apartado 1.3.1) las demás enzimas están asociadas al catabolismo del GABA. De hecho, en *Escherichia coli*, el GABA puede actuar como única fuente de nitrógeno y carbono siendo transportado mediante una GABA permeasa y catabolizado a través de la GABA transaminasa y succinato semialdehído deshidrogenasa. Este sistema se encuentra regulado por represión catabólica a través del represor GabC y se activa por GABA y otras fuentes de nitrógeno (Dover y Halpern, 1972; Metzger *et al.*, 1979). Posteriormente, se ha determinado la organización molecular de sus genes, de manera que *gabT*, *gabD*, que codifica la SSDH, y *gabP* forman un operón regulado por el factor σ^s y GabC, cuyo gen se localiza en las proximidades del operón (Schneider *et al.*, 2002). Hallazgos similares se han encontrado en *Bacillus subtilis* donde el GABA puede utilizarse como única fuente de carbono y nitrógeno siguiendo la misma ruta que en *Escherichia coli* (Ferson *et al.*, 1996); también en *Pseudomonas putida* y en algunas especies de *Fusobacterium*, sin ser estudios exhaustivos, se vislumbra la funcionabilidad de la ruta en el metabolismo del GABA como fuente de carbono y energía (Gharbia y Shah, 1993). Se ha comprobado que el sistema GABA-T y SSDH también participa en el catabolismo de otros compuestos donde el GABA es un producto de su metabolismo como son las poliaminas tipo putrescina en *Escherichia coli* (Shaibe *et al.*, 1985). Por último, el destino final del succinato generado a partir de GABA, es variable, por ejemplo, en *Alcaligenes eutrophus* el GABA se utiliza para la biosíntesis de poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato), como material de reserva (Valentin *et al.*, 1995), mientras en *Clostridium aminobutyricum*, el GABA es fermentado hasta acetato y butirato (Gerhardt *et al.*, 2000), aparte, naturalmente, de que se metabolice para aportar energía vía succinato por el ciclo de Krebs. No obstante, se han encontrado excepciones donde la ruta del GABA soslaya la falta de funcionabilidad del ciclo de Krebs, como en *Rhizobium leguminosarum* donde en condiciones de

simbiosis, se inhibe la 2-oxoglutarato deshidrogenasa y la ruta de cierre del ciclo de Krebs podría ser la ruta del GABA, pues se han encontrado todas sus enzimas (Poole y Allaway, 2000).

En plantas, el metabolismo del GABA y, como consecuencia, de la ruta del GABA ha sido ampliamente estudiado debido, entre otras cosas, a ser un componente significativo del conjunto de aminoácidos libres (Narayan y Nair, 1990). Se ha sugerido que hay una inducción de la síntesis de GABA como resultado de una acidificación en el citosol y que, por tanto, la glutamato descarboxilasa tendría una función similar a la de bacterias y donde el sistema Ca^{2+} /calmodulina participaría como activador (Arazi *et al.*, 1995). En la regulación de los niveles de GABA también se utilizaría la separación espacial existente entre GAD (citoplasmática) y GABA-T y SSDH (mitocondrial), ya que separaría la síntesis de GABA de su catabolismo; a esto ayuda la regulación de expresión observada en los transportadores de GABA localizados en la membrana mitocondrial (Schwacke *et al.*, 1999). Como almacén de nitrógeno, el GABA parece acumularse junto con glutamato cuando hay excedente de proteína, preferentemente en la vacuola. Otro papel atribuido al GABA es el de osmolito compatible, pues sus características químicas le hacen muy adecuado a la hora de acumularse en la célula en condiciones de estrés osmótico (Shelp *et al.*, 1999). También parece tener una función dentro del mecanismo de defensa pues el GABA al ser un neurotransmisor inhibitorio en animales, al aumentar sus niveles en la planta ante el daño causado por el animal, puede actuar sobre éste (Ramputh y Bown, 1996). Finalmente, como sustituto del ciclo de Krebs, se ha demostrado que, en algunas condiciones como hipoxia, el 2-oxoglutarato pasa a succinato mayoritariamente vía ruta del GABA en lugar de por el ciclo de Krebs (Bown y Shelp, 1997).

En animales es donde el GABA ha sido estudiado más a fondo porque constituye unos de los neurotransmisores más importantes y está implicado en multitud de funciones como regulador del tráfico de las señales nerviosas, de forma que cuando entra en contacto con los receptores de GABA en la neurona postsináptica, disminuye la actividad eléctrica de éstas o, lo que es lo mismo su función es inhibitoria en el Sistema Nervioso Central. De hecho, son los receptores de GABA los que realmente llevan a cabo la función fisiológica, existiendo dos tipos básicos, A y B, el tipo A, que aumenta la corriente de Cl^- , hiperpolarizando la neurona y el tipo B, que se asocia a proteínas G y disminuye la corriente de Ca^{2+} o aumenta la de K^+ . Ambos tipos tienen sitios de acción diferentes y están involucrados en la conciencia, ansiedad, memoria, toxicidad...

1.4. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

Con objeto de dilucidar la existencia en *Synechocystis* sp. PCC 6803 de alguna ruta alternativa a la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, que pudiese completar el ciclo de Krebs, y de determinar la implicación de la glutamato deshidrogenasa en este contexto, se plantearon los siguientes objetivos:

Determinar la función fisiológica de la NADP-glutamato deshidrogenasa en el metabolismo general de *Synechocystis*, mediante estudios de expresión del gen *gdhA* y de la caracterización del mutante carente de actividad NADP-GDH.

Investigar la existencia de la ruta del γ -aminobutirato como vía alternativa a la 2-oxoglutarato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs. Para ello, nos propusimos determinar la actividad de las enzimas que forman parte de dicha ruta y, aprovechando el conocimiento del genoma de *Synechocystis*, verificar la presencia en el mismo de los genes codificantes de estas enzimas. Una vez localizados, se procedería a la clonación de estos genes, a su expresión en *Escherichia coli* y a la purificación de las proteínas codificadas para su posterior caracterización físico-química. Al mismo tiempo, la obtención de mutantes en *Synechocystis* carentes de cada una de las enzimas de la ruta, nos facilitaría el análisis de su papel fisiológico.

Algunos de los resultados de esta Tesis han sido ya publicados:

Chávez, S., Lucena, J.M., Reyes, J.C., Florencio, F.J. y Candau, P. (1999). The presence of glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under nonexponential growth conditions. *J. Bacteriol.* 181: 808-13.

Lucena, J.M., Chávez, S. y Candau, P. (1998). Participación de la glutamato deshidrogenasa en la asimilación de amonio por la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. En: *Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la fisiología a la biología molecular* (J. M. Vega, P. J. Aparicio, F. Castillo y J. M. Maldonado, ed.), pp. 105-113. Servicio de Publicaciones. Universidad de Sevilla, Sevilla.

Parte de los resultados aquí expuestos han sido presentados en 5 Congresos Nacionales y 4 Internacionales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas

Nuestros estudios se han centrado en la cianobacteria unicelular heterótrofa facultativa *Synechocystis* sp. PCC 6803. De ella, se han utilizado dos cepas como estirpe silvestre. La convencional, procedente de la colección de cultivos del Instituto Pasteur, y, para los estudios realizados sobre la NADP-GDH, la estirpe SFCΩ5, que contiene el plásmido autorreplicativo pSFCΩ5, lo que permite introducir construcciones de DNA por recombinación con el plásmido pFF11 y sus variantes (Ferino y Chauvat, 1989). Las estirpes de *Synechocystis* utilizadas se muestran en la Tabla 1.

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

Estirpe	Características	Referencia
PCC 6803	Silvestre	Rippka <i>et al.</i> , 1979
SFCΩ5	PCC 6803 inmóvil/ pSFCΩ5, Sm ^r	Chauvat <i>et al.</i> , 1988
SCh11	SFCΩ5, <i>gdhA</i> ⁻ , Cm ^r	Chávez <i>et al.</i> , 1995
MGAD	<i>gadA::cat</i> . Cm ^r	Este trabajo
MSSDH(+/-)	<i>gabD::cat</i> . Cm ^r	Este trabajo

2.1.2. Medios y condiciones de cultivo de cianobacterias

Los medios para el cultivo de cianobacterias utilizados en este trabajo se basan en el denominado BG11 (Rippka *et al.*, 1979), cuya composición es la siguiente:

NaHCO ₃	12	mM
MgSO ₄	0,30	mM
CaCl ₂	0,24	mM
Na ₂ CO ₃	0,20	mM
K ₂ HPO ₄	0,20	mM
H ₃ BO ₃	46	μM
Ácido cítrico	28,5	μM
Citrato férrico-amónico (17% Fe)	6	mg/l
MnCl ₂	9,1	μM
Na ₂ -EDTA	2,4	μM

Na ₂ MoO ₄	1,6	μM
ZnSO ₄	0,8	μM
CuSO ₄	0,3	μM
CoCl ₂	0,2	μM

Respecto a la fuente de nitrógeno utilizada, si es nitrato (NaNO₃), la concentración es 17,65 mM y si es amonio (NH₄Cl), 15 mM. En este último caso, se le añade tampón TES-NaOH (pH 7,5) a una concentración de 30 mM. Si carece de fuente de nitrógeno, el medio se denomina BG11o. Para el crecimiento en condiciones mixotróficas y fotoheterotróficas se utilizaba el medio BG11 suplementado con glucosa al 0,5% (p/v). La glucosa, el tampón TES-NaOH y el NH₄Cl se esterilizaban por filtración utilizando filtros Acrodisc de 0,2 μm de diámetro de poro (Gelman). El resto de los compuestos se esterilizaban en autoclave durante 20 min. a 1 atm de sobrepresión y 121 °C de temperatura (autoclave Sanyo, modelo P).

Los cultivos en medio líquido se realizaron de dos maneras:

- En condiciones de burbujeo aplicando una mezcla aire-CO₂ en proporción 99:1 (v/v) a 30 °C con iluminación continua (50 μE·m⁻²·s⁻¹), suministrada por paneles de tubos fluorescentes de luz blanca (Sylvania daylight F20w/D).
- En matraces Erlenmeyer incubados a 100 rpm en incubadores orbitales Gallenkamp (Gran Bretaña) modelo INR.401.W, termostatizados a 30 °C y con iluminación continua de luz blanca a 25 μE·m⁻²·s⁻¹.

Para el cultivo en medio sólido, al medio líquido se le añadía agar (Bacto-Agar, Difco) al 1% (p/v). Para ello, el agar se esterilizaba por separado y, posteriormente, se mezclaba con el resto de compuestos, antes de extender el medio en las cajas de Petri.

2.1.3. Estirpes y plásmidos de *Escherichia coli*

Las estirpes y plásmidos de *Escherichia coli* utilizados en este trabajo, así como sus características se muestran en las Tabla 2 y 3.

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

Estirpe	Características	Referencia
DH5α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hdsR17</i> (<i>r_k</i> - <i>r_k</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ <i>lacU169</i> (f80d- <i>lacZ</i> ΔM15)	Hanahan, 1983
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hdsS</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990

Tabla 3. Vectores utilizados no construidos en este trabajo.

Vectores	Características	Referencia
pGEMt	Ap ^r , oriF1 colE1ori, lacZ. Vector de clonación de productos de PCR	Promega
pET-3a	Ap ^r , ori de pBR322, promotor y terminador del fago T7. Vector de expresión de genes	Novagen

2.1.4. Plásmidos y oligonucleótidos construidos en este trabajo

Los plásmidos construidos en este trabajo, así como sus características principales se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Plásmidos construidos en este trabajo.

Plásmido	Descripción
pJM4	Fragmento de PCR de 1,5 kb del gen <i>gadA</i> de <i>Synechocystis</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>gad1</i> y <i>gad2</i> , clonado en pGEMt.
pJM5	Fragmento NdeI-BamHI, que contiene el gen <i>gadA</i> procedente de pJM4, clonado en pET-3a.
pJM6	Derivado de pJM4, contiene insertado en el sitio <i>KpnI</i> el casete C.C1 (Cm ^r) de pRL161 (Wolk <i>et al.</i> , 1988), en sentido contrario al gen <i>gadA</i> .
pSSD1	Fragmento de PCR de 1,4 kb del gen <i>gabD</i> de <i>Synechocystis</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>ssdh1</i> y <i>ssdh2</i> , clonado en pGEMt.
pSSD2	Fragmento NdeI-BamHI, que contiene el gen <i>gabD</i> procedente de pSSD1, clonado en pET-3a.
pSSD3 (+/-)	Derivado de pSSD1, contiene insertado en el sitio <i>EcoRV</i> el casete C.C1. (+/-), indica el sentido de inserción del casete.

Los oligonucleótidos que se emplearon en las amplificaciones por PCR de DNA de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se describen en la Tabla 5, así como la función para la que fueron utilizados

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

	Secuencia	Descripción
gad1 gad2	5' GGCAAAATTGTAATAATCCATATGGTG 3' GAATGATTATGGATCCTAATGGCTAAA	Utilizados para amplificar el gen <i>gadA</i> de <i>Synechocystis</i> . Tienen creado un sitio <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i> (en <i>gad1</i> y <i>gad2</i> , respectivamente) para clonar el gen en el vector pET-3a
gad3 gad4	5' GGATGAATATCCCCAAAC 3' CCGGATAAACTAAACCGT	Utilizados para la secuenciación de la región interna del gen <i>gadA</i>
ssd1 ssd2	5' GGCATTAACATATGGCGATCG 3' TAAAATGGATCCGGACTAAGC	Utilizados para amplificar el gen <i>gabD</i> de <i>Synechocystis</i> . Tienen creado un sitio <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i> (en <i>ssd1</i> y <i>ssd2</i> , respectivamente) para clonar el gen en el vector pET-3a
ssd3 ssd4	5' GGTGATGCCCTGGAATTT 3' GCAACAATGTCCGCCAAA	Utilizados para la secuenciación de la región interna del gen <i>gabD</i>

2.1.5. Medios y condiciones de cultivo de *Escherichia coli*

Como medio habitual de cultivo líquido, se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente:

NaCl	10 g/l
Bactotripton (Difco, EE.UU.)	10 g/l
Extracto de levadura (Difco, EE.UU.)	5 g/l
Agua desionizada	

Para solidificar el medio, se añadieron 15 g/l de agar (Difco, EE.UU.) al medio líquido. El medio completo se esterilizó en autoclave como se ha descrito anteriormente.

Cuando se llevó a cabo la expresión de proteínas en la estirpe BL21 con el plásmido pET-3a, se utilizó el medio mínimo de cultivo M9, cuya composición es la siguiente:

Na ₂ HPO ₄	47,7	mM
KH ₂ PO ₄	22,0	mM
NaCl	8,5	mM
NH ₄ Cl	18,7	mM
MgSO ₄	2	mM
CaCl ₂	0,1	mM
Glucosa	0,2%	(p/v)

Las sales de magnesio y calcio, así como la glucosa se esterilizaron por filtración, mientras que el resto se esterilizó en el autoclave.

Cuando se indica, los medios fueron suplementados con antibióticos, previamente esterilizados por filtración, a las siguientes concentraciones finales:

Kanamicina	50 μ g/ml
Cloramfenicol	20 μ g/ml
Estreptomicina	10 μ g/ml
Ampicilina	100 μ g/ml

Los cultivos se llevaron a cabo en agitación orbital continua en matraces o tubos a 200 rpm y 37 °C, excepto la estirpe BL21 que se cultivaba a 30 °C.

2.1.6. Métodos de recogida de células

Si el volumen de células no superaba los 1,5 ml, se recogían en microcentrífuga Eppendorf o Sanyo (12.000 x g, 2 min.). En los demás casos, se utilizaba, bien una centrífuga de mesa Heraeus, cuando la recogida se efectuaba a temperatura ambiente (4.000 x g, 10 min.), o una centrífuga refrigerada Sorvall (8.000 x g, 10 min. a 4 °C), si se requería baja temperatura.

2.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.2.1. Preparación de extractos celulares

Los extractos crudos de células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se obtuvieron empleando dos protocolos alternativos, ambos basados en rotura mecánica.

2.2.1.1. Rotura por tratamiento con ultrasonidos

Se utilizó en extractos superiores a 1 ml. Para ello, las células se recogieron por centrifugación en frío. El sedimento de células se resuspendía en un volumen apropiado de tampón HEPES-NaOH 25 mM (pH 7,5) suplementado con PMSF 1 mM como inhibidor de proteasas. A continuación, se le aplicaba un tratamiento con ultrasonidos consistente en 3 ciclos de 30 s de ultrasonidos alternados con ciclos de 1 min. sin tratamiento. Durante todo el proceso, el extracto se mantuvo en hielo. Se utilizó un aparato Branson (Reino Unido) modelo B12, a una frecuencia de 20 kHz y a una potencia de entre 50 y 70 W. Finalmente, el extracto se centrifugó en frío a 18.000 x g durante 15 min. El sobrenadante obtenido constituía el extracto crudo libre de células.

2.2.1.2. Rotura por vibración con perlas de vidrio

Se empleó en extractos inferiores a 1 ml. El protocolo utilizado es similar al del apartado anterior, pero en lugar de aplicar el tratamiento de ultrasonidos, al extracto de células se le añadían aproximadamente 0,5 volúmenes de perlas de vidrio (0,25 – 0,30 mm de diámetro) y, a continuación, se le sometía a 5 periodos de 30 s de agitación vigorosa en agitador automático, alternados con periodos de 1 min. en hielo, en el caso de células de *Synechocystis* y 2 periodos de 15 s de agitación con periodos de 1 min. en hielo, para células de *Escherichia coli*. Posteriormente, se centrifugaba a 12.000 x g a 4 °C, durante 15 min., obteniéndose el extracto crudo libre de células.

2.2.2. **Cuantificación de proteínas**

Para cuantificar proteínas en células enteras, se utilizó la modificación del método de Lowry *et al.*, 1951 descrita por Markwell *et al.*, 1978. En el caso de cuantificar proteínas en extracto crudos y otras soluciones de proteínas, se utilizó el método descrito por Bradford, 1976, usando el reactivo para proteínas de Bio-Rad (EE.UU.). Como proteína patrón para realizar la recta de calibrado se utilizó ovoalbúmina para el método Lowry y seroalbúmina bovina para el método de Bradford.

2.2.3. **Fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio**

El fraccionamiento se realizó a partir de una solución fría saturada de sulfato de amonio. Para el primer paso, al 30% de saturación, se añadió dicha solución al extracto crudo hasta alcanzar ese porcentaje de saturación y, tras mezclarse, se mantuvo en hielo durante 10 min.; a continuación la mezcla se centrifugó a 20.000 x g durante 10 min. a 4 °C y se tomó el sobrenadante. Para el segundo paso, al 60% de sulfato amónico, se realizó el mismo protocolo, pero, en este caso, tras la centrifugación, se tomó el sedimento y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón.

2.2.4. **Concentración de proteínas por ultrafiltración**

La concentración de proteínas se realizó por ultrafiltración en concentradores Amicon (EE.UU.) utilizando membranas de ultrafiltración de 10 kDa de valor de corte nominal suministradas por Millipore (EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.5. Técnicas cromatográficas

2.2.5.1. Eliminación de sales por cromatografía de filtración en gel

Se utilizó una columna de vidrio (Pharmacia, Suecia) de 2,6 cm de diámetro interno que contenía 60 ml de matriz Sephadex-G25 (Sigma, EE.UU.), equilibrada en tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,5). El extracto se eluyó con el mismo tampón a un flujo de 0,75 ml/min. Las proteínas se recogieron en una sola fracción hasta que empezó a eluir el sulfato amónico, detectado por el incremento de conductividad del eluato y monitorizado con un conductivímetro (Crison Instrument S.A.).

2.2.5.2. Cromatografía de intercambio iónico

La columna utilizada fue de vidrio (Pharmacia, Suecia) de 2,6 cm de diámetro interno empaquetada con 41 ml de DEAE-celulosa microgranular (Sigma, EE.UU) equilibrada inicialmente en tampón concentrado Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5) y reequilibrada, posteriormente, con el mismo tampón pero diluido a 25 mM y a 4 °C. Finalmente, justo antes de empezar la carrera, la columna se conectó a un sistema de purificación de proteínas a alta presión (FPLC), ÄKTApurifier (Amersham Biosciences, Reino Unido), adaptando previamente el sistema para que la carrera se realizase a baja presión. De esta forma, se controlaba automáticamente el gradiente, así como la recogida de fracciones y la aplicación tanto de las muestras como de los tampones. Al mismo tiempo, se medían en línea las variaciones de D.O.₂₅₄ y conductividad del eluato a lo largo de la carrera.

2.2.5.3. Cromatografía de filtración en gel y determinación de la masa molecular nativa

Para la filtración en gel se utilizó la columna preempaquetada Superdex S-200 HiLoad 26/60 grado preparativo, con un volumen total de 120 ml, adaptada para utilizarse en FPLC, ÄKTApurifier (Amersham Biosciences, Reino Unido). La columna se equilibró con tampón Tris-HCl 25 mM (pH 7,5) suplementado con NaCl, 150 mM. La carrera se efectuó a un flujo de 0,5 ml/min a 4 °C.

Para determinar la masa molecular nativa de la GAD mediante filtración en gel, tanto la GAD como los patrones de proteínas se eluyeron en las mismas condiciones que en la purificación. A continuación, se calculó la K_{av} (ver fórmula anexa) y se relacionó en una gráfica con el logaritmo de la masa molecular. Finalmente, se construyó la recta de calibrado y se extrapola la K_{av} de la GAD, obteniéndose su masa molecular nativa. Los patrones de proteínas empleados fueron: Apoferritina, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina y mioglobina, como mezcla de patrones suministrados por Bio-Rad (EE.UU.), catalasa y alcohol deshidrogenasa (Sigma,

EE.UU.). Todos fueron detectados mediante absorción a 254 nm en el ÄKTApurifier, menos la catalasa que se detectó ensayando su actividad enzimática (apartado 2.3.3).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e , V_o y V_t corresponden al volumen de elución de la proteína, volumen vacío de la columna y volumen total de la columna, respectivamente.

2.2.6. Electroforesis de proteínas

2.2.6.1. Electroforesis analíticas de proteínas en condiciones desnaturizantes

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en placa se realizaron en geles de poliacrilamida según el sistema de geles discontinuos (Jovin *et al.*, 1964), utilizando un aparato Vertical Slab Gel Electrophoresis Unit modelo SE250 (Hoefer Scientific Instruments, EE.UU).

El gel de resolución tenía una concentración de acrilamida:bisacrilamida (29:1) del 10% y como tampón Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; mientras que el gel de empaquetamiento tenía 4% de acrilamida/bisacrilamida y Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, como tampón. Ambos geles contenían también SDS al 0,1%, empleándose persulfato amónico al 0,1% y TEMED al 0,1% como catalizadores de la reacción de polimerización. Las placas de vidrio (10,2 x 7,3 cm) dispuestas paralelamente estaban separadas 0,75 mm y montadas según instrucciones del fabricante. Tras añadir y polimerizar el gel de resolución, se añadió el gel empaquetador sobre el que se dispuso un peine de teflón de diez dientes, que originó otros tantos pocillos de 5 mm de ancho por 13 mm de profundidad. Una vez polimerizado el gel empaquetador, la placa se instaló en el sistema de electroforesis y los electrodos se conectaron a través del tampón de electroforesis: Trizma base 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1%, con un pH final de 8,3.

Las muestras de 15 μ l se mezclaron con 5 μ l de tampón de carga de proteínas, que contenía Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; glicerol al 20%; SDS al 4%; 2-mercaptoetanol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,0025%. A continuación, justo antes de cargar las muestras en el gel, se calentaron a 100 °C durante 5 min. y, posteriormente, se enfriaron 2 min. en hielo. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, aplicando un voltaje constante de 200 V durante 45 min. o hasta que el colorante del frente alcanzase la parte inferior del gel.

2.2.6.2. Electroforesis analíticas de proteínas en condiciones nativas

La separación analítica de proteínas en su conformación nativa, se realizó de manera similar a las realizadas en condiciones desnaturizantes (apartado 2.2.6.1), pero en ausencia de

SDS en todas las soluciones y empleando una concentración de acrilamida/bisacrilamida en el gel de resolución del 6,2% (p/v). El tampón de carga, carecía de SDS y 2-mercaptoetanol y no se daba el choque térmico de 100 °C a las muestras de proteínas. La electroforesis se desarrolló a 4 °C, en cámara fría.

2.2.6.3. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Tras finalizar la electroforesis, las proteínas se localizaron fijándolas y tiñéndolas mediante inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie R-250 (Sigma) al 0,1% (p/v) en ácido acético 10% (v/v) y metanol 40% (v/v). Tras agitación continua durante 15 min. a temperatura ambiente, los geles se lavaron repetidas veces en una solución de ácido acético al 10% (v/v) y metanol 40% (v/v). Las proteínas se visualizaban como bandas de color azul. Los geles, una vez teñidos, se conservaron en ácido acético al 10% (v/v).

2.3. ENSAYO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

2.3.1. **Determinación de la actividad NADP-glutamato deshidrogenasa**

La actividad NADP-glutamato deshidrogenasa (EC 1.4.1.4) en sentido aminante se ensayó *in vitro* a 30 °C, según Chávez *et al* (1995). Se estimó espectrofotométricamente a 340 nm como desaparición de NADPH dependiente de 2-oxoglutarato y amonio. La mezcla de ensayo contenía: tampón Tris-HCl 85 mM pH 8,0; 2-oxoglutarato potásico, 10 mM; CaCl₂, 10 mM; NH₄Cl, 50 mM; NADPH, 0,2 mM; y una cantidad adecuada de enzima. La reacción se inició por la adición del amonio, tras realizar un control de la oxidación de NADPH en ausencia del mismo.

Una unidad de actividad NADP-glutamato deshidrogenasa en sentido aminante se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de NADPH por minuto en las condiciones descritas. El coeficiente de extinción para el piridín nucleótido a 340 nm es de $6,2 \cdot 10^3$ l \cdot mol⁻¹ \cdot cm⁻¹.

2.3.2. **Determinación de la actividad glutamato descarboxilasa**

2.3.2.1. Ensayo de la actividad glutamato descarboxilasa mediante HPLC

Para determinar la actividad glutamato descarboxilasa (EC 4.1.1.15) se utilizó el protocolo puesto a punto en este trabajo basado en la determinación de glutamato y GABA mediante HPLC. Para ello, la mezcla de reacción contenía tampón MES-NaOH 50 mM, pH 5,2; fosfato de piridoxal, 0,1 mM (si fuese necesario); glutamato sódico, 20 mM; y una cantidad adecuada de extracto. La

temperatura de reacción fue de 30 °C. La reacción se inició con la adición del glutamato tras preincubar la mezcla de ensayo 10 min. A los 0 y 15 min. se tomaron las muestras inicial y final. Las muestras, de 0,25 ml, se mezclaron con 0,15 ml de HCl 1 N para detener la reacción. A continuación, se centrifugó durante 4 min. en una centrífuga Eppendorf para precipitar los restos celulares, se tomó 0,1 ml del sobrenadante y se diluyó 4 veces en el tampón de ensayo. Finalmente, los niveles de glutamato y GABA se determinaron mediante HPLC como se indica en el apartado 2.7.6.1.

Una unidad de actividad glutamato descarboxilasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μ mol de GABA por minuto en las condiciones descritas.

2.3.2.2. Ensayo de la actividad glutamato descarboxilasa con [1-¹⁴C]-glutamato

La actividad glutamato descarboxilasa se ensayó según Wu *et al.*, 1985, con algunas diferencias. El ensayo se realizó en una vasija de Warburg, con un brazo lateral y pocillo central (Figura 2).

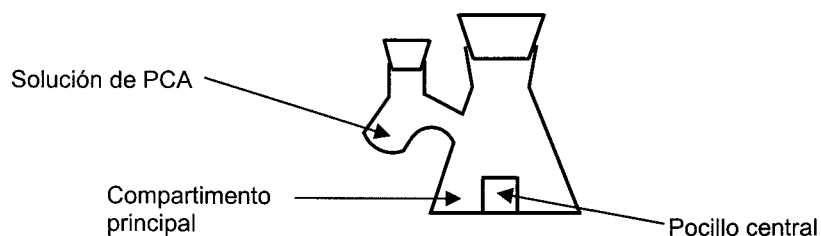


Figura 2. Esquema de una vasija de Warburg con un brazo lateral.

La mezcla de ensayo se colocó en el compartimento principal de la vasija, sin que entrase en el pocillo central, y contenía, en un volumen final de 1 ml: tampón MES-NaHO, pH 5,2, 50 μ mol; fosfato de piridoxal, 0,1 μ mol; glutamato sódico, 20 μ mol; 2 μ l de [1-¹⁴C]-glutamato (54,5 mCi/mmol y 0,1 mCi/ml) y una cantidad adecuada de extracto. En el pocillo central, se situó papel Whatman nº 1 (1,5 x 2,5 cm) plegado en forma de acordeón e impregnado con 60 μ l de hiamina base (Sigma), a fin de atrapar el CO₂ desprendido en la reacción. En el brazo lateral se colocó 0,1 ml de ácido perclórico al 60% (p/v), utilizado para detener la reacción y bajar el pH para facilitar que el CO₂ se libere de la solución y sea captado en la trampa. La reacción se inició con la adición del extracto tras lo que se selló la boca de la vasija para evitar fugas de CO₂. Se incubó a 30 °C durante 15 min. y pasado ese tiempo, se añadió el ácido perclórico, dejándose unos 30 min. para que la trampa captase todo el CO₂. Finalmente, el papel impregnado se introdujo en viales a los que se añadió 5 ml de líquido de centelleo (Ready Protein⁺, Beckman), determinándose la radiactividad en un contador de centelleo líquido marca Beckman modelo LS6000IC. Como blanco se utilizó el mismo ensayo pero con el extracto previamente hervido.

2.3.3. Ensayo de actividad catalasa

La actividad catalasa (E.C. 1.11.1.6) se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la disminución de la absorbencia a 240 nm debida a la descomposición enzimática del peróxido de hidrógeno a 30 °C, según el procedimiento descrito por Bergmeyer *et al.*, 1983. La mezcla contenía: 45 mM de tampón fosfato potásico, pH 6,8; 10,5 mM de H₂O₂ y una cantidad adecuada de enzima. La reacción se inició con la adición del H₂O₂.

2.3.4. Ensayo de actividad succinato semialdehido deshidrogenasa

La actividad NADP-succinato semialdehido deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.16) se ensayó *in vitro* a 30 °C en sentido oxidante. Se estimó espectrofotométricamente a 340 nm como aparición de NADPH dependiente de succinato semialdehido. La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 1 ml: tampón Tricina-NaOH, pH 9,0, 0,1 mmol; succinato semialdehido, 1 μmol; CaCl₂, 10 μmol; NADP, 5 μmol; y una cantidad adecuada de enzima. La reacción se inició por la adición del succinato semialdehido, tras realizar un control de la reducción de NADP en ausencia del sustrato.

2.3.5. Determinación de actividad GABA transaminasa

La actividad GABA transaminasa (E.C. 2.6.1.19) se determinó siguiendo dos métodos diferentes.

2.3.5.1. Ensayo de actividad GABA transaminasa mediante HPLC

El protocolo seguido fue similar al utilizado para el ensayo de actividad glutamato descarboxilasa (apartado 2.3.2.1), donde primero se realizaba el ensayo a 30 °C y, tras parar la reacción con HCl, los aminoácidos eran determinados por HPLC. La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 1 ml: tampón HEPES-NaOH pH 8,6, 0,1 mmol; fosfato de piridoxal, 0,1 μmol; sustrato aceptor del grupo amino, 5 μmol; GABA, 5 μmol; y una cantidad adecuada de extracto crudo. La reacción se inició con la adición del extracto y se incubó 30 min. a 30 °C, tras lo cual se continuó el protocolo igual que en apartado 2.3.2.1.

2.3.5.2. Ensayo de actividad GABA transaminasa mediante radiactividad

Está basado en la separación entre aminoácidos y ácidos orgánicos mediante la unión de los ácidos a sales de alto peso molecular (fosfato de tri-n-octil-amonio, Oc₃N-P) (Sterri y Fonnum, 1978). Esta sal se prepara apartir de tri-n-octilamina, que se disuelve en cloroformo a una

concentración final de 0,2 M y se mezcla con 2 volúmenes de ácido fosfórico 0,2 M. Se agita manualmente 2 min. y se deja decantar 12 horas en un embudo de decantación. Finalmente, se toma la fase inferior correspondiente a una solución de $\text{O}_2\text{N-P}$ 0,2 M, diluida en cloroformo. La actividad se estimó mediante la formación de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -succinato semialdehído a partir de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -GABA (240 mCi/mmol).

La actividad se determinó *in situ* en células enteras permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,2% (v/v). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 50 μl : tampón HEPES-NaOH pH 8,6, 50 nmol; fosfato de piridoxal, 0,3 nmol; DTT, 10 nmol; 2-oxoglutarato, 2,5 nmol; $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -GABA, 5 nmol (diluido con GABA hasta una radiactividad específica final de 2,5 mCi/mmol); extracto de células, 10 μl . La reacción se inició con la adición del extracto y, tras incubar 30 min. a 30 °C, se añadió 1 ml de $\text{O}_2\text{N-P}$, se agitó durante 2 min. y se centrifugó a 4.000 rpm. Finalmente, se tomó una muestra de 0,5 ml de la fase inferior (que contiene $\text{O}_2\text{N-P}$ con los ácidos) y se pasó a un vial de centelleo con 5 ml de líquido de centelleo (Ready Protein⁺, Beckman), determinándose la radiactividad en un contador de centelleo líquido marca Beckman modelo LS600001C.

Una unidad de actividad GABA transaminasa se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de succinato semialdehído por minuto en las condiciones indicadas de ensayo.

2.4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA Y RNA *IN VITRO*

2.4.1. Aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala en *Escherichia coli*

2.4.1.1. Aislamiento de DNA plasmídico mediante lisis por ebullición

Este método se utilizó para el aislamiento rápido de plásmidos de alto número de copias por célula. Es un protocolo basado en el método descrito por Holmes y Quigley, 1981 y mejorado por Sambrook *et al.*, 1989, consistente en la lisis de las células por ebullición en presencia del detergente no iónico Tritón X-100.

2.4.1.2. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina

Este procedimiento se utilizaba cuando se requería una solución plasmídica de alta calidad o bien para el aislamiento de plásmidos de bajo número de copias por célula. El método es el descrito por Ish-Horowicz y Burke, 1981, basado en la lisis de las células en presencia de SDS y NaOH, seguida de la eliminación del DNA cromosómico y proteínas mediante precipitación con acetato sódico 0,3 M y centrifugación. Para eliminar mejor las proteínas, la solución se sometía a una extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v).

2.4.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias

El aislamiento de DNA total de cianobacterias se llevó a cabo según el método descrito por Cai y Wolk, 1990, basado en la rotura de las células con perlas de vidrio. Células procedentes de 35 ml de cultivo en medio BG11 se recogieron por centrifugación a 4 °C y se resuspendieron en 400 μ l de tampón T.1E: Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM, pH 7,5. A la suspensión celular se le añadieron 150 μ l de perlas de vidrio (0,25 – 0,30 mm de diámetro -Sigma, Alemania-), 20 μ l de SDS al 10% (p/v) y 450 μ l de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v). A continuación, la suspensión se sometió a 10 ciclos de 1 min. de agitación vigorosa con un agitador de tubos, intercalados con ciclos de 1 min. en hielo. El lisado se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min. a 4 °C y el sobrenadante se sometió a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). El DNA se precipitó finalmente con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y acetato sódico 0,3 M, pH 5,2. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 50 μ l de tampón T.1E y el RNA presente en la solución se eliminó por tratamiento con RNasa A de páncreas bovino (Boehring Mannheim), a una concentración final de 20 μ g/ml.

2.4.3. Determinación de la concentración de DNA y RNA

Las concentraciones de DNA y RNA se determinaban por su absorbencia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbencia, en una cubeta de 1 cm, equivale a 40 y 50 μ g/ml de RNA y DNA bicatenario, respectivamente.

2.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un aparato Mastercycler 5330 (Eppendorf, Alemania). Cada reacción contenía en un volumen total de 50 μ l: 5 μ l de tampón *taq* suministrado con la enzima: MgCl₂, 75 nmol; dNTP, 10 pmol; 2,5 U de *taq* polimerasa (Boehringer, Alemania); 50 ng de DNA; y 50 pmol de cada oligonucleótido.

El protocolo de la reacción era el siguiente: 2 min. a 95 °C (desnaturalización del DNA), 30 ciclos de reacción y 10 min. a 72 °C (temperatura de polimerización de la *taq* polimerasa). Cada ciclo de reacción se componía de desnaturalización a 95 °C (1 min.), renaturalización, donde se unían específicamente los oligonucleótidos, durante 1 min. (la temperatura era determinada por la T_m de los oligonucleótidos utilizados) y polimerización a 72 °C (1 min.). Los fragmentos de DNA amplificados se comprobaban en un gel de agarosa y se purificaban según se indica en el apartado 2.4.6.2.

2.4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Se realizó según describen Sambrook *et al.*, 1989, utilizando geles de agarosa: entre 0,7 y 2,5% de agarosa en tampón TBE 0,5x (Tris-borato 22,5 mM y EDTA 1 mM -pH 8,0-) y 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio, para visualizar los ácidos nucleicos. Las electroforesis se realizaron en aparatos HE-100 o HE-200 (Hoefer, EE.UU.) a un voltaje de 10 V/cm.

A cada muestra se le añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga formado por un 30% de glicerol, 0,25% de xileno-cianol y 0,25% de azul de bromofenol, en agua. En los casos en que se quería eliminar el RNA presente en las muestras, se trataban con RNasa A de páncreas bovino a una concentración final de 20 μ g/ml, durante 30 min. a 37 °C.

Para determinar el tamaño de las bandas de DNA, se emplearon como marcadores los fragmentos procedentes de la digestión del fago λ con *EcoRI* y *HindIII* o con *PstI*.

Finalmente, tras la electroforesis, los geles se fotografiaron iluminando con luz ultravioleta de 302 nm o se analizaron usando un aparato de vídeo UVP ImageStore de SONY.

2.4.6. Purificación de fragmentos de DNA

2.4.6.1. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Para ello se realizaba una hendidura en el gel justo debajo de la banda a recuperar y se introducía un trozo de membrana de DEAE-celulosa (Schleicher & Schuell, Alemania) de dimensión similar al corte realizado, previamente equilibrada durante unos minutos en tampón TBE 0,5x. Posteriormente, se continuaba la electroforesis hasta que el DNA de la banda quedase unido a la membrana. A continuación, se eluía el DNA de la membrana, incubando ésta durante 30 min. a 68 °C en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, conteniendo EDTA 1 mM y NaCl 1 M. Tras retirar la membrana, la solución se sometía a extracción con fenol:cloroformo 1:1 y el DNA se precipitaba con acetato sódico 0,3 M y etanol absoluto.

2.4.6.2. Purificación de DNA en solución

Para purificar fragmentos de DNA en solución se utilizó el kit GFX (Amersham, Reino Unido). El protocolo seguido es el recomendado por el fabricante, basado en la utilización de una columna a cuya matriz de fibra de vidrio se une selectivamente el DNA.

2.4.7. Manipulación enzimática de DNA

Las endonucleasas de restricción empleadas suministradas por Amersham, Reino Unido y Roche, Suiza se utilizaron de acuerdo a sus instrucciones.

La desfosforilación de los extremos de vectores abiertos, para evitar la religadura de los mismos, se realizó empleando fosfatasa alcalina (Roche, Suiza), incubando la mezcla de ensayo durante 1 hora a 37 °C, seguida de posterior purificación del DNA según se indica en el apartado 2.4.6.2.

Para obtener extremos romos en fragmentos de DNA cortados con endonucleasas que dejaban extremos 5', colgantes se utilizaron tratamientos de relleno con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* (Promega, EE.UU.), según instrucciones de los suministradores.

Para las ligaduras entre fragmentos de DNA se empleó la ligasa de DNA del fago T4 (Promega, EE.UU.). La mezcla de ensayo, que contenía, además de los fragmentos de DNA a unir, 5 U de ligasa y el tampón suministrado junto a la enzima, se incubó, bien 1 hora a temperatura ambiente, si se utilizaba el vector pGEMt, o bien 12-14 horas a 14 °C para el resto de ligaduras.

2.4.8. Detección de fragmentos de DNA mediante hibridación *Southern*

La hibridación de DNA fijado a filtros de nailon con sondas marcadas radiactivamente se llevó a cabo según describen Ausubel *et al.*, 1996. Para ello, se realizó la electroforesis del DNA, previamente digerido con la enzima de restricción correspondiente, en un gel de agarosa al 0,7%. A continuación, el gel se sumergió durante 15 min. en una solución 0,25 N de HCl para despurinizar parcialmente el DNA, tras lo cual, se lavó con agua destilada y se incubó con agitación suave durante una hora en una solución desnaturalizante conteniendo 0,5 N de NaOH y 1,5 N de NaCl. Posteriormente, se procedió a la transferencia del DNA a filtros de nailon Zeta-Probe (Bio-Rad, EE.UU.) durante 30 min., utilizándose un aparato de transferencia por vacío TransVac TE80 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.). Finalmente, para fijar el DNA al filtro, éste se incubó a 80 °C durante dos horas, según instrucciones del fabricante.

Para la hibridación con la sonda marcada, el filtro se trató durante 30 min. con una solución de tampón fosfato sódico 0,5 M, pH 7,0, conteniendo 10 mM de EDTA y SDS al 7% (p/v). Posteriormente se añadió la sonda de DNA marcada radiactivamente, previamente desnaturalizada a 100 °C durante 10 min., y se llevó a cabo la hibridación durante 15 horas a 65 °C ó 55 °C dependiendo del grado de homología existente entre la sonda y el DNA a hibridar.

Tras la hibridación, el filtro se lavó con agitación moderada durante 30 min. a temperatura ambiente y otros 30 min. a la temperatura de hibridación. La solución de lavado estaba compuesta por tampón fosfato sódico 40 mM, pH 7,2 y SDS al 1% (p/v). Tras los lavados, los filtros se exponían y analizaban según se indica en el apartado 2.4.10.

2.4.9. Marcaje radiactivo de moléculas de DNA

Los fragmentos de DNA a utilizar como sondas en los experimentos de hibridación *Southern* y *Northern* se marcaron con el método *Ready To Go* de extensión de cebadores de secuencia aleatoria (Pharmacia, Suecia). Para ello, unos 100 ng de DNA desnaturalizado se marcaban según instrucciones del suministrador, utilizando 20-30 μCi de $5'[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ (3.000 mCi/mmol), suministrado por New England Nuclear (Reino Unido), en un volumen de 50 μl . Para la eliminación de los nucleótidos no incorporados, se utilizó el método MicroSpinTM Columns (Amersham, Reino Unido), basado en la filtración de las muestras a través de columnas de Sephacryl HR. La eficiencia del marcaje se estimó cuantificando 1 μl de la muestra obtenida, en el contador de centelleo.

2.4.10. Revelado de filtros radiactivos

Para detectar la señal radiactiva presente en los filtros se emplearon distintas técnicas:

- Exposición y análisis en un aparato de autorradiografía Cyclone Storage Phosphor System (Packard), donde las áreas radiactivas eran cuantificadas.
- Autorradiografía electrónica en un detector bidimensional de partículas β InstantImager (Packard), en este caso la cuantificación de las áreas radiactivas se daban en cpm, de forma que se podían relacionar con dpm.
- Autorradiografía a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con películas Kodak (EE.UU) tipo X-OMAT S o X-OMAT LS, utilizándose para ello una carcasa de exposición Sigma (EE.UU.) y pantallas intensificadores Lightning Plus (Dupont, EE.UU.). Una vez transcurrido el tiempo de exposición, se reveló la película empleando reactivos reveladores y fijadores suministrados por Valca (España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.11. Secuenciación de DNA

La secuenciación de los genes clonados por PCR se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sanger *et al.*, 1977, que se basa en el uso de dideoxirribonucleótidos de adenina, guanina, citosina y timina para producir paradas aleatorias durante la reacción de polimerización a partir del cebador. El nucleótido empleado para marcar radiactivamente las cadenas sintetizadas en dichas reacciones fue $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ (1,212 mCi/ μmol) suministrado por New England Nuclear (Reino Unido). Los cebadores utilizados fueron tanto los oligonucleótidos empleados en clonar los genes, como otros internos, dentro de los mismo genes. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo empleando el conjunto de reactivos denominados *Sequenase* versión 2.0 (United States Biochemical, EE.UU.). Se siguieron las instrucciones del fabricante, excepto en que la

eliminación del NaOH utilizado para la desnaturalización del DNA molde se realizó por filtración a través de columnas de *Sephadex* G-50 equilibradas en tampón T.1E.

Los productos de las reacciones de secuenciación se separaron en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) (acrilamida:bisacrilamida, 29:1) conteniendo 4,68 M de urea en tampón TBE 1x. Se empleó un aparato de electroforesis modelo SE 1500 (Hoefer Scientific Instruments, EE.UU.), a una intensidad constante de 50 mA y una temperatura de 50 a 60 °C.

Terminada la electroforesis, los geles se transferían a papel Whatman 3 MM y se secaban utilizando un secador de geles Drygel Sr. Modelo SE1160 (Hoefer Scientific Instruments, EE.UU.). La autorradiografía se realizaba empleando películas Kodak X-OMAT-AR, en carcasas de exposición Sigma (EE.UU.) a temperatura ambiente y se revelaba como se describe en el apartado 2.4.10.

2.4.12. Aislamiento y análisis de RNA total de cianobacterias

2.4.12.1. Extracción de RNA con perlas de vidrio

Las células correspondientes a 50 ml de cultivo se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 0,4 ml de tampón T.1E. A continuación se le añadieron 150 μ l de perlas de vidrio (0,25 – 0,30 mm de diámetro), 20 μ l de SDS al 10%, 450 μ l de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y 80 μ l de arcilla Bentone MA Rheological additive (Rheox, Livingston, Reino Unido) al 3% (p/v) en tampón T.1E. Tras 10 ciclos de 1 min. de agitación vigorosa en un agitador de tubos, alternados con ciclos de 1 min. en hielo, la suspensión se centrifugó a 12.000 x g, durante 10 min. a 4 °C. El sobrenadante se sometió a dos extracciones con 1 volumen de fenol:cloroformo 1:1 y el RNA se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol al 96% a -20 °C y 1/5 de volumen de LiCl 10 M. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en tampón T.1E y se eliminó el DNA por incubación a 30 °C durante 30 min. con 40 U de DNasa I (Roche, Suiza). A continuación, se sometió la preparación a extracción con fenol:cloroformo y se precipitó el RNA con 2,5 volúmenes de etanol al 96% y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 4,5. Finalmente, el sedimento de RNA se resuspendió en 40 μ l de agua tratada con dietilpírocarbonato, compuesto que inactiva posibles RNasas presentes en el agua. Para determinar la concentración y la calidad del RNA obtenido, se cuantificó espectrofotométricamente (apartado 2.4.3) y se sometió a electroforesis en gel de agarosa (apartado 2.4.5).

2.4.12.2. Detección de mRNA mediante hibridación con sondas de DNA radiactivas (hibridación Northern)

El RNA total se sometió a electroforesis según describen Sambrook *et al.* (1989), utilizando gel de agarosa al 1% en tampón MOPS-NaOH 20 mM, conteniendo 5 mM de acetato

sódico, 0,5 mM de EDTA, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio y formaldehído al 1,9% (v/v). Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos GNA-100 suministrados por Pharmacia (Suecia). Las muestras, en un volumen final de 30 μl contenían: 7 μl de RNA (15-20 μg), 1,7 μl de tampón MOPS 10x, 4,9 μl de formaldehído, 14 μl de formamida y 3 μl de tampón de carga. Tras la electroforesis, el gel se sometió a tres períodos de lavado con agua destilada durante 15 min. para eliminar el formaldehído, equilibrándose a continuación con dos lavados de 20 min. con tampón SSPE (GibcoBRL), diluido a la mitad de la solución stock del suministrador. A continuación, el RNA se transfirió a un filtro de nailon HybondTM-N+ (Amersham), mediante un aparato de transferencia por vacío TransVacTE80 (Hoefler Scientific Instruments, EE.UU.). La transferencia se llevó a cabo durante 90 min. utilizando NaOH 50 mM como solución de transferencia.

El proceso de hibridación se llevó a cabo como se describe para la hibridación *Southern* en el apartado 2.4.8, a una temperatura de hibridación de 65 °C. Finalmente, se analizó la señal radiactiva del filtro según se indica en el apartado 2.4.10.

Cuando se quería reutilizar un filtro, la sonda de la hibridación anterior presente en el filtro se eliminaba por ebullición durante 5 min. en una solución de SDS al 0,5% (p/v).

Como control de la cantidad de RNA cargado en los geles, todos los filtros se hibridaron con una sonda del gen *mnpB* obtenido a partir del plásmido pAV1100 (Vioque, 1992).

2.5. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE BACTERIAS

2.5.1. Transformación de células de *Escherichia coli* con plásmidos

2.5.1.1. Transformación de células competentes

Este protocolo se utilizó con la estirpe de *E. coli* DH5 α . Las células competentes se prepararon según el método de Hanahan, 1985, conservándose a -80 °C. Para la transformación, el DNA transformante se mezclaba con las células y se mantenían en hielo 20 min. A continuación, se les sometía a un choque térmico de 2 min. a 42 °C y posterior enfriamiento en hielo durante 2 min., tras lo cual se les añadía 0,8 ml de medio LB y se incubaba a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, las células eran sembradas en cajas de Petri con medio LB sólido y el antibiótico adecuado para la selección de los transformantes.

En caso de utilizar plásmidos y estirpes de *E. coli* que permitiesen identificar clones portadores de moléculas recombinantes gracias a la inactivación por inserción del gen *lacZ*, el medio se suplementaba con 40 $\mu\text{g/ml}$ de X-gal. Las colonias con plásmidos recombinantes mostraban color blanco, frente al color azul de las que no lo portaban.

2.5.1.2. Transformación por electroporación

Este protocolo se utilizó con la estirpe de *E. coli* BL21. Las células electroporadas se prepararon siguiendo el manual suministrado junto al electroporador utilizado, Equibio Easyject Optima (Bio-Rad, EE.UU.). Para electroporar, 60 μ l de células se mezclaban con, como máximo, 5 μ l de DNA transformante, manteniéndose 1 min. en hielo. A continuación, la solución se pasaba a una cubeta de electroporación EquiBio de 2 mm y se le aplicaba una diferencia de potencial de 2.500 V durante 1 s, tras lo cual se añadía 1 ml de medio LB y se incubaba a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, las células se sembraban en cajas de Petri con medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes.

2.5.2. **Transformación de células de *Synechocystis* sp. 6803**

La transformación de *Synechocystis* con DNA plasmídico se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Chauvat *et al.*, 1986. Las células se cultivaron hasta una DO_{580} de 1 - 1,5. A continuación, se recogieron 40 ml del cultivo por centrifugación a temperatura ambiente y las células se lavaron 2 veces con medio fresco para eliminar las posibles nucleasas extracelulares. Tras los lavados, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo, que se distribuyó en partes alícuotas de 200 μ l en tubos de poliestireno-cristal de 10 ml (Soria Greiner S.A., España) y se le añadió el DNA a transformar, entre 1 y 3 μ g resuspendido en tampón T.1E. La mezcla se incubó en iluminación durante 1,5 h y, posteriormente, se sembró en cajas de medio BG11, sin antibióticos, sobre filtros Nucleopore 85 MM (Whatman, EE.UU.). Tras un periodo de incubación de 20 h. en condiciones normales de cultivo, para permitir la expresión de la resistencia conferida por el DNA exógeno, los filtros se pasaron a cajas de BG11 conteniendo el antibiótico pertinente. Las colonias transformantes resistentes aparecían tras 10-15 días de incubación. En rondas posteriores de réplicas para forzar la segregación de las copias cromosómicas mutantes, se aumentaba la concentración de los antibióticos hasta 40 y 200 μ g/ml, para cloramfenicol y kanamicina, respectivamente.

2.6. **ENSAYOS CON METABOLITOS MARCADOS RADIATIVAMENTE**

2.6.1. **Determinación de $^{14}CO_2$ liberado de células**

Para determinar el $^{14}CO_2$ liberado a partir de ^{14}C -glutamato en células de *Synechocystis*, se utilizó un protocolo similar al ensayo de actividad enzimática glutamato descarboxilasa con [$1-^{14}C$] glutamato, donde el $^{14}CO_2$ liberado en la reacción de descarboxilación es captado en una trampa de CO_2 utilizando una vasija de Warburg (Figura 2). En este caso, células de *Synechocystis* cultivadas en condiciones normales en medio BG11, se recogían por centrifugación

a temperatura ambiente y se resuspendían en medio fresco hasta una concentración de 10 μg de clorofila/ml. A continuación, se pasaban 2 ml de cultivo a una vasija de Warburg, con la trampa de CO_2 en el pocillo central y el ácido perclórico al 60% (1/10 del volumen de cultivo) en el brazo lateral, como se describe en el apartado 2.3.2.2. Tras preincubar durante 10 min. en las condiciones del ensayo, se añadía el ^{14}C -glutamato, en general a una concentración final de 1 μM (54,5 mCi/mmol, si era 1- ^{14}C , y de 273 mCi/mmol, si era U- ^{14}C) y se incubaba en iluminación durante 30 min a 30 °C. Pasado ese tiempo, y tras tomarse una muestra para determinar la radiactividad existente en las células (ver apartado 2.6.2), se detenía el ensayo mezclando el cultivo con el ácido perclórico del brazo lateral, evitando que entrase en el pocillo central. El sistema se mantenía cerrado durante 15 min., para que el $^{14}\text{CO}_2$ se captase en la trampa, tras lo cual se pasaba el papel Whatman a un vial de centelleo, conteniendo 5 ml de líquido de centelleo, y se determinaba su radiactividad. Como blanco se utilizaba la radiactividad fijada en el filtro tras realizarse el mismo ensayo con células hervidas previamente.

2.6.2. Determinación de radiactividad en las células

Para determinar la cantidad de metabolito radiactivo que era transportado al interior de la célula, se realizaba un protocolo similar al del apartado anterior, donde, tras la adición del metabolito marcado y transcurrido el tiempo de incubación, se pasaba el volumen de cultivo indicado en cada caso, a través de un filtro Millipore HA de 0,45 μm de diámetro de poro. A continuación, tras lavar los filtros con unos 5 ml de tampón Tricina-KOH 25 mM, pH 8,1, se introducían en viales de centelleo, se añadía el líquido de centelleo y se cuantificaba la radiactividad. Como control, se realizaba el mismo protocolo con células previamente hervidas.

2.6.3. Determinación del destino metabólico de aminoácidos

Para determinar el destino metabólico de los compuestos radiactivos, se realizaba el mismo protocolo que en el apartado 2.6.1, aunque se filtraba un volumen mayor de células y los filtros se introducían en tubos que contenían 2 ml de agua hirviendo. Se incubaban unos 5 min. a 100 °C, tras lo cual se sacaba el filtro y la solución de células lisadas se centrifugaba en los mismos tubos a temperatura ambiente a 3.000 x g, durante 5 min. Finalmente, se tomaba una muestra de 1,5 ml del sobrenadante, libre de restos celulares y, tras congelarse con aire líquido, se liofilizaba y resuspendía en 20 μl de agua.

2.6.4. Cromatografía en capa fina (TLC)

Los metabolitos marcados generados como se indica en el apartado 2.6.3 se separaban en una placa de capa fina (0,1 mm) de celulosa de 20 x 20 cm (Merck, Alemania). Para ello, entre

1 y 10 μl de la solución liofilizada (según su radiactividad) se aplicaban en un extremo de la placa. A continuación, se pasaba a tanques de cromatografía y se sometía a una separación bidimensional utilizando los siguientes solventes:

- 1ª dimensión. Solvente I: *n*-butanol – acetona – hidróxido amónico (30% v/v) – agua (20:20:10:4, v/v). La duración aproximada de la cromatografía era de unas 6 horas o hasta que el solvente llegase al extremo superior de la placa.
- 2ª dimensión. Solvente II: isopropanol – ácido fórmico – agua (20:1:5, v/v). Se realizaba después de la 1ª dimensión, tras secar la placa durante 1 hora en chorro de aire. Generalmente se dejaba toda la noche (unas 12 horas).

Tras secar las placas, se analizaban mediante autorradiografía electrónica utilizando un contador bidimensional de radiación β (InstantImager, Packard), el cual permitía un análisis cuantitativo de las manchas radiactivas. La identificación de metabolitos en las placas se realizaba mediante co-cromatografía con patrones, aplicando en el mismo punto que la muestra radiactiva, 2 μl de una disolución 5 mM del aminoácido no marcado. Tras la exposición en el contador, estos aminoácidos se revelaban pulverizando la placa con una disolución de ninhidrina preparada disolviendo 500 mg de ninhidrina en 50 ml de acetona y añadiendo una disolución de 50 mg de acetato de cadmio en una mezcla de 5 ml de agua y 1 ml de ácido acético glacial (Atfield y Morris, 1961). Los aminoácidos aparecían como una señal naranja sobre fondo azul.

2.7. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

2.7.1. Determinaciones espectrofotométricas

2.7.1.1. Espectros de absorción de células enteras

Los espectros de absorción de células enteras (apartado 3.1.2.1.) se obtuvieron en muestras de células lavadas por centrifugación y resuspendidas en NaCl 10 mM empleando el dispositivo de muestras turbias de un espectrofotómetro SLM Aminco DW2000.

2.7.1.2. Espectros de absorción de la glutamato descarboxilasa

Para los estudios de interacción GAD-fosfato de piridoxal descritos en el apartado 3.4.4.3, se utilizó un espectrofotómetro Du[®] 650 (Beckman, EE.UU.). Las soluciones se realizaron de la siguiente manera: la holoenzima y apoenzima purificadas se diluyeron hasta la concentración indicada con tampón MES-NaOH y fosfato sódico 50 mM, al pH indicado; para el espectro de la holoenzima reconstituida, se preincubó la apoenzima con fosfato de piridoxal 20 μM , durante 15 min. a 20 °C. En este último caso, al espectro se le restó el espectro obtenido de una solución de fosfato de piridoxal 20 μM en el mismo tampón.

2.7.2. Medidas espectrofotométricas

Para medidas discretas de absorbencia de luz visible o luz ultravioleta se utilizó un espectrofotómetro Hitachi U-110 (Japón). Las cinéticas de absorción a 340 y 240 nm, se realizaron empleando un espectrofotómetro Shimadzu VIS/UV-160.

2.7.3. Determinación de clorofila

El contenido celular de clorofila *a* se determinó espectrofotométricamente siguiendo el método descrito por Mackinney, 1941. Las células contenidas en 1 ml de cultivo se recogieron por centrifugación a 12.000 x *g*; el sedimento se resuspendió en 1 ml de metanol absoluto y, tras mezclar la solución mediante agitación vigorosa durante 30 s, la preparación se centrifugó durante 2 min. a 12.000 x *g*. Finalmente, se determinó la concentración de clorofila en el sobrenadante por su absorbencia a 665 nm empleando un coeficiente de extinción de 74,46 ng⁻¹·ml·cm⁻¹.

2.7.4. Determinación de la relación C/N en células

Para determinar el contenido elemental de nitrógeno y carbono, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron 2 veces con NaCl, 20 mM y se secaron durante 2 días a 80 °C hasta peso constante. Se determinó el contenido de carbono y nitrógeno de, aproximadamente, 1 mg (peso seco) de células con un analizador elemental, modelo 1106/R de Carlo Erba Strumentazione (Italia), cuyos datos se analizaron en un integrador 3390a (Hewlett Packard, Reino Unido).

2.7.5. Determinación de los niveles de glucógeno

Para la determinación de glucógeno se utilizó el método de Ernst *et al.*, 1984. Las células se concentraron por centrifugación hasta 0,2 – 0,3 mg de clorofila por ml. El glucógeno se extrajo mediante lisis alcalina: a 50 μ l de células se le añadieron 0,2 ml de KOH (30%, p/v) y se incubó durante 90 min. a 100 °C. Posteriormente, el glucógeno se precipitó añadiendo 0,6 ml de etanol 96% (p/v) e incubando 1 h en hielo. Tras centrifugar 5 min. a 12.000 x *g*, el sedimento se secó durante 10 min. a 60 °C y se resuspendió en 0,3 ml de tampón acetato sódico 100 mM, pH 4,75.

Una vez aislado, el glucógeno se hidrolizó hasta glucosa, que se determinó espectrofotométricamente. La hidrólisis se realizó enzimáticamente por digestión con 4 U de amiloglucosidasa (E.C. 3.2.1.33) y 8 U de amilasa (E.C. 3.2.1.1), incubándose 25 min. a 55 °C. La determinación de glucosa se realizó mediante un ensayo acoplado hexoquinasa-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (E.C. 2.7.1.1 y E.C. 1.1.1.49, respectivamente) y se estimó como aparición total de NADPH a 340 nm. La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 1 ml: tampón trietanolamina, pH 7,6, 50 μ mol; MgSO₄, 8 μ mol; EDTA, 5 μ mol; ATP, 2 μ mol; NADP, 0,5

μmol ; hexoquinasa, 0,28 U; G6PDH, 0,14 U; y una cantidad apropiada de extracto hidrolizado de glucógeno. Tras añadir la hexoquinasa e incubar unos minutos, la reacción se inició con la adición de la G6PDH. El ensayo se mantuvo a 37 °C hasta que cesó el aumento de NADPH, determinándose la diferencia de densidad óptica a 340 nm.

Como blanco, se determinó la cantidad de glucosa libre precipitada junto al glucógeno, realizando el mismo ensayo pero sin hidrolizar previamente el glucógeno.

2.7.6. Separación y determinación de aminoácidos mediante HPLC

2.7.6.1. Determinación de glutamato y γ -aminobutirato

Para la separación y determinación de glutamato y GABA en el ensayo de actividad enzimática glutamato descaboxilasa (apartado 2.3.2.1) se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de Waters (EE.UU.), compuesto por un inyector U6K, conectado a una bomba modelo 501 que creaba un flujo constante de solvente. La salida del inyector estaba conectada a un cartucho de acero LiChroCART[®] C₁₈ de 3,9 x 150 mm, precedido de una precolumna de 3,9 x 40 mm rellena de perlas de vidrio. La salida de la columna se conectaba a un detector de fluorescencia Ac-420 provisto de filtros de 338 nm (excitación) y 425 nm (emisión). Los datos obtenidos se procesaron automáticamente mediante un integrador modelo 745.

Las muestras de aminoácidos se derivatizaron antes de su inyección siguiendo el método descrito por Lindroth y Mopper, 1979, que utiliza *o*-ftaldialdehído (OPA), como agente derivatizante. El protocolo empleado para determinar GABA y glutamato puesto a punto en esta Tesis es el siguiente: 50 μl de muestra se mezclaron con 150 μl de la mezcla derivatizante preparada disolviendo 27 mg de OPA en 0,5 ml de metanol, 4,5 ml de tampón borato sódico 0,4 M, pH 10,0, y 20 μl de β -mercaptoetanol. Tras incubar a temperatura ambiente durante 90 s, se inyectaron en el HPLC 40 μl de esta mezcla, y sus componentes se separaron isocráticamente a 46 °C en fase reversa empleando como eluyente tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6,5, conteniendo un 30% de metanol y un 2% de tetrahidrofurano (v/v). El flujo fue de 1 ml/min., creando una contrapresión de aproximadamente 2.500 psi.

2.7.6.2. Determinación de los niveles intracelulares de aminoácidos

En un primer paso, se obtuvo un extracto de metabolitos libres de restos macromoleculares y de membrana. Para ello, se tomaron 2 ml de cultivo y se pasaron por filtros de celulosa HAWP de 0,45 μm de diámetro de poro (Millipore, EE.UU.). Tras lavar el filtro con tampón Tricina-NaOH pH 8,0, 25 mM, se pasó a un tubo Trimex y se añadió 1,5 ml de agua hirviendo, manteniéndose a 100 °C durante 5 min. Finalmente, la solución sin el filtro se pasó a un tubo

ependorf y se centrifugó a 13.000 x g, durante 5 min., tomándose el sobrenadante libre de restos de membrana.

Para la determinación de aminoácidos, se utilizó un método basado en la derivatización de los aminoácidos con fenilisotiocianato (PITC), según describen Heinrikson y Meredith, 1984. El PITC es un compuesto que se une a aminas primarias (como las de los aminoácidos) y secundarias (como la de la prolina), generándose un derivado feniltiocarbámico que absorbe luz de 254 nm. Se tomó 1 ml de la solución obtenida anteriormente, se secó mediante flujo de dinitrógeno y el sedimento se resuspendió en 50 μ l de agua destilada. A continuación, 40 μ l de esta solución se mezclaron con 60 μ l de la solución derivatizante (etanol:agua:trietanolamina:PITC, 7:1:1:1), se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. y se volvió a secar en flujo de dinitrógeno. Como paso final, el sedimento se resuspendió en 40 μ l de tampón fosfato sódico 40 mM, pH 7,4 conteniendo acetonitrilo al 5% (v/v), y se inyectaron 10 μ l en un sistema de HPLC, LC Module I plus (Waters, EE.UU.), formado por una bomba que permite hacer gradientes, un inyector automático y un detector de absorbencia. La separación se realizó en fase reversa en un cartucho de acero LiChroCART[®] C₁₈ de 3,9 x 150 mm, precedido de una precolumna de 3,9 x 40 mm rellena de perlas de vidrio. Para la carrera se utilizaron las siguientes soluciones: solvente A, tampón acetato sódico 70 mM, pH 6,55, y acetonitrilo al 2% (v/v); solvente B, acetonitrilo al 50% (v/v). El solvente B se incrementó linealmente desde 0 hasta el 53% durante los primeros 20 min. y luego hasta el 100% en los siguientes 26 min. El flujo fue de 1,5 ml/min. y la temperatura de 46 °C.

2.7.7. Medidas de pH

El pH de las disoluciones se determinó con pH-metros digitales Metrohm Herisau modelo 654 (Suiza) o Radiometer modelo PHM82 (Dinamarca).

2.7.8. Variación del pH externo en cultivos tras estrés ácido

Células de *Synechocystis* en fase exponencial, cultivadas en medio BG11 (10 ml) fueron centrifugadas a temperatura ambiente a 4.000 x g, durante 5 min. en una centrífuga Megafuge 1,0 (Heraeus), y se resuspendieron en el mismo volumen de BG11 a los pHs indicados (acidificando con HCl). A continuación, se incubaron a 30 °C en iluminación y se midió la variación del pH externo. Para ello, a distintos tiempos, se tomaron muestras de 1 ml, se centrifugaron 20 s en tubos eppendorf a 13.000 x g, y se midió el pH del sobrenadante, libre de células, en un pHmetro modelo BasiC 20 (Crison, EE.UU.).

2.7.9. Análisis de secuencias de DNA y proteínas

Para la búsqueda de fases abiertas de lectura, localización de sitios de restricción, traducción de secuencias nucleotídicas y determinación de la composición de aminoácidos, se utilizó el programa DNA-Strider en su versión 1.1, diseñado por Christian Mark (Service de Biochimie, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Francia).

La búsqueda de similitud de una secuencia con las contenidas en los bancos de datos se realizó utilizando la aplicación BLAST (Altschul *et al.*, 1990) a través de la dirección de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. El acceso al genoma completo de *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1996) se realizó a través de la dirección de internet <http://www.kazusa.or.jp/cyano/>.

Para el alineamiento de secuencias, se utilizó el programa Clustal X, cuyo sistema de alineamiento múltiple se basa en el descrito por Higgins y Sharp (1988). Los árboles evolutivos se realizaron por el método de "neighbor joining" (Saitou y Nei, 1987) contenido en dicho programa.

2.7.10. Procedencia de los compuestos químicos y bioquímicos

Los tampones Trizma, HEPES, MES, Tricina y MOPS, las enzimas glutamato descarboxilasa, hexoquinasa, G6PDH, amilasa y amiloglucosidasa, la ovoalbúmina y la seroalbúmina bovina, así como el fosfato de piridoxal, GABA y OPA se adquirieron de Sigma (EE.UU.). Los nucleótidos, PMSF y tri-n-octilamina eran productos de Roche (Suiza). La acrilamida y bisacrilamida eran de Bio-Rad (EE.UU.) y la agarosa, de SeaKem (EE.UU.). Los solventes utilizados para los ensayos en TLC y HPLC eran de grado HPLC, aportados por Scharlau (España). Todos los demás productos cuya procedencia no se indique en el apartado correspondiente provenían de Merck (Alemania), Sigma (EE.UU.) o Scharlau (España), y eran de grado analítico.

Todas las disoluciones y mezclas acuosas se realizaron con agua desionizada por ósmosis inversa con un sistema Milli-RX 75 (Millipore, EE.UU.), excepto las empleadas como solventes para HPLC, TLC y FPLC, donde se utilizó agua ultrapura obtenida tras filtrar el agua desionizada por un sistema Milli-Q® 185 (Millipore, EE.UU.).

Los gases utilizados, anhídrido carbónico, aire y nitrógeno, eran de alta pureza y fueron suministrados por Alphagaz (España).

3. RESULTADOS

3.1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN *Synechocystis* SP. PCC 6803

En estudios anteriores (Chávez *et al.*, 1995), se han aportado datos que indican la importancia de la glutamato deshidrogenasa cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria de crecimiento, a saber:

- Aumento de la actividad NADP-GDH a partir del cuarto día de crecimiento.
- Se ha observado un aumento de actividad CAT similar a la NADP-GDH, mediante fusión del promotor de *gdhA* con el gen *cat* que confiere resistencia a cloramfenicol, deduciéndose que hay una regulación transcripcional por fase de crecimiento.
- La estirpe SCh11, carente de actividad NADP-GDH, crece más lentamente que la estirpe silvestre (SFCQ5) cuando el cultivo se encuentra en sus niveles máximos de crecimiento (tras varias semanas); este fenómeno es más patente cuando se emplea amonio en lugar de nitrato como fuente de nitrógeno (Chávez, 1992).
- En experimentos de competencia entre la estirpe silvestre SFCQ5 y el mutante, SCh11, el número de células de SCh11 no llega al 20% del total en cultivos mantenidos en fase estacionaria de crecimiento.

Para profundizar en el papel fisiológico de la NADP-GDH se han llevado a cabo distintos experimentos encaminados a completar los estudios realizados previamente.

3.1.1. Expresión del gen *gdhA* a lo largo de un cultivo de *Synechocystis* sp. 6803

Para confirmar los datos de regulación transcripcional obtenidos mediante la fusión del promotor de *gdhA* con el gen *cat*, se realizaron estudios de expresión del gen *gdhA* mediante hibridación *Northern* a lo largo de un cultivo.

Se tomaron muestras de un cultivo de *Synechocystis* en medio BG11 para extraer RNA de las células a distintos tiempos, midiéndose los niveles de clorofila y proteína. La extracción de RNA se realizó según se indica en el apartado 2.4.12, y se hibridó con un fragmento interno de *gdhA*.

Como se muestra en la Figura 3, los niveles de transcritos tienen un patrón similar a los de actividad NADP-GDH y CAT descritos por Chávez *et al.*, 1995, aunque cabe destacar que el nivel máximo de expresión se alcanza en el estadio inicial de crecimiento para volver a subir al comienzo de la fase estacionaria. Este aumento de expresión durante la fase inicial también se observa como actividad, pero de una manera menos acentuada (Chávez, 1992).

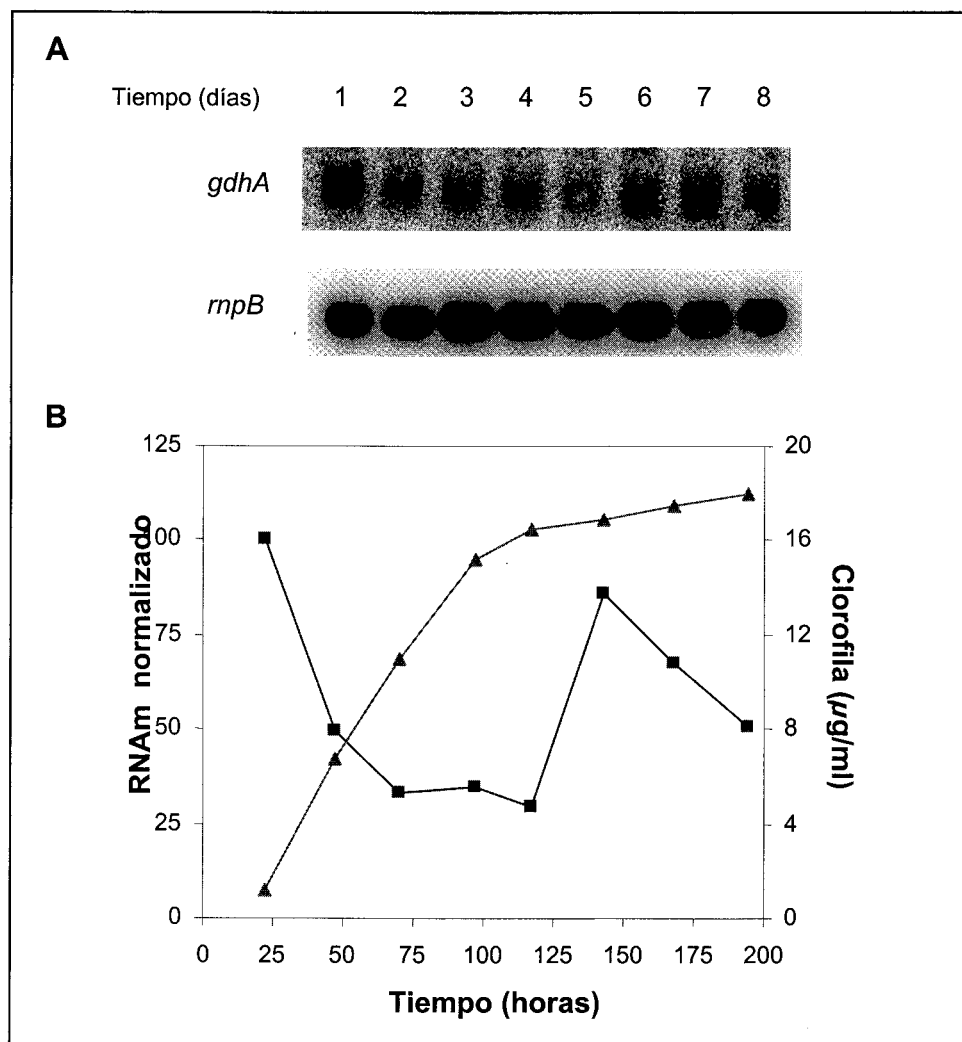


Figura 3. Niveles de transcrito *gdhA* a lo largo del crecimiento de un cultivo de *Synechocystis*.

A. RNA total (15 µg) extraído a distintos tiempos de células de *Synechocystis* cultivadas con gaseo (1,5% de CO₂ en aire) con nitrato como fuente de nitrógeno, se hibridó con un fragmento *Bst*EII- *Bst*EII, de 360 pb, interno al gen *gdhA*. Tras la hibridación, los filtros se lavaron e hibridaron con el gen *mpB*, que codifica la RNasa P (fragmento *Hind*III, de 450 pb).

B. Relación de la señal radiactiva *gdhA/mpB* (cuantificada en un InstantImager) normalizada al valor máximo (cuadrados) y niveles de clorofila a lo largo del crecimiento del cultivo (triángulos).

3.1.2. Caracterización del mutante carente de actividad NADP-GDH (SCh11)

3.1.2.1. Espectros de absorción de las estirpes silvestre y SCh11 de *Synechocystis* sp. 6803

La estirpe SCh11, carente de actividad GDH (Tabla 1), presenta un color más verdoso que la estirpe silvestre en cultivos líquidos. Esta diferencia de color queda reflejada en los espectros de

absorción de SCh11 y SFCQ5, tanto en fase inicial como tardía de crecimiento del cultivo (Figura 4).

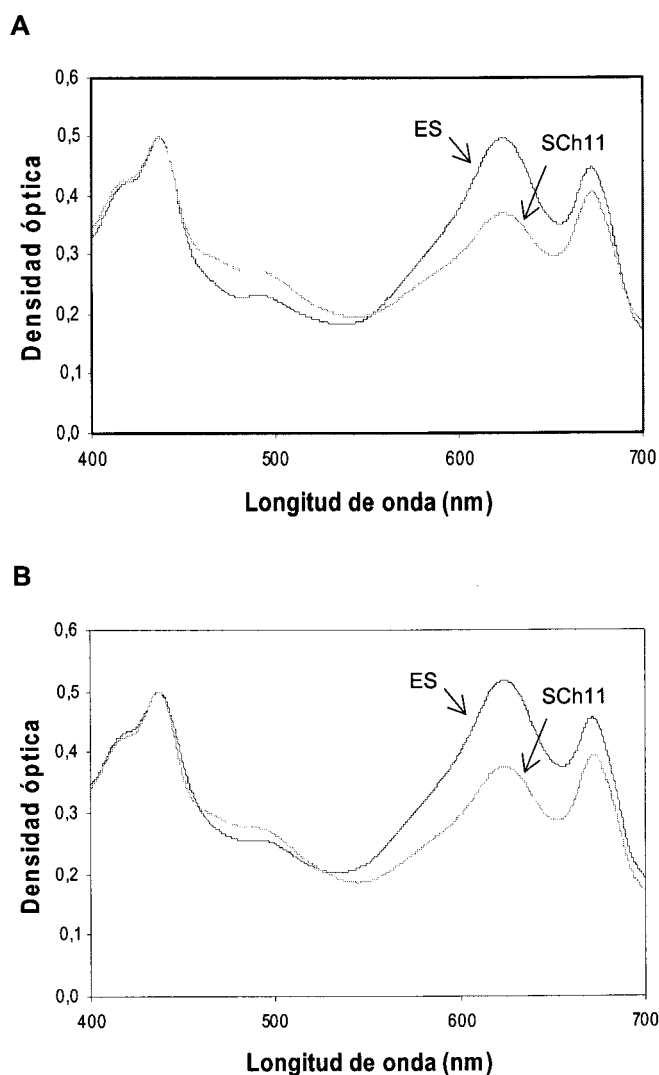


Figura 4. Espectros de absorción de cultivos de las estirpes silvestre (ES) y SCh11 de *Synechocystis*.

Células cultivadas en nitrato (A) o en amonio (B) como fuente de nitrógeno fueron recogidas en fase inicial de crecimiento, a $1 \mu\text{g}$ de chl/ml aproximadamente. Los espectros se obtuvieron como se indica en el apartado 2.7.1.1. y se normalizaron a un valor de DO de 0,5 a 437 nm.

Los espectros indican una diferencia importante entre SCh11 y SFCQ5 en cuanto a la relación de absorción entre el pico correspondiente a clorofila (437 nm) y el de la ficocianina c (624 nm). Este pigmento constituye, además de un componente del fotosistema II, un elemento de reserva nitrogenada que puede mobilizarse mediante sistemas específicos en condiciones de ausencia de nitrógeno (Collier y Grossman, 1992). En SCh11, la cantidad de ficocianinas es un 35% menor que en SFCQ5, indicando que en estas condiciones de crecimiento el mutante sin

actividad GDH tiene problemas en la asimilación de nitrógeno. Los resultados son similares empleando tanto nitrato como amonio como fuente de nitrógeno.

Los espectros de absorción de las estirpes SFCΩ5 y SCh11 en fase estacionaria, reflejan diferencias menores, pero a pesar de ello el mutante tiene una tasa menor de crecimiento (datos no mostrados).

3.1.2.2. Acumulación de glucógeno en las estirpes silvestre y SCh11 de *Synechocystis* sp. 6803

El glucógeno representa el principal reservorio de carbono en cianobacterias (Smith *et al.*, 1967) y se ha observado que se acumula cuando se somete a las células a carencia de nutrientes como nitrógeno (Lehmann y Wober, 1976). El estudio de los niveles de glucógeno en la estirpe SCh11 ayudaría a dilucidar si, efectivamente, la carencia de NADP-GDH implica una deficiencia en la asimilación de nitrógeno.

Para ello, se midieron los niveles de glucógeno en cultivos de las estirpes silvestre y SCh11 en fase inicial y estacionaria de crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Relación glucógeno/clorofila de las estirpes silvestre y SCh11.

Estirpe	Fase exponencial	Fase estacionaria
SFCΩ5	3,33 ± 0,60	2,99 ± 0,09
SCh11	6,23 ± 0,78	3,74 ± 0,05

Se recogieron muestras de células cultivadas en nitrato en fase exponencial (1-2 μg de clf/ml cultivo) y fase estacionaria (10-15 μg de clf/ml cultivo) y se procesaron según se indica en el apartado 2.7.5. Se muestran las medias de dos experimentos independientes junto con su desviación estándar.

Los resultados indican un aumento de los niveles de glucógeno en el mutante SCh11 de un 60% en fase exponencial y de un 25% en fase estacionaria, respecto a la estirpe silvestre. Estos datos vuelven a indicar que el mutante sin actividad NADP-GDH tiene un déficit de nitrógeno que implica un desequilibrio en la relación C/N y conlleva la acumulación del carbono en forma de glucógeno.

3.1.2.3. Relación entre los contenidos de carbono y nitrógeno en las estirpes silvestre y SCh11 de *Synechocystis* sp. 6803

Para determinar si la ausencia de NADP-GDH provoca una alteración en la asimilación global de nitrógeno, tanto en fase exponencial como estacionaria, se determinó la relación C/N en las estirpes silvestre y carente de NADP-GDH (SCh11) de *Synechocystis*.

La Tabla 7 muestra que no hay diferencias significativas en la relación C/N entre las 2 estirpes cuando son cultivadas en amonio. Sin embargo, la diferencia en células cultivadas en

nitrito es estadísticamente significativa a $\alpha = 0,01$, con una relación C/N mayor en la estirpe carente de GDH que en la silvestre, lo que implica que, aunque no de manera acusada, la estirpe SCh11 presenta unos niveles mayores de carbono, indicativos de una menor asimilación de nitrógeno.

Tabla 7. Relación carbono/nitrógeno de las estirpes silvestre y SCh11.

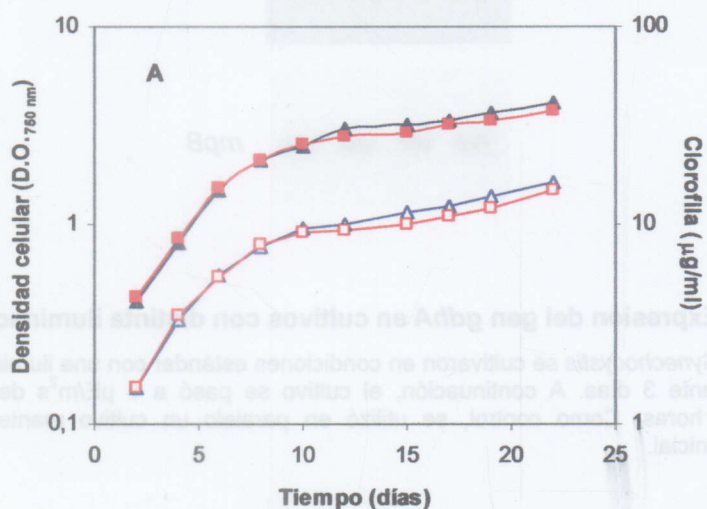
Estirpe	Cultivo en nitrato		Cultivo en amonio	
	Fase exponencial	Fase estacionaria	Fase exponencial	Fase estacionaria
SFCQ5	4,065 ± 0,029	4,480 ± 0,039	4,041 ± 0,076	4,605 ± 0,128
SCh11	4,105 ± 0,012	4,583 ± 0,040	4,045 ± 0,087	4,574 ± 0,096

Se recogieron muestras de células cultivadas en nitrato o en amonio en fase exponencial (1 μg de clf/ml cultivo) y fase estacionaria (10 μg de clf/ml cultivo) y se procesaron según se indica en el apartado 2.7.4. Se muestran las medias de ocho experimentos independientes junto con su desviación estándar.

3.1.3. Efecto de la luz sobre la NADP-glutamato deshidrogenasa

La disponibilidad de luz es uno de los factores que limitan el crecimiento exponencial de un cultivo, provocando que entre en fase estacionaria. Debido a que la NADP-GDH tiene una importante función fisiológica en fase estacionaria, se ha estudiado si la disponibilidad de luz, *per se*, está implicada en la regulación fisiológica de la glutamato deshidrogenasa.

Para ello, hemos determinado la tasa de crecimiento de las estirpes silvestre y SCh11 en cultivos mantenidos a baja intensidad de luz (5 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), condiciones en las cuales la luz es limitante. Las células se cultivaron en medio BG11 con gaseo al 1,5% de CO_2 en aire durante 20 días. En estas condiciones, según se muestra en la Figura 5, ambas estirpes crecieron de manera logarítmica desde una concentración inicial de clorofila de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sin observarse diferencias apreciables ni en la concentración de clorofila ni en la densidad celular de los cultivos.



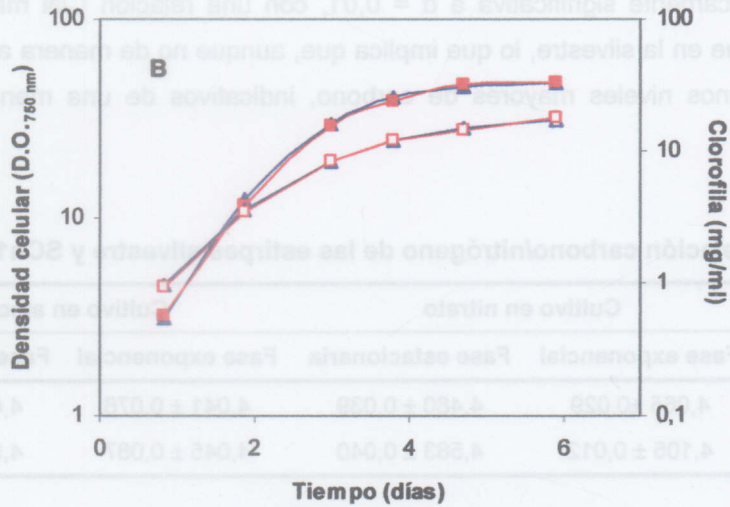


Figura 5. Curva de crecimiento de las estirpes silvestre, SFCQ5, y mutante, SCh11, de *Synechocystis* cultivadas con distinta iluminación.

Se cultivaron ambas estirpes con gaseo y con amonio como fuente de nitrógeno, a $5 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (A) y $50 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (B) de iluminación, tomándose muestras a distintos tiempos para determinar clorofila (símbolos claros) y densidad óptica (símbolos oscuros). Estirpe silvestre: triángulos; SCh11: cuadrados.

Por otro lado, para ver si la disponibilidad de luz regula la transcripción del gen *gdhA*, que codifica la NADP-GDH, se realizó un estudio de expresión del gen en dos cultivos, uno mantenido en iluminación normal ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), y otro en baja intensidad de luz ($5 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$). Según se observa en la Figura 6, el nivel de transcrito, en lugar de aumentar, disminuye cuando baja la intensidad de luz que llega al cultivo.

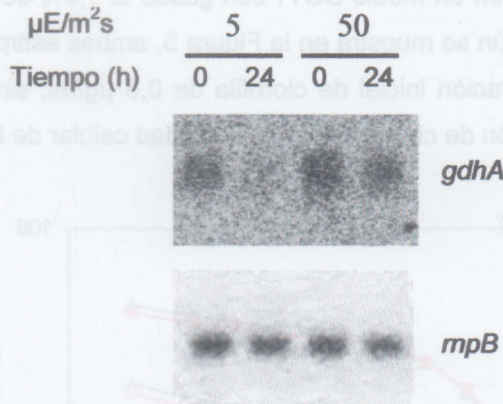


Figura 6. Expresión del gen *gdhA* en cultivos con distinta iluminación.

Células de *Synechocystis* se cultivaron en condiciones estándar con una iluminación de $50 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ durante 3 días. A continuación, el cultivo se pasó a $5 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ de iluminación durante 24 horas. Como control, se utilizó en paralelo un cultivo mantenido con la iluminación inicial.

Según los datos obtenidos en los dos experimentos anteriores, la disponibilidad de luz no es un factor que influya directamente en la regulación de la NADP-GDH; por tanto, debe haber otros factores implicados en la regulación de la NADP-GDH.

3.2. ACTIVIDAD GLUTAMATO DESCARBOXILASA EN EXTRACTOS CRUDOS DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

3.2.1. Determinación de la actividad glutamato descarboxilasa mediante HPLC

La primera aproximación al estudio de la glutamato descarboxilasa fue buscar su actividad en extractos crudos de *Synechocystis*. Los métodos clásicos de ensayo de la actividad glutamato descarboxilasa se basan en la cuantificación del $^{14}\text{CO}_2$ formado a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato (Wu *et al.*, 1985). En nuestro caso, hemos puesto a punto un método de ensayo de actividad glutamato descarboxilasa mediante la determinación de los niveles de glutamato y GABA por HPLC. De esta manera se consigue relacionar la formación de GABA con la desaparición de glutamato. Este tipo de ensayo ya había sido descrito anteriormente (Molnar-Perl, 2001), pero en nuestro caso, el sistema de derivatización fue diferente, utilizando *o*-ftaldialdehído (OPA) como agente derivatizante, (Rossetti y Lombard, 1996), consiguiendo un sistema de medición más rápido y sencillo.

El OPA es un compuesto que se une específicamente a moléculas con aminas primarias, como es el caso de todos los aminoácidos, salvo la prolina. El producto de esta unión es un complejo OPA-aminoácido fluorescente y, por tanto, cuantificable con un detector de fluorescencia (Figura 7). La separación se lleva a cabo en fase reversa, empleando una columna de C_{18} , donde los compuestos se separan según su hidrofobicidad.

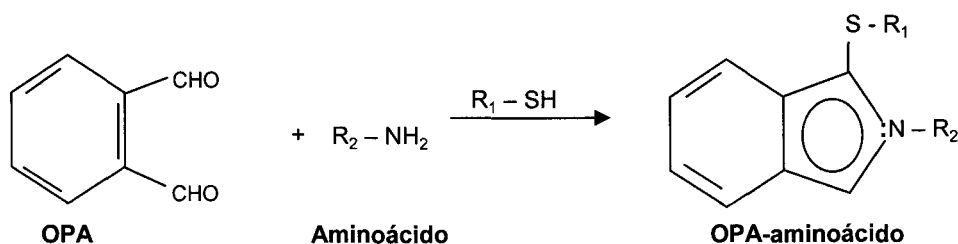


Figura 7. Reacción OPA – aminoácido.

La reacción se ve favorecida por la presencia de un agente reductor (β -mercaptoetanol) que evita la formación de otras estructuras no fluorescentes.

Como primer paso, se ha estudiado la estabilidad de los complejos OPA-glutamato y OPA-GABA, ya que los complejos OPA-aminoácidos no siempre son estables y tienden a degradarse con el tiempo. Hemos determinado los tiempos de derivatización en los cuales los

niveles de fluorescencia de estos dos aminoácidos fuesen óptimos. Como se observa en la Figura 8, mientras que el complejo con el glutamato es bastante estable incluso a tiempos superiores de 10 min., el del GABA es mucho menos estable y su degradación es casi exponencial respecto al tiempo. Por tanto, se decidió incubar las muestras con OPA durante 90 s, antes de inyectarla en el HPLC.

Al realizarse la carrera de forma isocrática, estudiamos qué tampón ofrecía una separación óptima entre los dos aminoácidos. Se utilizó un tampón previamente descrito (Marqués *et al.*, 1989), que contenía tampón fosfato sódico (pH 6,5), metanol y tetrahidrofurano (ver apartado 2.3.2.1) y realizamos ensayos a distintas concentraciones de metanol, manteniendo constante los otros dos componentes. A partir de los cromatogramas (datos no mostrados) se decidió que la concentración de metanol en el tampón de ensayo fuese del 35%, con la cual los tiempos de retención para glutamato y GABA eran de 1,7 y 9,3 min., respectivamente.

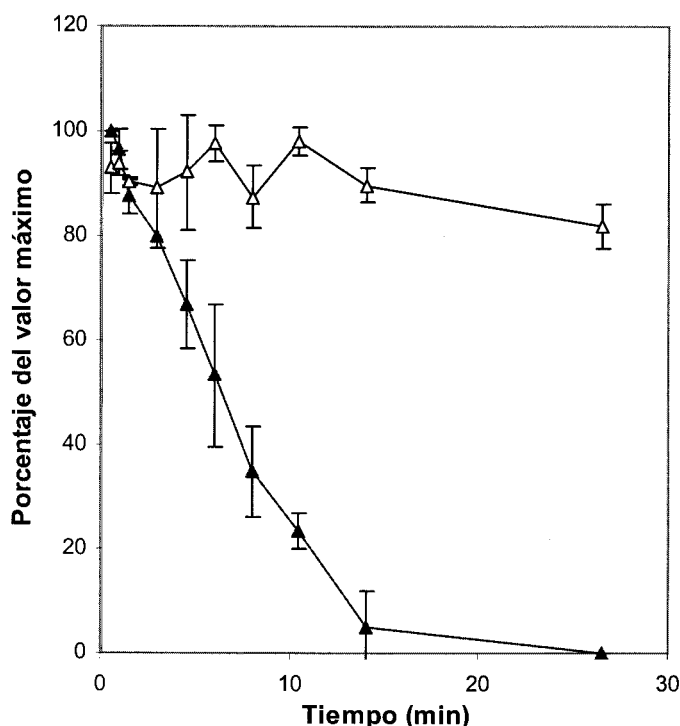


Figura 8. Estabilidad de los complejos OPA-aminoácido.

Se derivatizaron los aminoácidos glutamato (símbolos claros) y GABA (símbolos oscuros) como se describe en el apartado 2.3.2.1, pero incubándolos en presencia de OPA a los tiempos que se indican antes de la inyección. Se muestra la desviación estándar de 3 experimentos.

Una vez optimizado el protocolo de derivatización para GABA y glutamato, realizamos un control para confirmar que el ensayo funcionaba según el protocolo previsto. Para ello, utilizamos una muestra comercial de glutamato descarboxilasa de *Escherichia coli* y ensayamos la actividad

según se indica en el apartado 2.3.2.1, en tampón fosfato potásico pH 5,0, 50 mM. Los resultados se muestran en la Figura 9, confirmándose la operatividad el ensayo.

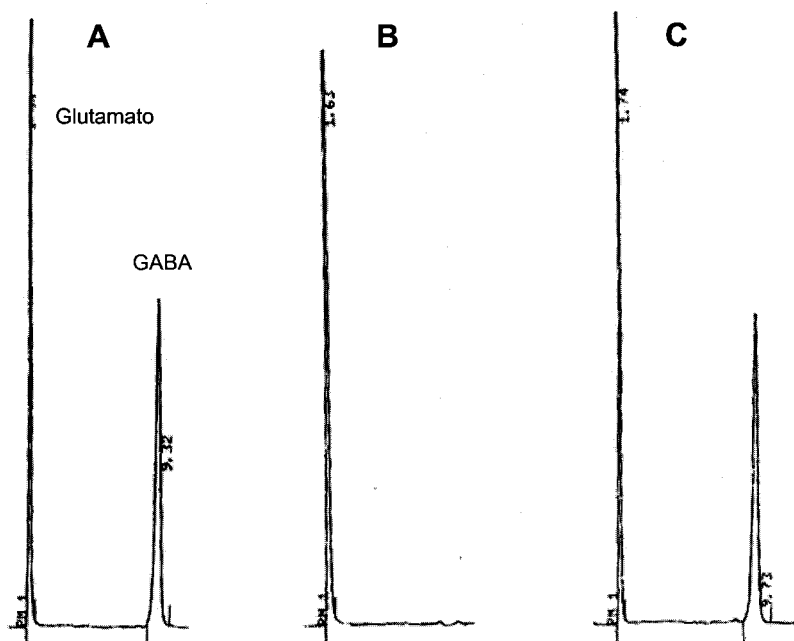


Figura 9. Ensayos de actividad glutamato descarboxilasa en *Escherichia coli* por HPLC.

A.- Cromatograma de un patrón de glutamato y GABA (300 pmol cada uno)

B.- Cromatograma de un ensayo de actividad GAD a tiempo 0.

C.- Cromatograma de un ensayo de actividad GAD tras 15 min. de incubación a 37 °C.

3.2.1.1. Comparación de la actividad glutamato descarboxilasa medida por HPLC y radiactividad

Para confirmar que el método utilizado es adecuado, se comparó la actividad medida por medio de HPLC con el ensayo convencional empleando $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato. Los ensayos se realizaron según se indica en el apartados 2.3.2.1 y 2.3.2.2, respectivamente, con enzima GAD comercial de *Escherichia coli* y en las mismas condiciones. Los experimentos se realizaron por triplicado, obteniéndose unos valores de $110,9 \pm 10,9$ U/mg prot. cuando se determinó mediante radiactividad y $137,1 \pm 11,9$ U/mg prot. cuando se realizó por HPLC. Por tanto, los datos confirman que el protocolo utilizado es apropiado.

3.2.2. **Caracterización de la actividad glutamato descarboxilasa en extractos crudos de *Synechocystis* sp. 6803**

Una vez puesto a punto el protocolo de determinación de la actividad GAD mediante HPLC, ensayamos la actividad en extractos crudos de *Synechocystis*. Se realizaron ensayos en

distintas condiciones hasta que se consiguió detectar actividad, a pHs inferiores a 6, típicos de las glutamato descarboxilasas de bacterias.

Para confirmar que la formación de GABA se debe específicamente a una actividad enzimática glutamato descarboxilasa, se realizaron diversos ensayos omitiendo alguno de los sustratos, ó bien hirviendo el extracto crudo (Tabla 8), confirmando que la actividad sólo aparece con el sistema completo.

Tabla 8. Caracterización de la actividad glutamato descarboxilasa en *Synechocystis*.

Sistema	Actividad específica (mU/mg proteína)
Completo	63,8
Sin glutamato	0,0
Sin extracto	0,0
Completo, con extracto hervido	0,0

Los ensayos se llevaron a cabo según se describe en el apartado 2.3.2.1. Donde se indica, el extracto crudo se hirvió durante 5 min. y, posteriormente, se enfrió en hielo.

Con objeto de determinar las condiciones óptimas de ensayo, se calculó la Km para el glutamato y su pH óptimo en extractos crudos libres de células. Tras realizarse los ensayos por duplicado, se determinó una Km de la GAD para el glutamato de 3 mM y un pH óptimo de 5,2, usando tampón MES-NaOH. Finalmente, señalar que el fosfato de piridoxal, cofactor de la GAD, no es necesario en los ensayos con extractos crudos, posiblemente debido a que, en el proceso de obtención del extracto crudo, el cofactor todavía se mantiene unido a la enzima (datos no mostrados).

3.3. PURIFICACIÓN DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 SOBREEXPRESADA EN *Escherichia coli*.

3.3.1. Clonación del gen *gadA* por PCR

Una vez comprobado que *Synechocystis* tiene actividad GAD, nos dispusimos a purificar la enzima para su posterior caracterización. Analizando el genoma de la cianobacteria, secuenciado en su totalidad (Kaneko *et al.*, 1996), se determinó la presencia de una orf, sll1641, con una alta homología con otros genes de GAD previamente secuenciados.

La clonación del gen *gadA* se llevó a cabo mediante PCR. Para ello, se utilizaron dos oligonucleótidos (*gad1* y *gad2*), ver Tabla 5, situados en los extremos del gen y que introducían sendos sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* (en *gad1* y *gad2*, respectivamente).

Tras realizarse la PCR, según se indica en el apartado 2.4.4, se obtuvo un fragmento de 1,4 kb, según lo esperado, que se clonó en el vector de clonación pGEM-T. Para seleccionar aquellas cepas cuyo fragmento de *gadA* hubiese sido clonado correctamente, es decir, sin error en su secuencia y, por tanto, que expresasen una GAD funcional, se aprovechó que el gen *gadA* pudiese ser expresado desde el promotor de *lacZ* existente en el vector. Para ello, de los clones obtenidos, se seleccionaron aquellos donde el gen *gadA* estuviese clonado en la misma orientación que el gen *lacZ* del vector y, posteriormente, se ensayó la actividad GAD en dichos clones, junto con un control sin plásmido, obteniéndose un clon con unas 100 veces más actividad que el control, lo que indica una actividad GAD adicional a la endógena de *E. coli*. El plásmido (pJM4) de este clon se aisló y se utilizó para expresar la GAD en *E. coli*. No obstante, para confirmar que pJM4 tiene la secuencia del gen *gadA* correcta, dicho gen fue secuenciado empleando como cebadores los oligonucleótidos comerciales "Reverse primer" y "M13-20 primer" (Roche, Suiza), específicos para secuenciar plásmidos derivados de pBlueScript, como pGEM-T, así como otros dos oligonucleótidos internos al gen, para secuenciar la región central. Tras comparar los resultados con la secuencia publicada, no encontramos ningún cambio de base a lo largo de toda la secuencia.

3.3.2. Sobreexpresión del gen *gadA* de *Synechocystis* en *Escherichia coli*

Para purificar la GAD de *Synechocystis* sobreexpresándola en *E. coli*, se construyó el plásmido pJM5, derivado de pET-3a. Este plásmido comercial permite clonar genes empleando el promotor de T7 y expresarlo en grandes cantidades mediante inducción con IPTG. Se utilizó la estirpe de *E. coli* BL21, adecuada para que se produzca la inducción del gen. Para ello, se extrajo el gen *gadA* clonado en pJM4 con las enzimas *NdeI* y *BamHI* y se introdujo en pET-3a.

Tras comprobarse mediante electroforesis desnaturalizante de proteínas que se expresaba la GAD y que ésta tenía actividad, se fijaron las condiciones de cultivo en las que la sobreexpresión de la proteína fuese óptima. Se realizaron ensayos de inducción del gen a distintas temperaturas y en diferentes medios de cultivo, determinándose que la expresión de la GAD en relación a la cantidad total de proteína, era óptima a 30 °C en medio mínimo M9.

3.3.3. Purificación de la proteína glutamato descarboxilasa de *Synechocystis* sp. 6803

Para obtener la cantidad de enzima pura necesaria para su caracterización físico-química, se transformaron, mediante electroporación, células de *E. coli* BL21 con el plásmido pJM5, tras lo cual, se inocularon en 6 l de medio mínimo M9 con ampicilina y se cultivaron a 30 °C hasta una D.O.₅₈₀ de 0,5. A continuación, se le añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se continuó cultivando 3 horas más. Finalmente, las células se recogieron por centrifugación y, tras lavarse una vez en tampón A (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5) y resuspenderse en un volumen apropiado del

mismo tampón suplementado con PMSF 1 mM, se rompieron por tratamiento con ultrasonidos. El sobrenadante obtenido tras una centrifugación a 19.000 x g, durante 15 min. a 4 °C, constituyó el extracto crudo libre de células.

El extracto crudo se fraccionó con sulfato amónico entre el 30 y el 60% de saturación y el sedimento obtenido se resuspendió en un volumen adecuado de tampón A. A continuación, para eliminar las sales presentes en el extracto, éste se aplicó a una columna de filtración en gel, Sephadex-G25, recogiendo las fracciones con proteína y libres de sales.

El siguiente paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, cuya columna se adaptó a un sistema de purificación de proteínas de alta presión, ÄKTApurifier. El extracto libre de sales se aplicó a la columna, equilibrada con tampón A, y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 a 0,4 M) en el mismo tampón, a un flujo constante de 1 ml/min. Como se observa en la Figura 10, la proteína eluyó a, aproximadamente, 0,25 M de NaCl. Se tomaron las fracciones con mayor concentración de enzima, estimada por electroforesis desnaturalizante.

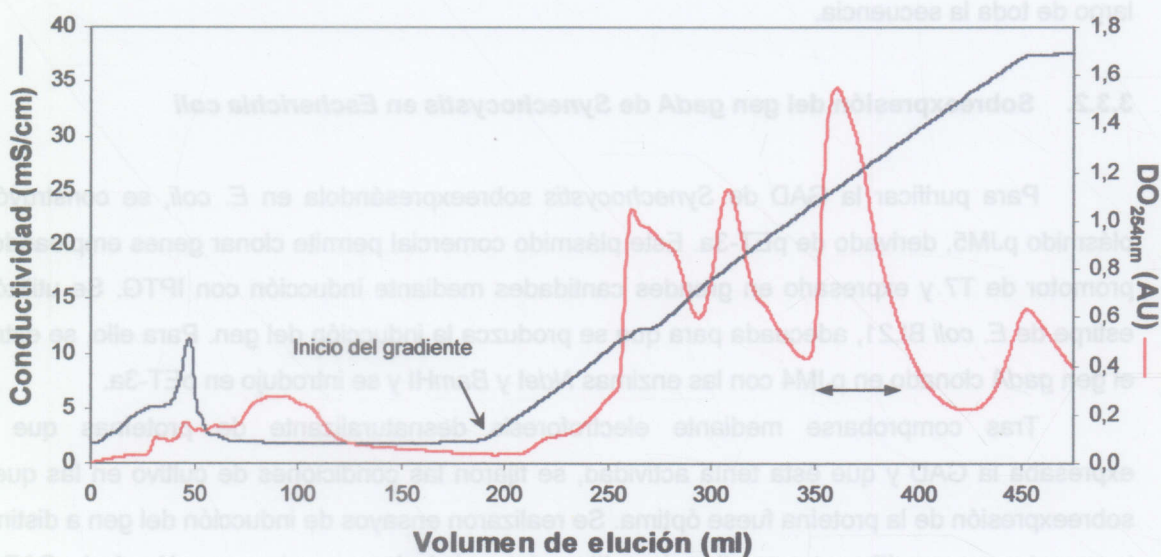


Figura 10. Purificación de la glutamato descarboxilasa de *Synechocystis* por cromatografía de intercambio iónico.

La elución se realizó con un gradiente lineal de 0 a 0,4 M de NaCl. La GAD eluyó a una conductividad de entre 24 y 29 mS/cm (↔).

El extracto obtenido en el paso anterior se concentró hasta un volumen final de 2 ml empleando un sistema de ultrafiltración Amicon, con una membrana YM10 (que retiene moléculas cuya Mm sea superior a 10 kDa).

Como paso final de la purificación, se realizó una cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex S-200 HiLoad 26/60 grado preparativo adaptada al sistema ÄKTApurifier. La

columna se equilibró con tampón A suplementado con NaCl 150 mM y se eluyó a un flujo de 0,5 ml/min. en el mismo tampón, obteniéndose un pico principal que correspondió a la glutamato descarboxilasa purificada a homogeneidad electroforética (Figura 11).

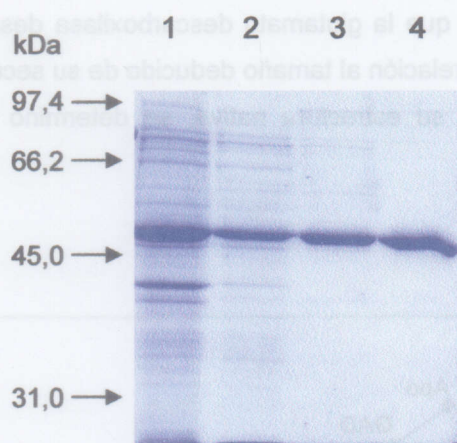


Figura 11. Electroforesis desnaturalizante de proteínas de las distintas etapas de purificación de la glutamato descarboxilasa.

Aproximadamente 5 µg de proteína total de los principales pasos de purificación se sometieron a electroforesis desnaturalizante. Carril 1, extracto crudo; carril 2, sedimento del sulfato amónico al 60% de saturación; carril 3, eluato de la DEAE-celulosa; carril 4, eluato de la filtración en gel en Superdex S-200.

Con anterioridad a la elución de los distintos extractos en las columnas de intercambio iónico y filtración en gel, éstos se incubaron con fosfato de piridoxal 0,1 mM durante 15 min. a 25 °C. Esto se debe a que en ambos procesos de purificación, el fosfato de piridoxal se separa de la GAD provocando un cambio en la estructura de la enzima que hace que ésta eluya de forma distinta a la holoenzima (apartado 3.4.4.1), siendo necesario incubarla con el cofactor para que recupere su conformación nativa.

En la Tabla 9 se resumen los resultados de la purificación. Debido a que ya se partía de una actividad específica elevada, la purificación fue poco mayor de 7 veces, con una actividad específica de 115 U/mg prot., pero a homogeneidad electroforética (Figura 11).

Tabla 9. Purificación de la glutamato descarboxilasa de *Synechocystis*.

Paso de purificación	Volumen (ml)	Act. (U)	Prot. (mg)	Act. esp. (U/mg)	Rend. (%)	Purif. (veces)
Extracto crudo	17,9	5118	326,0	15,7	100	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30-60%	6,4	4559	262,0	17,4	89	1,1
DEAE-celulosa	64,0	4111	60,8	67,6	80	4,3
Superdex S-200	8,0	3692	32,1	115,0	72	7,3

3.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA GLUTAMATO DESCARBOXILASA

3.4.1. Determinación del número de subunidades de la enzima

Una vez confirmado que la glutamato descarboxilasa desnaturalizada tiene la movilidad electroforética esperada, en relación al tamaño deducido de su secuencia codificante (Figura 11) y con el objetivo de estudiar su estructura nativa, se determinó su masa molecular mediante filtración en gel.

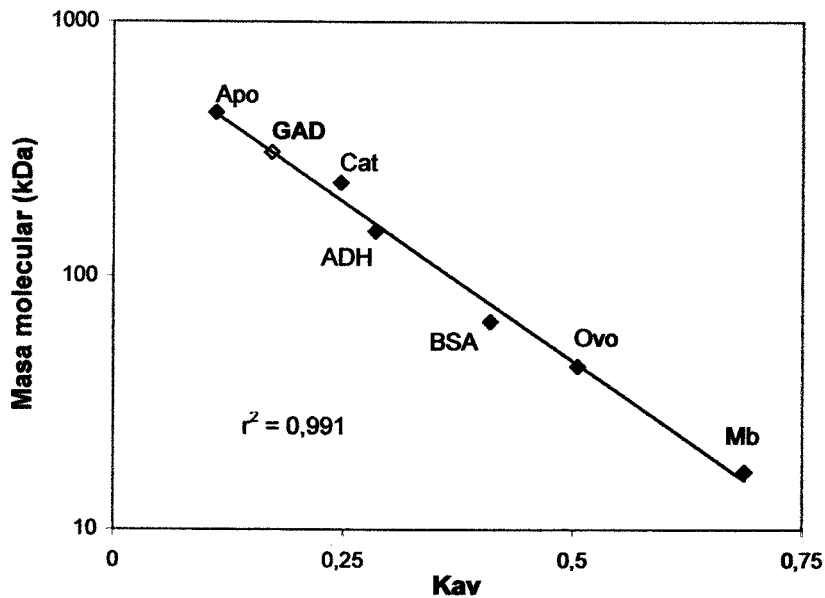


Figura 12. Determinación de la masa molecular nativa de la glutamato descarboxilasa de *Synechocystis*.

Los datos de Kav se obtuvieron a partir del volumen de elución de cada proteína en la filtración en gel, según se indica en el apartado 2.2.5.3. Apo, apoferritina; Cat, catalasa; ADH, alcohol deshidrogenasa; BSA, seroalbúmina bovina; Ovo, ovoalbúmina; Mb, mioglobina.

Para determinar la Mm nativa, se utilizó la GAD purificada en el apartado 3.3, y se filtró a través de una columna Superdex S-200 HiLoad 26/60 de grado preparativo, en las mismas condiciones que las descritas en el apartado anterior. Finalmente, se determinó su masa molecular nativa empleando patrones de masa molecular conocida, previamente eluidos en la misma columna y en las mismas condiciones. Como se observa en la Figura 12, se estimó en unos 300 kDa su masa molecular, por lo que, teniendo en cuenta que la masa molecular de la subunidad es de 53 kDa, se deduce una configuración hexamérica. Este resultado confirma que es una GAD típica de bacterias, cuya configuración hexamérica se diferencia de las GADs eucarióticas, que

suelen ser diméricas (Roberts y Simonsen, 1963; Satyanarayan y Nair, 1985; Strausbauch y Fischer, 1970).

3.4.2. Propiedades catalíticas de la glutamato descarboxilasa

3.4.2.1. Efecto del pH

Una característica de las glutamato descarboxilasas de bacterias es que su pH óptimo es inferior a 6,0. Como se observa en la Figura 13, el pH óptimo de la GAD purificada de *Synechocystis*, como ocurre con la presente en extractos crudos, es 5,2 (tampón MES-NaOH), siendo de destacar que a pHs superiores la actividad disminuye muy rápidamente, hasta desaparecer cuando es superior a 6. Este drástico efecto, típico de GADs bacterianas, se debe a la interacción entre el fosfato de piridoxal y la GAD.

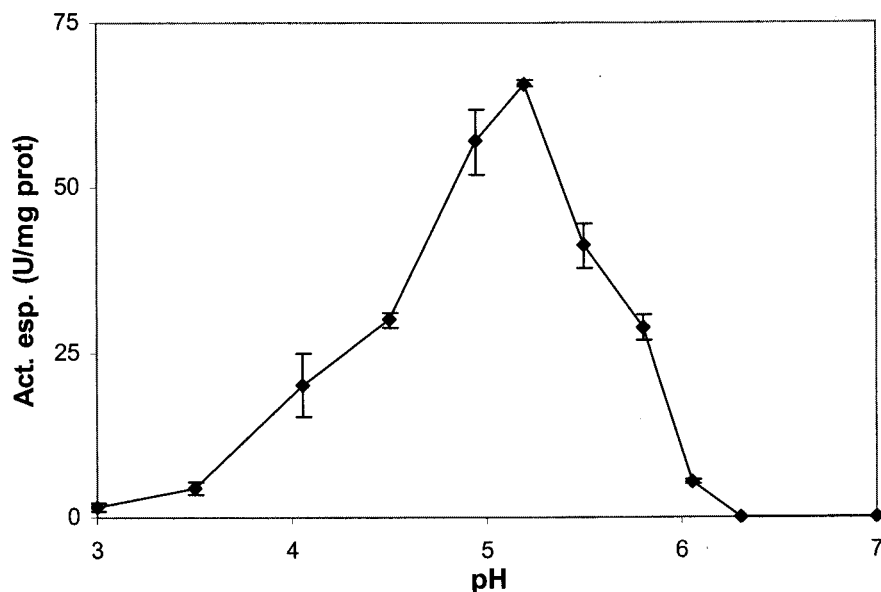


Figura 13. Efecto del pH sobre la actividad glutamato descarboxilasa.

La actividad se determinó como se indica en el apartado 2.3.2.1, pero empleando tampón citrato (pHs 3 a 5), MES-NaOH (5,2 a 6,3) o HEPES-NaOH (pH 7). Todos a una concentración de 50 mM. Se muestra la desviación estándar de tres ensayos.

3.4.2.2. Constantes de Michaelis-Menten (K_m)

Para determinar el grado de afinidad de la GAD por el glutamato y por el fosfato de piridoxal, se realizaron ensayos a distintas concentraciones de cada compuesto, en el caso del fosfato de piridoxal empleando apoenzima obtenida como se indica en el apartado 3.4.4.2.

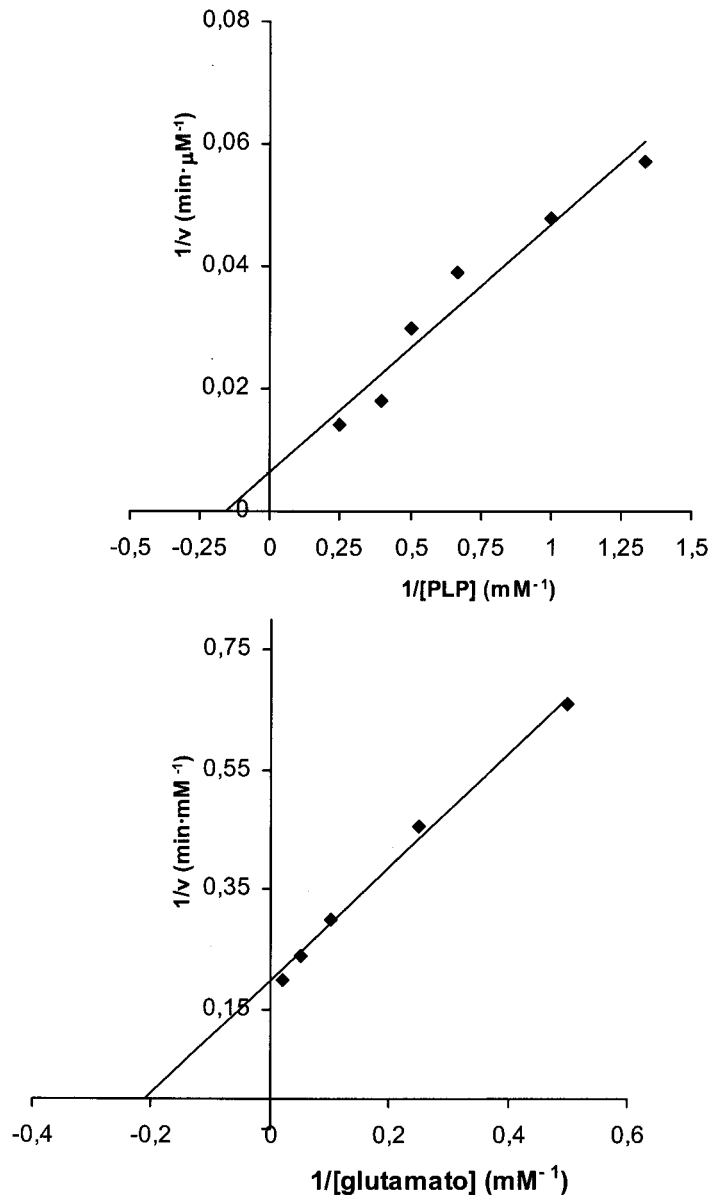


Figura 14. Determinación de las K_m de la glutamato descarboxilasa de *Synechocystis* para glutamato y fosfato de piridoxal.

Las condiciones de ensayo fueron las convencionales, si bien en los ensayos con fosfato de piridoxal, la mezcla de ensayo se preincubó con el cofactor durante 15 min. previamente a la adición del glutamato.

Las representaciones de dobles inversos de los resultados obtenidos (Lineweaver-Burk), se muestran en la Figura 14. Las K_m calculadas para el glutamato y el fosfato de piridoxal fueron 2,4 mM y 4,7 μ M, respectivamente, siendo valores similares a los que presentan otras GADs procarióticas.

3.4.3. Efecto de distintos compuestos sobre la actividad glutamato descarboxilasa

3.4.3.1. Cationes

Debido a que algunas GADs, sobre todo de plantas (Zik *et al.*, 1998), están reguladas por los niveles de Ca^{2+} intracelular, hemos estudiado el efecto de los cationes metálicos en la actividad GAD de *Synechocystis*. De los cationes ensayados, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ no ejercieron efecto alguno sobre la actividad; en cambio, Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} , a concentraciones de 20 mM inhibían la actividad hasta en un 70%.

3.4.3.2. Intermediarios del ciclo de Krebs

En *E. coli*, se ha observado una inhibición de la GAD por parte de distintos intermediarios del ciclo de Krebs (Gerig y Kwock, 1979). Tras ensayar la actividad GAD en presencia de distintos ácidos dicarboxílicos (oxalacetato, malato, succinato y 2-oxoglutarato), solo se observó una inhibición de hasta el 90% cuando la concentración fue superior a 25 mM, mientras que en *E. coli*, una inhibición similar se da a concentraciones más bajas de los mismos ácidos (3 a 5 mM) (datos no mostrados).

3.4.3.3. Efecto de inhibidores de otras glutamato descarboxilasas

Se utilizaron inhibidores de las glutamato descarboxilasas que se caracterizan por interferir en la unión enzima-fosfato de piridoxal, observándose inhibición en los 3 compuestos ensayados (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad glutamato descarboxilasa de *Synechocystis* en presencia de inhibidores.

Compuesto	Concentración (mM)	Actividad remanente (%)
Gabaculina	0,1 μM	15,7
	1,0 μM	6,9
Aminooxiacetato	0,1 mM	0,0
	1,0 mM	0,0
β -mercaptoetanol	2,0 mM	71,3
	25,0 mM	26,7

Los ensayos se realizaron según se indica en el apartado 2.3.2.1, utilizando GAD purificada, en presencia de fosfato de piridoxal (0,1 mM) y de los inhibidores indicados. El 100% de actividad corresponde a una actividad específica de 102 U/mg prot.

3.4.3.4. Especificidad por el sustrato

Para determinar el grado de especificidad de la glutamato descarboxilasa por su sustrato, glutamato, se ensayó la actividad GAD utilizando los siguientes aminoácidos como sustratos: Asp, Ala, Gly, Gln, Arg, Pro, Ser y D-Glu. Los ensayos se realizaron según se indica en el apartado 2.3.2.1, a una concentración final de cada aminoácido de 20 mM. Se determinó la presencia de actividad GAD dependiente de cada aminoácido por disminución de éstos tras cuantificarlos en el HPLC. Un vez realizado los ensayos, en ningún caso se observó descarboxilación asociada a la GAD, lo que demuestra que se trata de una GAD típica procariótica con una especificidad muy alta por su sustrato.

3.4.4. **Estudio de la interacción entre el fosfato de piridoxal y la glutamato descarboxilasa**

3.4.4.1. Efecto del fosfato de piridoxal sobre la glutamato descarboxilasa

Cuando se intentó purificar por primera vez la GAD, se observó que, tras eluir el extracto de la columna de filtración en gel Superdex S-200, se obtenían dos fracciones principales con actividad glutamato descarboxilasa (Figura 15).

No obstante, cuando la actividad se ensayaba en ausencia de fosfato de piridoxal, solo una de las fracciones (F1) mantenía la actividad, siendo esta fracción la que contiene la enzima con el cofactor unido (holoenzima), mientras que la otra fracción (F2) corresponde a la enzima que ha perdido el cofactor (apoenzima), pues sólo tiene actividad GAD cuando se preincuba con fosfato de piridoxal (Tabla 11).

Tabla 11. Actividad glutamato descarboxilasa en las fracciones obtenidas de la filtración en gel de la Figura 15 en presencia y ausencia de fosfato de piridoxal.

Fracción	Actividad específica (U/mg prot.)
F1	55,3
F1 + piridoxal-P	44,6
F2	0,0
F2 + piridoxal-P	53,7

Las condiciones de ensayo se indican en el apartado 2.3.2.1. La preincubación con fosfato de piridoxal se realizó a 25 °C, durante 15 min. con una concentración final de 20 μ M.

De hecho, cuando se preincuba F2 con el cofactor y se eluye de la columna de filtración en gel, se obtiene principalmente una fracción que corresponde a la holoenzima (Figura 15). Tras

calcular el volumen de elución de la apoenzima y compararlo con la recta patrón, ésta tenía una movilidad equivalente a una masa molecular de 110 kDa, aunque esto no implica necesariamente un cambio en la estructura de la GAD hacia un dímero, sino que puede ser debido a una deformación de la enzima cuya estructura globular se altere, lo que provocaría una migración anormal en la filtración en gel.

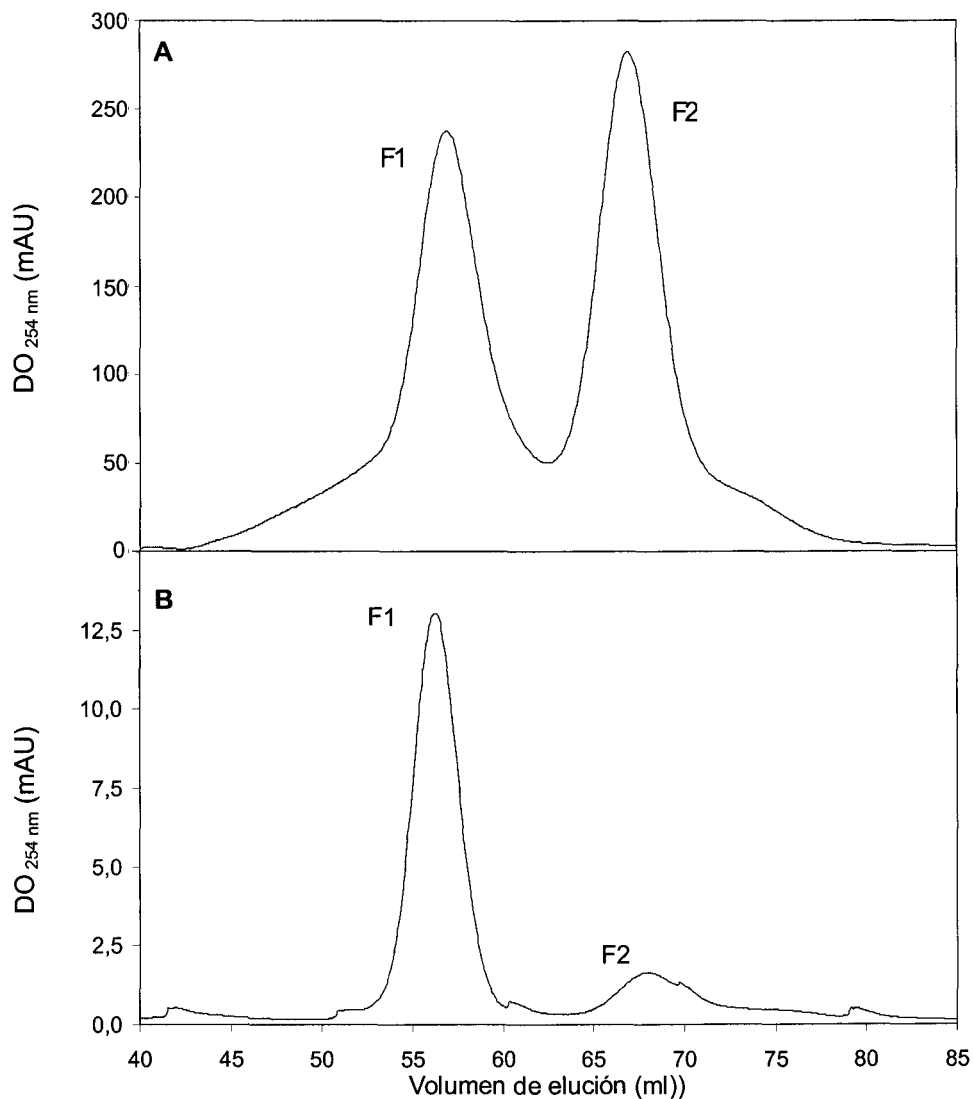


Figura 15. Perfil de elución en Superdex S-200 de una preparación de glutamato descarboxilasa pura sin preincubar con fosfato de piridoxal (A) y de la fracción F2 de la misma tras preincubarla con fosfato de piridoxal (B).

Las condiciones de la elución se indican el apartado 3.4.1. La preincubación con fosfato de piridoxal se realizó a 25 °C, durante 15 min. con una concentración final de 20 μ M.

Un efecto similar se observó al llevar a cabo una electroforesis nativa de proteínas, donde la fracción de holoenzima (F1) muestra una movilidad diferente a la fracción de apoenzima (F2). Como se puede observar en la Figura 16, tras preincubar la apoenzima con el cofactor, se recuperaba la movilidad de la holoenzima.

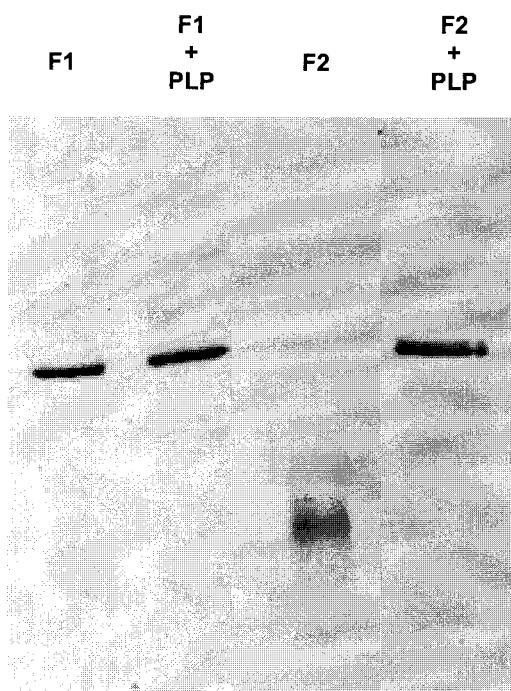


Figura 16. Electroforesis nativa de las fracciones de glutamato descarboxilasa obtenidas en la filtración en gel (Figura 15).

La electroforesis se realizó según se indica en el apartado 2.2.6.2. Las condiciones de incubación con fosfato de piridoxal fueron las mismas de la Tabla 11.

La recuperación de la estructura nativa en presencia de fosfato de piridoxal también se observa en los espectros de absorción de la apoenzima en ausencia y presencia del cofactor, pues la base de Schiff que se establece entre la enzima y el fosfato de piridoxal genera un máximo de absorción a 410 – 420 nm. Este patrón de absorción, característico de las enzimas con fosfato de piridoxal, que no se observa en la preparación de apoenzima, se recupera tras su preincubación con el cofactor. Estos resultados confirman que la reconstitución de la holoenzima implica la formación de la base de Schiff necesaria para que la enzima sea activa (Figura 17).

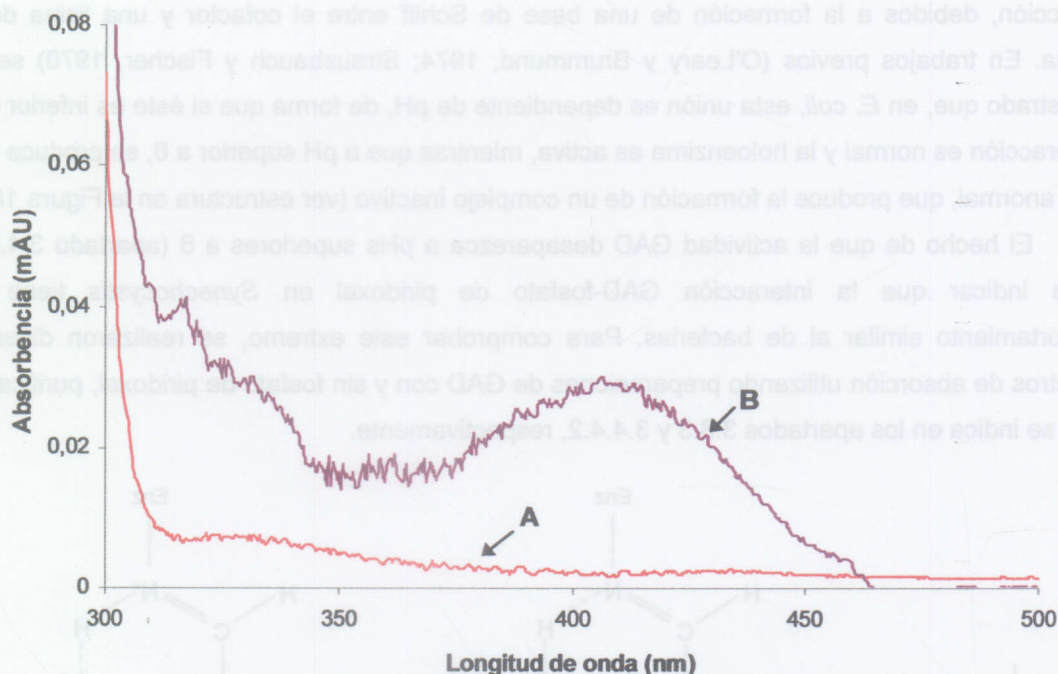


Figura 17. Espectros de absorción de la glutamato descarboxilasa en ausencia y presencia de fosfato de piridoxal.

Se utilizó enzima pura obtenida según se indica en el apartado 3.4.4.2, a una concentración de 0,7 mg/ml en tampón MES-NaOH, pH 5,2. El espectro se realizó según se indica en el apartado 2.7.1.2. A, Apoenzima. B, Apoenzima preincubada con 20 μ M de fosfato de piridoxal durante 15 min. a 25 $^{\circ}$ C. Su espectro fue amplificado 3 veces.

3.4.4.2. Purificación de la glutamato descarboxilasa libre de fosfato de piridoxal

Para estudiar la interacción de la apoenzima con su cofactor, se obtuvo una preparación de GAD pura, libre de fosfato de piridoxal. Para ello, se realizó una purificación convencional, apartado 3.3.3, pero sin preincubar la preparación con fosfato de piridoxal en ningún momento. Únicamente en el paso final de purificación, la filtración en gel en la columna de Superdex S-200, se consiguió una preparación de apoenzima libre de holoenzima. Este extremo se comprobó determinando la actividad GAD en presencia y ausencia de fosfato de piridoxal en la mezcla de ensayo. La separación de apoenzima y holoenzima se consiguió gracias a la distinta velocidad de elución de ambas formas de la GAD en la filtración en gel, como se observa en la Figura 15. La preparación final de apoenzima, aproximadamente 5 mg de proteína total, tenía una actividad específica de 61,0 U/mg proteína tras preincubar con fosfato de piridoxal.

3.4.4.3. Espectros de absorción

La interacción entre la glutamato descarboxilasa y el fosfato de piridoxal se ha estudiado, clásicamente, siguiendo los cambios producidos en los espectros de absorción por dicha

interacción, debidos a la formación de una base de Schiff entre el cofactor y una lisina de la enzima. En trabajos previos (O'Leary y Brummund, 1974; Strausbauch y Fischer, 1970) se ha demostrado que, en *E. coli*, esta unión es dependiente de pH, de forma que si éste es inferior a 6, la interacción es normal y la holoenzima es activa, mientras que a pH superior a 6, se produce una unión anormal, que produce la formación de un complejo inactivo (ver estructura en la Figura 18).

El hecho de que la actividad GAD desaparezca a pHs superiores a 6 (apartado 3.4.2.1) podría indicar que la interacción GAD-fosfato de piridoxal en *Synechocystis* tiene un comportamiento similar al de bacterias. Para comprobar este extremo, se realizaron diversos espectros de absorción utilizando preparaciones de GAD con y sin fosfato de piridoxal, purificadas como se indica en los apartados 3.3.3 y 3.4.4.2, respectivamente.

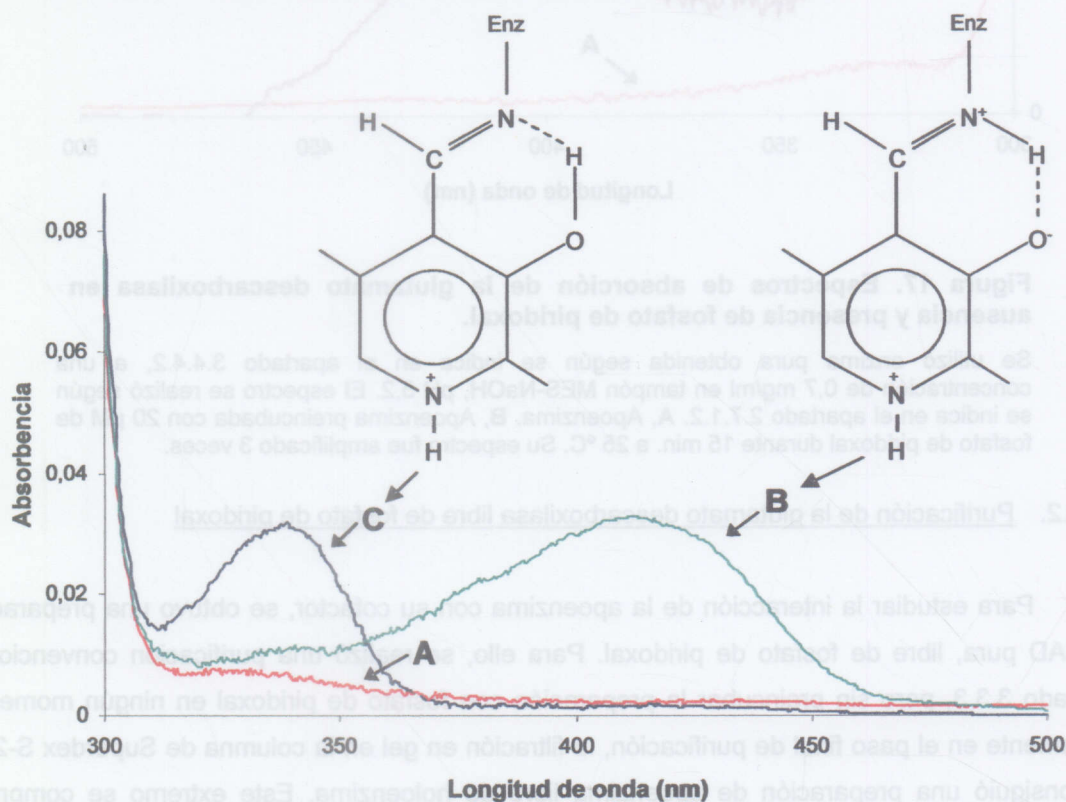


Figura 18. Espectros de absorción de la glutamato descarboxilasa con y sin cofactor, y estructuras químicas de la unión cofactor-enzima resultante.

El espectro se realizó según se indica en el apartado 2.7.1.2. empleando enzima pura a una concentración de 0,7 mg/ml. A, Apoenzima en tampón MES-NaOH a pH 5,2; B, Holoenzima en tampón MES-NaOH a pH 5,2; C, Holoenzima en tampón MES-NaOH a pH 6,1.

Como se observa en la Figura 18, la GAD exhibe un máximo de absorción a 410-420 nm en la holoenzima pura cuando ésta se encuentra en un tampón a su pH óptimo de actividad, 5,2 (espectro B), lo que indica la formación de la base de Schiff necesaria para que la enzima sea activa. En cambio, cuando la holoenzima está en un tampón cuyo pH es superior a 6, el máximo de absorción baja a 340 nm (espectro C), debido a que la interacción fosfato de piridoxal-enzima

genera una base de Schiff anormal que impide que se dé la reacción. Finalmente, el espectro de la apoenzima (A), demuestra que la absorción a 420 ó 340 nm se debe exclusivamente a su interacción con el fosfato de piridoxal, como ya se ha comentado en el apartado 3.4.4.1.

3.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN MUTANTE DE *Synechocystis* SP. PCC 6803 CARENTE DE ACTIVIDAD GLUTAMATO DESCARBOXILASA

Una herramienta útil para dilucidar la función fisiológica de la glutamato descarboxilasa en *Synechocystis* es la generación de un mutante carente de actividad y el estudio de sus posibles fenotipos.

3.5.1. Generación de un mutante del gen *gadA* de *Synechocystis* sp. 6803

La inactivación del gen *gadA* se realizó mediante inserción en el mismo del gen C.C1 (Elhai y Wolk, 1988) que confiere resistencia a cloramfenicol. Para ello, se construyó el plásmido pJM6 (Tabla 4), donde el gen C.C1 se insertó en sentido opuesto al *gadA* y con el que se transformó *Synechocystis*, seleccionándose los clones transformantes mediante la resistencia al cloramfenicol que confiere el gen C.C1.

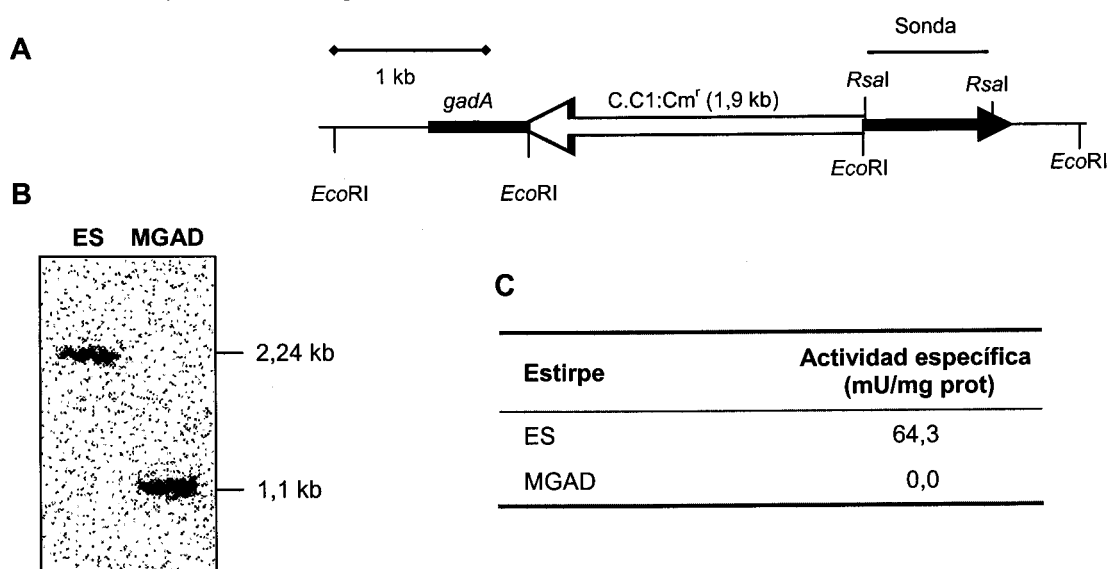


Figura 19. Análisis de la estructura genómica del mutante MGAD de *Synechocystis*.

A. Esquema de la región cromosómica del mutante MGAD. El gen *gadA* se representa con una flecha oscura, interrumpida en el sitio endonucleolítico *KpnI* por el gen C.C1, (flecha clara). El sentido de la flecha indica la dirección de expresión. El gen C.C1 introduce sendos sitios de restricción *EcoRI*.

B. Hibridación *Southern* de la estirpe silvestre (ES) y de MGAD. Se realizó según se indica en el apartado 2.4.8, utilizando la enzima de restricción *EcoRI*. Como sonda para la hibridación se utilizó el fragmento interno de *gadA*, *RsaI*-*RsaI* indicado en la figura.

C. Actividad glutamato descarboxilasa en las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis*.

Como *Synechocystis* es un organismo poliploide, con alrededor de 12 copias del cromosoma (Labarre *et al.*, 1989), se procedió a analizar, mediante hibridación *Southern*, si los clones transformantes tenían segregada la mutación, es decir, si todas las copias de su genoma contenían la mutación, lo que implicaría que, efectivamente, el gen no expresase una enzima funcional. En la Figura 19 se muestra tanto el esquema del gen con la mutación, como el resultado de la hibridación *Southern*, donde se observa que la estirpe mutante (MGAD) tiene completamente segregada la mutación. La ausencia de actividad GAD en la estirpe MGAD confirma que el gen *gadA* es el único responsable de la actividad GAD en *Synechocystis*.

3.5.2. Crecimiento de la estirpe MGAD de *Synechocystis* en diversos medios de cultivo

Si la ruta del GABA fuese funcional en *Synechocystis* y, por tanto, capaz de cerrar el ciclo de Krebs, uno de sus principales efectos sería que el ciclo estuviese implicado en el metabolismo energético de la célula como fuente de ATP y poder reductor. Como consecuencia, la ausencia de GAD y, con ello, la interrupción de la ruta del GABA podría conllevar problemas de crecimiento en condiciones no autotróficas. Por eso, un primer estudio realizado para ver si la GAD estaba implicada en el metabolismo energético del organismo se basó en el crecimiento de la estirpe carente de actividad GAD (MGAD) y de la estirpe silvestre en distintas fuentes de carbono, determinando las posibles diferencias existentes entre ambas.

Para ello, se cultivaron las estirpes en medio sólido con iluminación continua en condiciones mixotróficas (glucosa o succinato) y fotoheterotróficas (glucosa y DCMU). Tras 6 días de cultivo, se observó un crecimiento más rápido en glucosa (Tabla 12), siendo lo más destacable el crecimiento limitado del mutante MGAD cuando se cultivó con glucosa y DCMU, inhibidor de la fotosíntesis que bloquea la transferencia de electrones entre el complejo PSII y el conjunto de plastoquinonas.

Tabla 12. Viabilidad en diferentes medios de cultivo de distintas estirpes mutantes de *Synechocystis*.

Estirpe	Control	Glucosa	Glucosa DCMU	Succinato
ES	++	+++	++	++
MGAD	++	+++	+	++
SSDH+	++	+++	++	++
SSDH-	++	+++	++	++

De las distintas estirpes cultivadas en medio BG11 líquido se sembraron 50 μ l en cajas de medio sólido conteniendo BG11 con glucosa al 0,5%, sola o con 10 μ M de DCMU; ó succinato al 0,5%. Se cultivaron con iluminación a 30°C durante 6 días. El control corresponde a medio BG11 sin adiciones. Signo +++, crecimiento muy tupido; signo ++, crecimiento normal en césped; y signo +, crecimiento limitado.

Para confirmar el efecto del DCMU sobre la estirpe MGAD, se volvió a cultivar en medio sólido en condiciones fotoheterotróficas, pero sembrando gotas que contenían desde 10^5 hasta 10^3 células tanto de la estirpe silvestre como de la estirpe mutante, en cajas de medio BG11 suplementado con distintas concentraciones del inhibidor. Como se muestra en la Figura 20, además de corroborarse los datos de la tabla anterior, se observó que la diferencia de crecimiento era mayor a concentraciones mayores de DCMU.

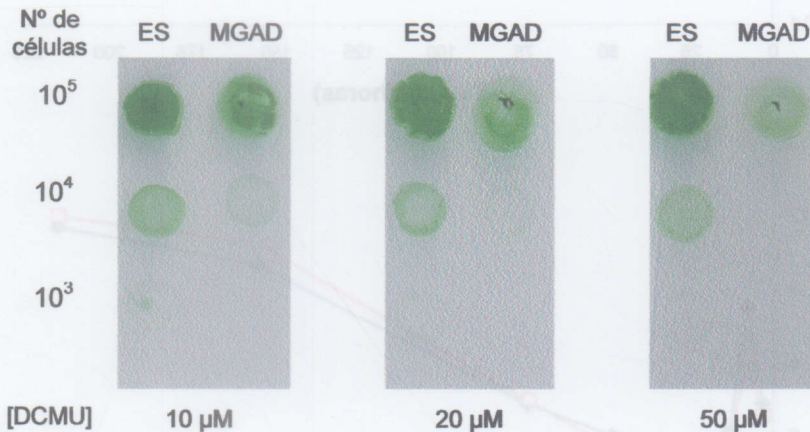


Figura 20. Crecimiento fotoheterotrófico de las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis* en presencia de DCMU a distintas concentraciones.

A partir de cultivos líquidos en medio BG11, se realizaron diluciones seriadas desde 10^7 hasta 10^5 células/ml y se aplicaron gotas de $10 \mu\text{l}$ de cada dilución en cajas de medio sólido: BG11 suplementado con glucosa al 0,5% y DCMU a la concentración indicada. Las cajas se incubaron con iluminación a 30°C durante 6 días.

3.5.3. Niveles de glucógeno de las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis* sp. 6803

Como se ha indicado en el apartado 3.1.2.2., el glucógeno constituye la principal reserva de carbono en cianobacterias y, como consecuencia, sus niveles están estrechamente relacionados con las necesidades energéticas de la célula. Por tanto, si la glutamato descarboxilasa estuviese implicada en el metabolismo del carbono, su ausencia podría provocar desajustes metabólicos que afectasen a los niveles de glucógeno, de forma similar a lo que ocurre con la glutamato deshidrogenasa (apartado 3.1.2.2).

La Figura 21 muestra la acumulación de glucógeno a lo largo del tiempo en cultivos de las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis*, tanto en valores absolutos como en relación a la clorofila del cultivo. Puede observarse que no existen diferencias entre ambas estirpes.

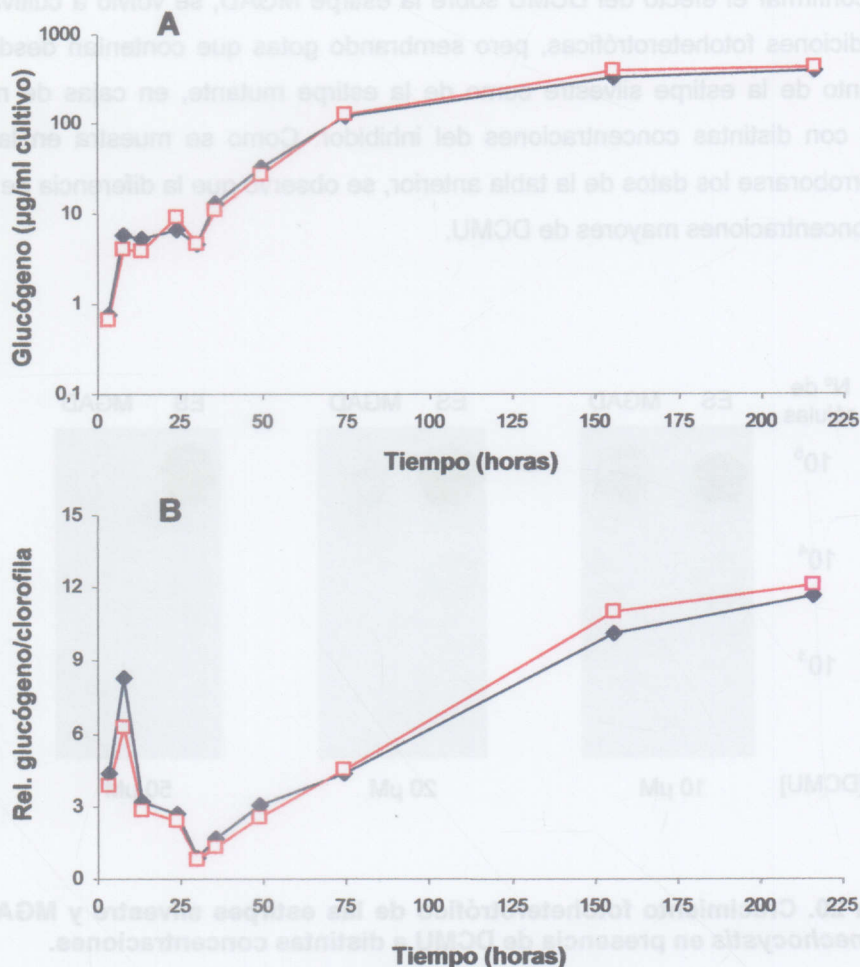


Figura 21. Acumulación de glucógeno en las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis*.

Ambas estirpes se cultivaron con gaseo al 1,5% de CO₂ en aire con nitrato como fuente de nitrógeno. A los tiempos indicados, se recogieron muestras para determinar clorofila y glucógeno. La acumulación de glucógeno se expresa tanto como valores totales en relación al cultivo (A), como normalizados a los valores de clorofila (B). Estirpe silvestre: rojo; MGAD: azul. Se realizaron 3 experimentos independientes mostrando una desviación estándar inferior al 5%.

3.5.4. Niveles intracelulares de aminoácidos en las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis* sp. 6803

La determinación de los niveles intracelulares de aminoácidos en la estirpe mutante MGAD y su comparación con los de la estirpe silvestre, puede ayudar a dilucidar la implicación de la GAD tanto en el metabolismo de los aminoácidos como en los posibles destinos metabólicos del GABA. Según se muestra en la Tabla 13, no se observan diferencias importantes entre ambas

estirpes, salvo en el nivel de serina, donde el silvestre duplica al mutante. Es de destacar que en ninguna de las dos estirpes se encontró GABA.

Tabla 13. Niveles intracelulares de aminoácidos en las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis*.

Estirpe	Asp	Glu	Ser	Gly	Gln	GABA	Arg
ES	12,3	110,6	20,6	32,6	9,2	0,0	4,2
MGAD	15,2	97,8	9,8	23,1	6,5	0,0	3,9

Se recogieron muestras de células cultivadas en medio BG11, conteniendo 0,5 mg de prot./ml, y se procesaron según se indica en el apartado 2.7.6.2. Los datos se expresan en nmol de aminoácido/mg prot.

La Figura 22 muestra el efecto de la adición de GABA al medio de cultivo sobre los niveles de aminoácidos. En ella, sólo se recogen los aminoácidos que han experimentado cambios tras la adición de GABA. Como se puede observar, el GABA es un compuesto que es capaz de entrar en la célula y acumularse de forma casi lineal en el interior. No obstante, solo la prolina muestra un aumento proporcional al del GABA de forma que su concentración se incrementa entre 6 y 10 veces con respecto a la inicial. También se observa una disminución de hasta un 30% en los niveles de glutamato. En ningún caso hubo diferencias importantes entre ambas estirpes.

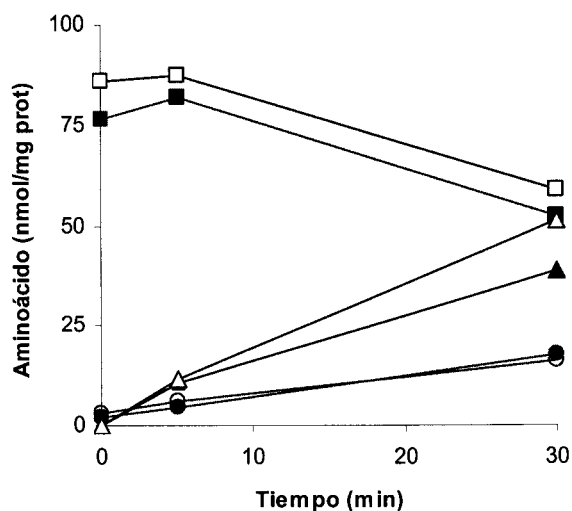


Figura 22. Niveles intracelulares de glutamato, GABA y prolina, tras la adición de GABA al medio de cultivo.

A tiempo cero se añadió GABA, a una concentración final 1 mM, a sendos cultivos de la estirpe silvestre (símbolos oscuros) y MGAD (símbolos claros), mantenidos con gaseo al 1,5% de CO₂ en aire con nitrato como fuente de nitrógeno. Los cultivos contenían 0,5 mg prot/ml. Las muestras se tomaron a 0, 5 y 30 min. tras la adición de GABA y se procesaron según se indica en el apartado 2.7.6.2.

Glutamato: cuadrados; GABA: triángulos; Prolina: círculos

3.5.5. Efecto del pH en cultivos de las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis* sp. 6803

Se ha descrito que la glutamato descarboxilasa juega un papel crucial en la resistencia a estrés ácido en *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* y *Listeria monocytogenes* (Cotter *et al.*, 2001; Small y Waterman, 1998). En *E. coli*, la GAD forma parte del sistema AR implicado en la resistencia por periodos limitados de tiempo a pHs inferiores a 3. Su función protectora es debida a su capacidad de consumir protones y, de esta forma, evitar una excesiva acidificación del citosol. Este sistema es muy importante en estas bacterias que viven en medios potencialmente ácidos como el sistema digestivo de mamíferos.

Poco se sabe de la tolerancia a estrés ácido en cianobacterias y, aunque su hábitat preferente suele tener un pH alcalino, se han encontrado cepas que pueden cultivarse hasta a pH 4 (Brock, 1973). Estas cianobacterias no son propiamente acidófilas, y aunque toleran ambientes ácidos, no crecen en estas condiciones (Steinberg *et al.*, 1998). El sistema de resistencia se desconoce, pero parece que ser que la célula consigue mantener el pH interior estable ante variaciones bruscas en el pH externo.

Tabla 14. Viabilidad de las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis* en medio sólido a diferentes pHs.

Estirpe	pH del medio				
	Control	8,2	6,9	5,6	5,3
ES	++	++	+	-	-
MGAD	++	++	+	-	-

Se sembraron gotas de 10 μ l de cultivos líquidos en medio BG11 a una densidad celular de 0,7 (DO₇₅₀), diluidos hasta unas 100 células/ μ l, sin extender. Una vez se secó la gota, se incubaron a 30 °C con iluminación durante 7 días. El medio de cultivo fue BG11, conteniendo los siguientes tampones: HEPES-NaOH, pHs 8,2 y 6,9; MES-NaOH, pH 5,6; y citrato, pH 5,3; todos a una concentración 0,1 M. El control correspondía a BG11 sin tampón añadido (pH final, 9,02). Signo ++, crecimiento normal; signo +, crecimiento limitado; y signo -, ausencia de crecimiento.

Para comprobar si la glutamato descarboxilasa podía estar implicada en algún tipo de tolerancia a estrés ácido se llevaron a cabo cultivos en medio sólido de las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis* a distintos pHs. Como se observa en la Tabla 14, el crecimiento fue normal a pH 8,2 y 6,9, aunque más limitado a éste último, con colonias de color más amarillento indicativas de algún tipo de estrés. Por debajo de 6 no se observó crecimiento. El hecho de que no haya diferencias entre ambas estirpes indica que la GAD no es vital para el crecimiento de células cultivadas a pHs bajos.

Según Huang *et al.*, 2002, *Synechocystis* sp. PCC 6308 es capaz de neutralizar en pocos minutos una acidificación del pH del medio extracelular. Para ver si este efecto también se produce en *Synechocystis* sp. PCC 6803, y si en él interviene la glutamato descarboxilasa, se realizó un estudio de variación del pH externo a lo largo del tiempo en cultivos tanto de la estirpe silvestre como de MGAD, tras someterlos a estrés ácido. En la Figura 23 se observa que, efectivamente, se produce un aumento progresivo del pH externo durante los primeros 15 min. posteriores a la acidificación. Sin embargo, la GAD no parece influir en este proceso, pues no se observan diferencias apreciables entre ambas estirpes.

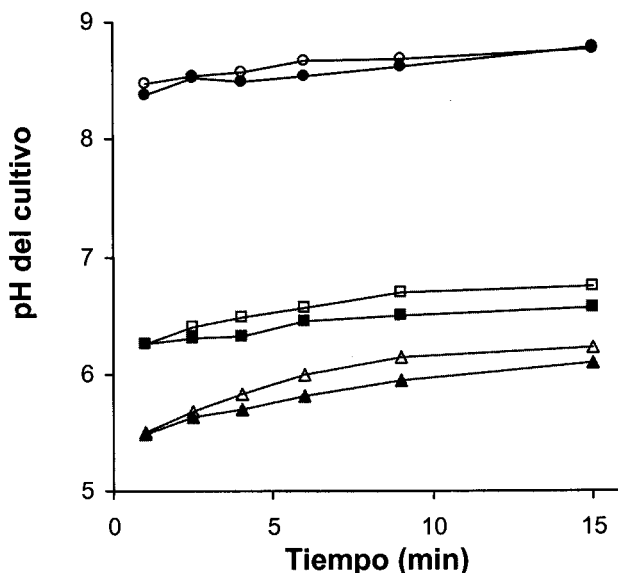


Figura 23. Variación del pH externo en cultivos de las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis*.

Las células de ambas estirpes fueron sometidas a estrés ácido según se indica en el apartado 2.7.8. Los pHs iniciales fueron: 5,5, (triángulos); 6,2, (cuadrados); y control sin acidificar con HCl (círculos). La densidad celular (DO_{750}) fue de 0,6. Estirpe silvestre: símbolos oscuros; MGAD: símbolos claros.

3.6. PRESENCIA DE LAS DEMÁS ENZIMAS DE LA RUTA DEL γ -AMINO BUTIRATO

Una vez confirmada la presencia en *Synechocystis* de una glutamato descarboxilasa que podría convertir en GABA el glutamato formado por la glutamato deshidrogenasa, nos dispusimos a verificar si *Synechocystis* contiene el resto de las enzimas necesarias para completar el ciclo del GABA y, de esta forma cerrar el ciclo de Krebs. Estas enzimas son:

- GABA transaminasa (GABA-T), que lleva a cabo a la transferencia del grupo amino del GABA a algún α -cetoácido (2-oxoglutarato y oxalacetato son los más comunes), generando succinato semialdehído y el aminoácido correspondiente al aceptor del grupo amino.

- Succinato semialdehido deshidrogenasa (SSDH) , que lleva a cabo la oxidación del grupo carbonilo, con la consiguiente obtención de NAD(P)H y succinato. La reacción puede ocurrir también en sentido reductor.

En primer lugar, realizamos un barrido del genoma de *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1996) para verificar la existencia de orfs homólogas a alguno de los genes de estas enzimas, detectándose una orf, la slr0370, con una alta similitud con genes codificantes de succinato semialdehido deshidrogenasas. Con respecto a la GABA transaminasa, se ha encontrado una orf, slr1022, con una buena homología, aunque en principio guarda una mayor relación con el gen *argD*, que codifica una N-acetilornitina aminotransferasa, implicada en el metabolismo de la arginina.

3.6.1. Actividad succinato semialdehido deshidrogenasa y GABA transaminasa en extractos crudos de *Synechocystis* sp. 6803

En un principio se realizaron ensayos de actividad de ambas enzimas en extractos crudos para confirmar su existencia.

3.6.1.1. Actividad succinato semialdehido deshidrogenasa

La actividad se estimó espectrofotométricamente a 340 nm siguiendo el incremento de absorción originado por la formación de NADPH dependiente de succinato semialdehido. Se utilizó como sustrato NADP porque el posible gen (slr0370) que codifica la SSDH tiene similitud con otras SSDH dependientes de NADP. Como se observa en la Tabla 15, existe actividad SSDH en extractos crudos de *Synechocystis*.

Tabla 15. Caracterización de la actividad succinato semialdehido deshidrogenasa en *Synechocystis*.

Sistema	Actividad específica (mU/mg proteína)
Completo	10,1
Sin succinato semialdehido	0,0
Sin extracto	0,0
Completo, con extracto hervido	0,0

Los ensayos se llevaron a cabo según se refiere en el apartado 2.3.4. Donde se indica, el extracto se hirvió durante 5 min. y, posteriormente, se enfrió en hielo.

3.6.1.2. Actividad γ -aminobutirato transaminasa

Debido la existencia de diversos tipos de GABA-T, con diferentes aceptores del grupo amino procedente del GABA, se ensayó dicha actividad utilizando distintos α -cetoácidos como sustrato. Además, se ensayó la actividad siguiendo dos protocolos diferentes. En ambos casos, como control positivo se utilizaron células de *Escherichia coli*, donde está descrita la presencia de la actividad GABA-T (Metzer y Halpern, 1990).

Protocolo A: Se basa en la determinación de los compuestos con grupo amino en el HPLC. En este caso, se detectaría la desaparición de GABA y, sobre todo la aparición del aceptor del grupo amino: aspartato, glutamato o alanina, a partir de oxalacetato, 2-oxoglutarato y piruvato, respectivamente.

Protocolo B: Según (Sterri y Fonnum, 1978), se basa en la separación entre aminoácidos y ácidos orgánicos mediante la unión de estos a sales de alto peso molecular (fosfato de tri-n-octil-amonio). Se requiere que uno de los sustratos sea radiactivo, para poder determinar si hay actividad y, en consecuencia, cuantificarla. El ensayo se realizó *in situ*, permeabilizando las células con Triton X-100. Tras centrifugar 35 ml de cultivo, el sedimento de células se resuspendió en tampón HEPES-NaOH a pH 8,6, 50 mM conteniendo Tritón X-100 al 0,2% (v/v). Se realizaron ensayos tanto con *E. coli* como con *Synechocystis* y tanto en células enteras como en células previamente hervidas como control de adsorción inespecífica. Finalmente, se evaluó la radiactividad de cada fracción.

Como se observa en la Tabla 16, no se encontró actividad GABA transaminasa en *Synechocystis* en las condiciones ensayadas.

Tabla 16. Actividad γ -aminobutirato transaminasa en *Escherichia coli* y *Synechocystis* con distintos aceptores del grupo amino.

Sustrato aceptor del grupo amino	Protocolo A		Protocolo B	
	Act. esp. <i>E. coli</i>	Act. esp. <i>Synecho.</i>	Act. esp. <i>E. coli</i>	Act. esp. <i>Synecho.</i>
2-Oxoglutarato	15,2	0,0	25,1	0,0
Piruvato	0,0	0,0	0,0	0,0
Oxalacetato	0,0	0,0	0,0	0,0

En los dos procolos la concentración de los sustratos fue 5 mM. El ensayo se realizó durante 30 min. a 30 °C. Los datos de actividad específica se expresan en mU/mg de prot.

Protocolo A. Se utilizaron extractos crudos. La determinación de aminoácidos se realizó según se indica en el apartado 2.3.5.1.

Protocolo B. Se realizó como se describe en el apartado 2.3.5.2.

También se ensayó la actividad GABA-T, con ambos protocolos, en presencia de fosfato de piridoxal (0,1 mM) y CaCl_2 (10 mM), descritos como cofactores de la GABA transaminasa, sin que en ningún caso se detectase actividad (datos no mostrados).

3.6.2. Clonación de la succinato semialdehido deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. 6803

Como se ha comentado anteriormente, existe una orf, la slr0370, en el genoma de *Synechocystis*, con una alta homología con la SSDH de otros organismos. El proceso de clonación de este gen, *gabD*, fue el mismo que el de *gadA*, indicado en el apartado 3.3.1. Esto es, el gen se clonó por PCR utilizando los oligonucleótidos *ssdh1* y *ssdh2* (Tabla 5) incluyendo los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI* para su posterior clonación en el vector de expresión pET-3a. Tras realizar la PCR, se obtuvo un fragmento del tamaño deseado, 1,39 kb.

Tras clonarse en el vector pGEM-T, se seleccionó un clon cuya secuencia se comprobó utilizando como cebadores los oligonucleótidos comerciales "Reverse primer" y "M13-20 primer", así como otros dos oligonucleótidos internos del gen, para secuenciar su región central. Se observó el cambio de una base que no implicaba cambio de aminoácido, por lo que se decidió trabajar con este clon, cuyo plásmido se denominó pSSD1. A continuación, se extrajo el gen *gabD* clonado en pSSD1 con las enzimas *NdeI* y *BamHI* y se introdujo en pET-3a, dando lugar al plásmido pSSD2. Finalmente, se sobreexpresó el gen en la estirpe de *E. coli* BL21, en medio mínimo M9 a 30 °C, observándose que había sobreexpresión de la proteína, pero que ésta se agregaba y precipitaba (Figura 24-A).

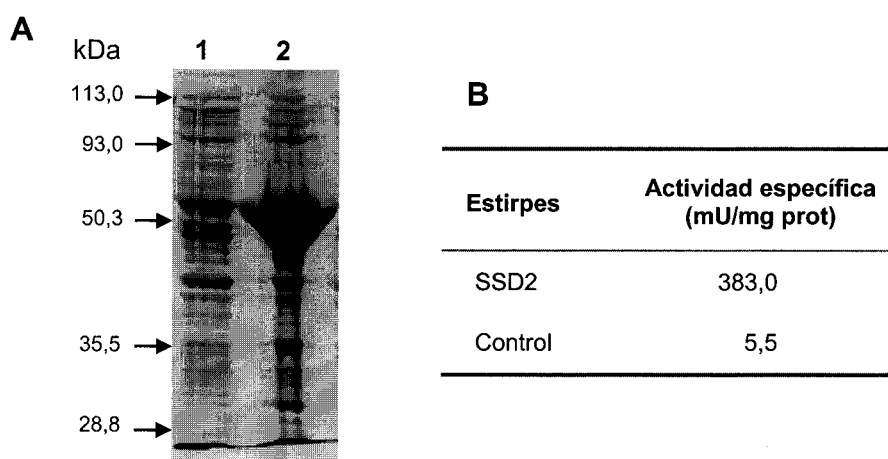


Figura 24. Sobreexpresión en *E. coli* de la succinato semialdehido deshidrogenasa de *Synechocystis*.

A. Electroforesis desnaturalizante de extractos crudos de la estirpe BL21 de *E. coli* sobreexpresando la SSDH de *Synechocystis* (SSD2). El extracto crudo se obtuvo según se indica en el apartado 2.2.1.1. Carril 1, sobrenadante del extracto crudo; carril 2, sedimento de restos celulares del extracto crudo.

B. Actividad SSDH en la estirpe SSD2 tras inducir la expresión de la SSDH durante 3 horas. Como control se utilizó la estirpe BL21, mostrando la actividad SSDH endógena.

No obstante, se midió la actividad SSDH en extractos crudos tanto en la estirpe BL21 que sobreexpresaba la SSDH (SSD2) como en la control. Como se observa en la Figura 24-B, aunque la mayor parte de la proteína se queda en el sedimento de restos celulares, hay suficiente cantidad en el sobrenadante como para que se aprecie el incremento de la actividad SSDH con respecto al control, que refleja la actividad SSDH propia de *E. coli*. Por tanto, podemos afirmar que la *orf* *slr0370* codifica una succinato semialdehído deshidrogenasa en *Synechocystis*.

3.6.3. Obtención y caracterización de un mutante de *Synechocystis* sp. 6803 carente de actividad succinato semialdehído deshidrogenasa

El gen *gabD* de *Synechocystis* se inactivó siguiendo el mismo procedimiento que con el gen *gadA*, esto es, mediante la inserción del gen C.C1, que confiere resistencia a cloramfenicol. La inserción del gen C.C1 se realizó en la única diana de restricción *EcoRV* del gen *gabD*, obteniéndose los plásmidos pSSD3+ y pSSD3-, en los que el gen C.C1 está en orientación positiva y negativa en relación la expresión del gen *gabD*, respectivamente (Figura 25-A).

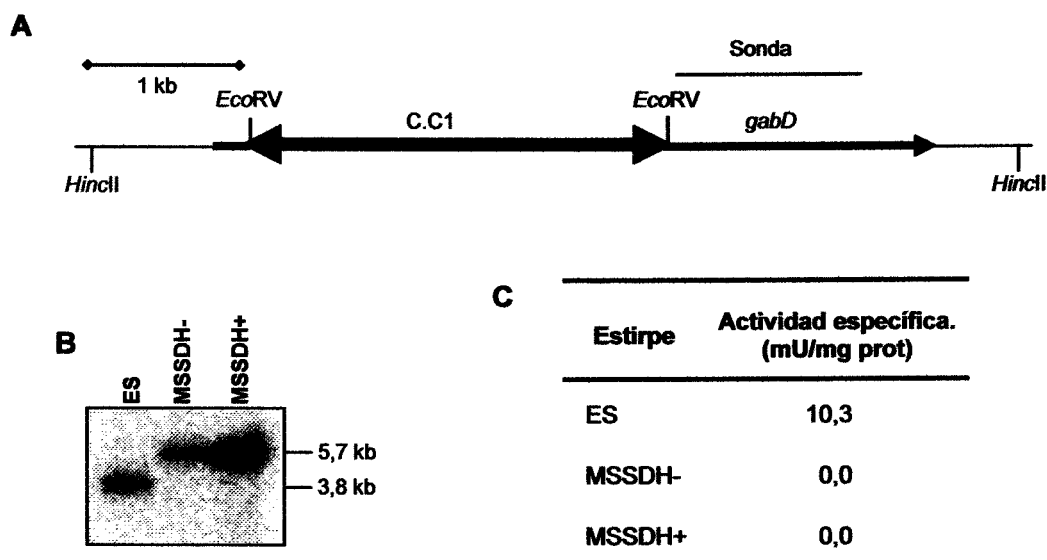


Figura 25. Análisis de la estructura genómica del mutante MSSDH.

A. Esquema de la región cromosómica del mutante MSSDH. El gen *gabD* (flecha negra), está interrumpido en el sitio endonucleolítico *EcoRV* por el gen C.C1 (flecha azul). El sentido de la flecha indica la dirección de expresión. El gen C.C1 se insertó en ambos sentidos, generando los mutantes MSSDH- y MSSDH+.

B. Hibridación *Southern* de las estirpes silvestre (ES) y mutantes (MSSDH+/-). Se realizó según se indica en el apartado 2.4.8, utilizando la enzima de restricción *HincII*. Como sonda para la hibridación se utilizó el fragmento interno de *gabD*, *StyI* - *BstEII*.

C. Actividad succinato semialdehído deshidrogenasa determinada en las estirpes silvestre (ES) y mutantes (MSSDH-/+).

A continuación, se transformó *Synechocystis* con dichos plásmidos y, tras seleccionarse un clon de cada uno de ellos, se comprobó mediante hibridación *Southern* la segregación completa de la mutación (Figura 25-B). A las estirpes mutantes se les denominó MSSDH+ y MSSDH-, respectivamente. Finalmente, se comprobó que las estirpes mutantes carecían de actividad SSDH (Figura 25-C), por lo que el gen *gabD* es el único responsable de la actividad SSDH en *Synechocystis*.

Una vez comprobado que la mutación segrega completamente y que, por tanto, el gen no es esencial para la célula, realizamos distintos estudios de viabilidad en diversas condiciones de crecimiento (Tabla 12) sin que se observase ninguna diferencia entre ambas estirpes mutantes y la silvestre.

3.7. CATABOLISMO DEL GLUTAMATO EN *Synechocystis* SP. PCC 6803

Para dilucidar la importancia cualitativa y cuantitativa de la glutamato descarboxilasa en el metabolismo del glutamato en *Synechocystis* se realizaron diversos estudios utilizando glutamato marcado radiactivamente tanto en todos sus carbonos como únicamente en el carbono 1.

3.7.1. Liberación de $^{14}\text{CO}_2$ *in vivo* a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato en *Synechocystis* sp. 6803

Este tipo de estudio *in vivo* de la glutamato descarboxilasa en *Synechocystis* se basa en la cuantificación del $^{14}\text{CO}_2$ que se libera de las células cuando éstas se incuban con $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato. Para ello, células cultivadas en BG11 de las estirpes silvestre y MGAD, carente de actividad glutamato descarboxilasa, se colocaron en vasijas de Warburg equipadas con una trampa de CO_2 , según se indica en el apartado 2.6.1., y se suplementaron con $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato. Tras 10 min. de incubación con iluminación a 30 °C, se adicionó ácido perclórico para detener la reacción, liberar el $^{14}\text{CO}_2$ que está presente en el medio en forma de HCO_3^- y facilitar de esta manera que sea captado por la trampa. Finalmente, el $^{14}\text{CO}_2$ se cuantificó en un contador de centelleo como se indica en el apartado 2.6.1.

Para estudiar la liberación de CO_2 debida a la descarboxilación del glutamato, estudiamos la distribución del $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato que entra en la célula, el cual puede ser descarboxilado por la GAD siendo el $^{14}\text{CO}_2$ liberado en la reacción captado en la trampa, o bien mantenerse en la célula al ser metabolizado por otras rutas. Para diferenciar el $^{14}\text{CO}_2$ liberado por la GAD y el liberado a través de otras rutas, los estudios se realizaron empleando las estirpes silvestre y MGAD. Para ello, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* donde células de ambas estirpes se suplementaron con $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato y, a continuación, se calculó la radiactividad presente tanto en las células como en forma de $^{14}\text{CO}_2$.

En la Tabla 17 se presentan los datos obtenidos; en principio hay que aclarar que estos datos son relativos en tanto que se desconoce la cantidad de $^{14}\text{CO}_2$ que puede ser fijado en las células por la Rubisco o la fosfoenolpiruvato carboxilasa, principales rutas de fijación de CO_2 . Puede observarse que la estirpe mutante tiene una tasa de transporte de glutamato inferior a la estirpe silvestre y que, sobre todo, el CO_2 liberado procedente de glutamato es 15 veces menor. Esto resultados demuestran que la mayor parte del $^{14}\text{CO}_2$ que se libera a partir $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato se produce mediante la acción de la glutamato descarboxilasa.

Tabla 17. Transporte de $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato y desprendimiento de $^{14}\text{CO}_2$ en las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis*.

A

Estirpe	Radiactividad añadida (dpm)	Radiactividad en las células (dpm) ^a	$^{14}\text{CO}_2$ liberado (dpm) ^a
ES	244.400	158.347 (64,8%)	38.981 (15,9%)
MGAD	227.680	66.483 (29,2%)	2.626 (1,2%)

^a Entre paréntesis se muestra el porcentaje sobre la radiactividad añadida.

B

Estirpe	Glutamato transportado (nmol/mg clf)	Glutamato descarboxilado (nmol/mg clf)
ES	79,6	15,7
MGAD	27,9	0,2

Células cultivadas en medio BG11 conteniendo $10 \mu\text{g}$ clf/ml se sometieron a ensayos de transporte y desprendimiento de CO_2 según se indica en el apartado 2.6.1. Se utilizaron 2 ml de cultivo, a una concentración final de $1 \mu\text{M}$ de $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato. Se tomaron $25 \mu\text{l}$ para medir la radiactividad añadida; $0,2 \text{ ml}$ para medir la radiactividad en las células; y el resto para medir el $^{14}\text{CO}_2$ desprendido por las células. Se realizaron los mismos ensayos con células hervidas y en todos los casos los valores de radiactividad fueron inapreciables.

A. Radiactividad total presente en cada fracción.

B. Actividades de transporte y descarboxilación de glutamato.

3.7.2. Destino metabólico del $[U-^{14}\text{C}]$ -glutamato

Otra manera de investigar el metabolismo de un compuesto es determinar los metabolitos marcados radiactivamente que se forman cuando se añade a las células dicho compuesto radiactivo. Siguiendo esta estrategia, para comprobar si se formaba GABA a partir de glutamato,

se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en los que a células de las estirpes silvestres y MGAD de *Synechocystis* se añadía glutamato marcado radiactivamente en todos sus carbonos ([U-¹⁴C]-glutamato). Al mismo tiempo, se determinaron los valores de transporte de glutamato y de desprendimiento de ¹⁴CO₂, con objeto de compararlos con los resultados obtenidos con [1-¹⁴C]-glutamato. Se utilizó el mismo protocolo que en el apartado anterior, pero tomando una muestra para determinar los metabolitos marcados mediante TLC. La radiactividad dentro de la célula y la localizada en forma de ¹⁴CO₂ se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Transporte de [U-¹⁴C]-glutamato y desprendimiento de ¹⁴CO₂ en las estirpes silvestre y MGAD de *Synechocystis*.

A

Estirpe	Radiactividad añadida (dpm)	Radiactividad en las células (dpm) ^a	¹⁴ CO ₂ liberado (dpm) ^a
ES	1.819.609	1.348.645 (74,1%)	36.385 (2,0%)
MGAD	1.900.258	665.090 (35,0%)	1.801 (0,1%)

^a Entre paréntesis se muestra el porcentaje sobre la radiactividad añadida.

B

Estirpe	Glutamato transportado (nmol/mg clf)	Glutamato descarboxilado (nmol/mg clf) ^b
ES	76,1	10,0
MGAD	35,1	0,5

^b Se considera que por cada molécula de ¹⁴CO₂ liberado, se forma una molécula de [U-¹⁴C] GABA con 4 átomos de ¹⁴C.

Células cultivadas en BG11 conteniendo 10 µg clf/ml se sometieron a ensayos de transporte y desprendimiento de CO₂ según se indica en el apartado 2.6.1. Se utilizaron 2 ml de cultivo, a una concentración final de 1 µM de [U-¹⁴C]-glutamato. Se tomaron 0.5 ml de cultivo para medir desprendimiento de ¹⁴CO₂ total; 50 µl para medir radiactividad total en células; y el resto se utilizó para determinar metabolitos radiactivos, según se indica en el apartado 2.6.3.

A. Radiactividad total presente en cada fracción.

B. Actividades de transporte y descarboxilación de glutamato.

Para interpretar los datos, se tomó como base que todo el ¹⁴CO₂ que se genera procede de la GAD, según se deduce de los resultados de la Tabla 17, de forma que por cada molécula de ¹⁴CO₂ que se libera, se forma una molécula de [U-¹⁴C]-GABA, cuya señal radiactiva, al tener

cuatro carbonos, es 4 veces superior a la de $^{14}\text{CO}_2$. Se observó que no hay grandes diferencias entre $[1-^{14}\text{C}]$ y $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -glutamato y que en ambos casos una parte importante del glutamato se metaboliza vía glutamato descarboxilasa.

Sin embargo, como se observa en la Figura 26, donde se muestran los resultados de la separación de los distintos metabolitos radiactivos por TLC, no aparece GABA marcado radiactivamente en ninguna de las dos estirpes. Respecto a los demás metabolitos, se observan altos niveles de glutamina, sintetizada por la glutamina sintetasa, y cantidades inferiores de arginina y prolina, aminoácidos que también están asociados al metabolismo del glutamato. Finalmente, se observa una señal (X) que tan solo se presenta en la estirpe silvestre y cuya movilidad no coincide con ningún aminoácido estudiado. Desde un punto de vista cuantitativo, no se observan diferencias significativas entre ambas estirpes, excepto en el compuesto X antes comentado (datos no mostrados), lo que, aparentemente, no concuerda con los datos de liberación de CO_2 a partir de glutamato (apartado 3.7.1).

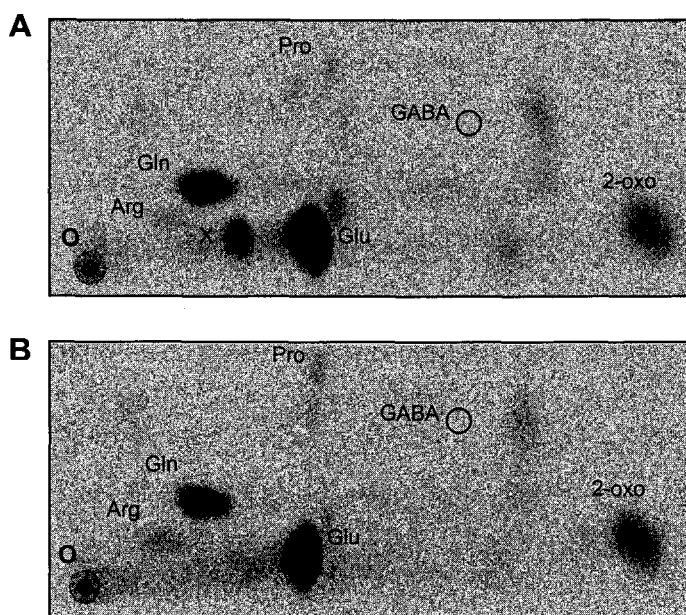


Figura 26. Metabolitos marcados con ^{14}C generados a partir de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -glutamato en las estirpes silvestre (A) y mutante, MGAD (B), de *Synechocystis*.

Las muestras se obtuvieron del experimento de la Tabla 18. Los metabolitos identificados fueron: Glu, glutamato; Gln, glutamina; 2-oxo, 2-oxoglutarato; Pro, prolina; y Arg, arginina. O, origen de la cromatografía; X, compuesto desconocido. La posición del GABA se determinó mediante co-cromatografía con el compuesto no radiactivo y posterior revelado con ninhidrina y se indica mediante un círculo.

3.8. ESTUDIO DE LA SECUENCIA DEL GEN *gadA* DE *Synechocystis* sp. 6803

Las glutamato descarboxilasas forman parte del Grupo II de las descarboxilasas, que engloba también a las histidina, arginina y ornitina descarboxilasas (Sandmeier *et al.*, 1993). Constituyen un grupo muy estudiado desde un punto de vista estructural y con el que se han realizado diversos análisis de secuencias, estableciéndose los distintos motivos de homología y los residuos de importancia catalítica y estructural. La secuenciación de multitud de organismos, sobre todo procariotas, ha permitido realizar estudios de homología entre las posibles GAD presentes en dichos organismos (Areshev *et al.*, 2000).

En la Figura 27 se presenta el árbol evolutivo de los posibles genes *gad* presentes en los organismos cuyo genoma ha sido secuenciado. De él se deduce la existencia de tres grupos de GADs bien diferenciados: arqueobacterias, eubacterias-plantas-hongos y animales, estando la GAD de *Synechocystis* encuadrada en el segundo grupo.

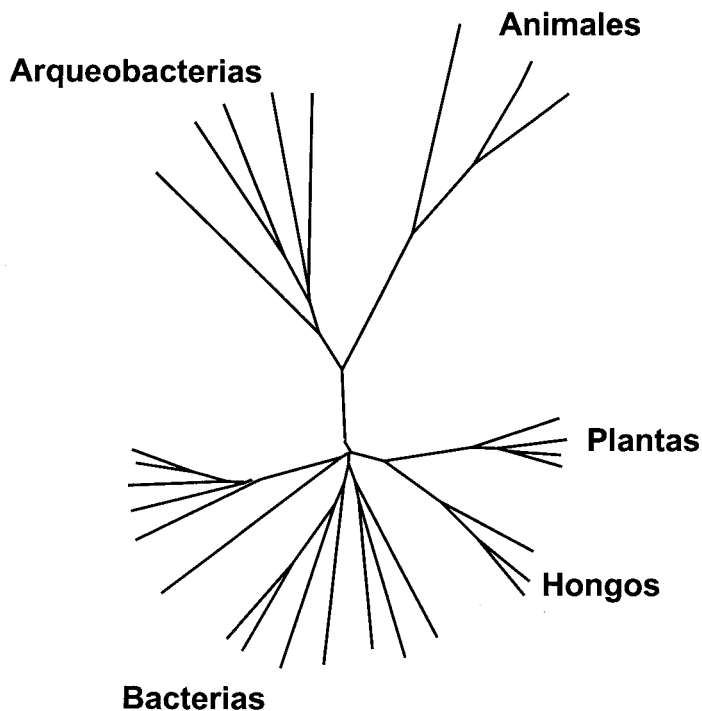


Figura 27. Árbol no enraizado de las glutamato descarboxilasas de todos los *phyla*.

El árbol se realizó empleando el método de Neighbor joining, descrito en el apartado 2.7.9.

En la Figura 28 se presenta el resultado del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la glutamato descarboxilasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con cuatro secuencias de GADs de otros tantos organismos del grupo eubacterias-plantas, donde se observa claramente la alta homología existente entre ellas. De dicha comparación, se deduce que la GAD de *Synechocystis*

	C	
<i>Synechocystis</i>	GSHF SH -----	467
<i>Streptomyces</i>	ATGF HH -----	475
<i>Lactococcus</i>	TYGF TH -----	466
<i>Arabidopsis</i>	VNGV KKTPEETQREVTAYWKKLLET TKTKNTIC	493
<i>Escherichia</i>	--S FKHT -----	466

Figura 28. Alineamiento de distintas secuencias de glutamato descarboxilasas

Se comparan las secuencias de los siguientes organismos: *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Streptomyces coelicolor*, *Lactococcus lactis*, *Arabidopsis thaliana* y *Escherichia coli*. El alineamiento múltiple se llevó a cabo como se indica en el apartado 2.7.9. Cuando todas las secuencias presentan el mismo residuo en una posición aparece debajo un asterisco (“*”); dos puntos (“:”), cuando la similitud de los residuos en una matriz “Gonnet Pam250” es mayor de 0,5; y un punto (“.”), si el valor en dicha matriz es inferior a 0,5. Los residuos señalados en **negrita** corresponden a sitios conservados debido a su importancia catalítica, regulatoria o estructural. En *cursiva* se muestran los residuos conservados exclusivamente en plantas.

Los cuatro genes utilizados para realizar la comparación de secuencias con la de la glutamato descarboxilasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Figura 28), representan otras tantas ramas del grupo eubacterias-plantas-hongos. Una rama la forman las plantas, que constituyen con los hongos un grupo independiente a las eubacterias, a pesar de mantener con ellas una alta homología, y presentan en la región C (carboxilo terminal) el sitio de unión a calmodulina, implicada en regulación (Yap *et al.*, 2003). Las otras tres ramas están incluidas dentro de las eubacterias, y corresponderían a las bacterias Gram positivas (*Lactobacillus plantarum*, *Clostridium perfringens*), las proteobacterias (*E. coli* y *Brucella*) y las actinobacterias (géneros *Mycobacterium* y *Streptomyces*).

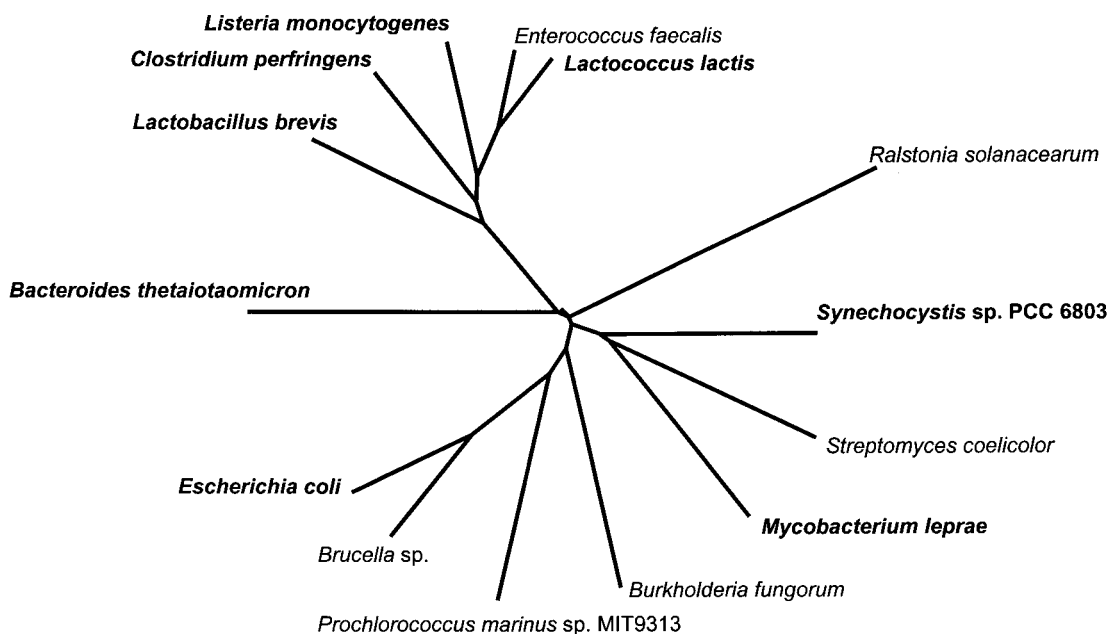


Figura 29. Árbol no enraizado de las glutamato descarboxilasas de eubacterias.

En negrita se indican las especies donde se ha comprobado que la actividad enzimática de la proteína codificada corresponde a una glutamato descarboxilasa.

La Figura 29 muestra un árbol ampliado de la rama correspondiente a las eubacterias en la Figura 27, en donde puede apreciarse que la GAD de *Synechocystis* tiene una mayor homología con el grupo de las actinobacterias. No obstante, no se puede afirmar que este agrupamiento con las actinobacterias sea general a todas las cianobacterias, ya que la posible GAD de *Prochlorococcus marinus* sp. MIT 9313 tiene una mayor similitud con las GADs de proteobacterias.

4. DISCUSIÓN

El conocimiento del metabolismo energético de las cianobacterias se circunscribe casi exclusivamente al sistema fotosintético, a pesar de existir especies capaces de crecer heterotróficamente. En estas condiciones, la principal vía de obtención de energía parece ser a través del ciclo de las pentosas, debido sobre todo a la ausencia de un ciclo de Krebs funcional (Figura 30). No obstante, poco se sabe de la presencia de vías alternativas que pudiesen completar dicho ciclo y de la función de las demás enzimas del mismo en estos organismos.

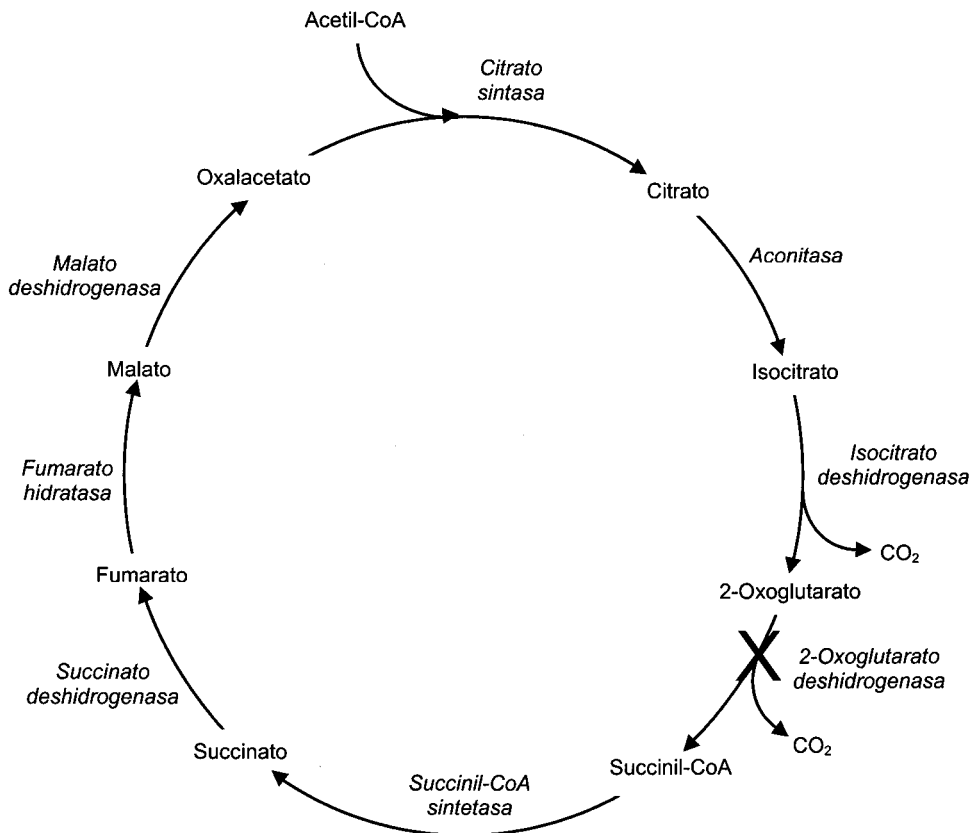


Figura 30. Ciclo de Krebs.

La **X** indica el paso que se supone ausente en cianobacterias, lo que alteraría la dirección de la rama que conduce a succinato.

La presencia en algunas cianobacterias de glutamato deshidrogenasa permitiría la conexión entre el producto final de la rama oxidativa del ciclo de Krebs, 2-oxoglutarato, y una posible ruta del γ -aminobutirato que convertiría el glutamato en succinato, soslayando la ausencia de 2-oxoglutarato deshidrogenasa y cerrando el ciclo. La utilización de la glutamato deshidrogenasa en la conversión de 2-oxoglutarato a glutamato tiene la ventaja sobre el ciclo GS-GOGAT de ser más directa y económica, en términos de poder asimilatorio, y de no alterar los niveles de glutamina.

Para estudiar las posibles interacciones existentes entre el ciclo de Krebs y el metabolismo del glutamato se ha escogido como estirpe modelo *Synechocystis* sp. PCC 6803, por ser una cianobacteria fotoheterotrófica con una glutamato deshidrogenasa muy bien estudiada y cuyo genoma está secuenciado en su totalidad.

4.1. EL CICLO DE KREBS EN *Synechocystis* SP. PCC 6803

La principal razón de que el ciclo de Krebs en cianobacterias no sea funcional -en sentido clásico- estriba en la ausencia de actividad 2-oxoglutarato deshidrogenasa, según se desprende de estudios realizados en diversas especies. Como consecuencia, se ha replanteado la función fisiológica del resto de las enzimas del ciclo presentes en cianobacterias. La ausencia de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa provoca que el ciclo se divida en dos ramas aparentemente inconexas. La rama oxidativa, que terminaría en 2-oxoglutarato, tendría como función principal la de aportar el esqueleto carbonado necesario para la asimilación del nitrógeno, vía GS/GOGAT, como demuestra el hecho de que la isocitrato deshidrogenasa esté controlada por NtcA, regulador general del metabolismo del nitrógeno. En cambio, la otra rama, que iría desde oxalacetato hasta succinato tendría una función menos clara, posiblemente de interconversión de ácidos dicarboxílicos. Es importante señalar que prácticamente no existen estudios detallados de ninguna de las enzimas del ciclo de Krebs de cianobacterias, con excepción de la isocitrato deshidrogenasa, mejor estudiada por su relación con el metabolismo del nitrógeno (Muro-Pastor *et al.*, 1996).

La secuenciación del genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) y, con posterioridad, del de diversas cianobacterias y multitud de otros organismos, ha originado un nuevo enfoque a la hora de estudiar las rutas metabólicas. Mediante comparación de secuencias se han identificado las posibles enzimas presentes en el genoma de *Synechocystis* ortólogas con las de otros organismos y, de esa manera, se han trazado las diversas rutas metabólicas que potencialmente existirían en esta cianobacteria, incluyendo las posibles rutas relacionadas con el ciclo de Krebs que pudiesen existir. En la Tabla 19 se detalla la presencia o ausencia de las diversas enzimas del ciclo determinadas por comparación de secuencias con los genes de *Escherichia coli*.

Como era de espera, el dato más relevante es la ausencia de un complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa funcional, debido a la falta de la enzima e1, encargada de la descarboxilación del 2-oxoglutarato. De las otras dos enzimas que forman parte del complejo, la e2, que corresponde a una transsuccinilasa, suele ser muy similar a la del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), de ahí que la orf sll1841, que codifica dicho componente de la piruvato deshidrogenasa (PDHe2), tenga una alta homología con la enzima e2 de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa de *E. coli*, por lo que su presencia no implica que correspondiese, realmente, al complejo de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa. La subunidad e3, dihidrolipoamida deshidrogenasa, podría ser compartida por

ambos complejos, habiendo sido estudiada en *Synechocystis* como parte del complejo PDH (Engels y Pistorius, 1997). Finalmente, y como complemento a los estudios de secuencias, hemos comprobado la ausencia de la actividad enzimática 2-oxoglutarato deshidrogenasa en extractos crudos de *Synechocystis* ensayada en diversas condiciones (datos no mostrados).

Tabla 19. Presencia de las enzimas del ciclo de Krebs en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Enzima	Número E.C.	<i>E. coli</i> (Swiss-Prot)	<i>Synechocystis</i> (Orf)	Identidad (%)	Similitud (%)
Citrato sintasa	4.1.3.7	CISY_ECOLI	slI0401	38,12	51,18
		CISZ_ECOLI	slI0401	35,17	45,14
Aconitasa	4.2.1.3	ACO2_ECOLI	slr0665	66,08	73,71
Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	IDH_ECOLI	slr1289	57,93	66,35
2-Oxoglutarato deshidrogenasa	1.2.4.2 2.3.1.61 1.8.1.4	ODO1_ECOLI	ausente	-	-
		ODO2_ECOLI	slI1841 (PDHe2)	28,36	37,56
		DLDH_ECOLI	slr1096 (<i>lpdA</i>)	33,33	45,10
Succinil-CoA sintetasa	6.2.1.5	SUCC_ECOLI	slI1023 (cadena β)	31,11	54,31
		SUCD_ECOLI	slI1557 (cadena α)	31,01	45,49
Succinato deshidrogenasa	1.3.99.1	DHSA_ECOLI	slr1233	44,99	54,31
		DHSB_ECOLI	slI0823	36,48	44,12
		DHSC_ECOLI	ausente	-	-
		DHSD_ECOLI	ssr3409	27,37	37,90
Fumarato reductasa	1.3.1.6	FRDA_ECOLI	slr1233	41,20	51,16
		FRDB_ECOLI	slI1625	33,61	44,12
		FRDC_ECOLI	ausente	-	-
		FRDD_ECOLI	ausente	-	-
Fumarato hidratasa	4.2.1.2	FUMA_ECOLI	ausente	-	-
		FUMB_ECOLI	ausente	-	-
		FUMC_ECOLI	slr0018	60,22	69,46
Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	MDH_ECOLI	SlI0891	31,13	39,07

Los porcentajes de identidad y similitud se calcularon mediante el programa GAP del Wisconsin Package. Las secuencias aminoacídicas de los genes de *E. coli* se obtuvieron de la base de datos Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/sprot/sprot-top.html>). Solo se muestran los genes de *Synechocystis* cuya similitud a los de *E. coli* sea superior al 37,5%.

Como puede observarse, todas las demás enzimas del ciclo de Krebs están potencialmente presentes en el genoma. Destaca la presencia de la succinil-CoA sintetasa, cuyo estudio en cianobacterias apenas ha sido abordado y de la que solo está descrita la ausencia de su actividad enzimática en *Anabaena variabilis* (Pearce *et al.*, 1969).

Los casos de la succinato deshidrogenasa y de la fumarato reductasa son más complejos, ya que ambas enzimas catalizan la interconversión de succinato y fumarato, si bien cada una tiene preferencia por uno de los sentidos de la reacción, la succinato deshidrogenasa en la formación de fumarato y viceversa la fumarato reductasa. Se cree que ambas enzimas proceden de un ancestro común (Cronan y LaPorte, 1996), lo que hace que sean extraordinariamente similares en cuanto a secuencia y estructura, complicando su asignación a una u otra función por homología de secuencias. Ambas enzimas están compuestas por dos subunidades catalíticas (*sdh/frd A* y *sdh/frd B*) que quedan ancladas a la membrana mediante otras dos proteínas hidrofóbicas (*sdh/frd C* y *sdh/frd D*). *Synechocystis* contiene una sola orf con homología a la subunidad A de ambas enzimas, lo que podría indicar o bien que ambas proteínas comparten la misma subunidad o bien que solo es funcional una de ellas. En *Synechocystis* no aparece ninguna orf similar a las de las subunidades C y D de *E. coli*, aunque debido a su función de anclaje, podrían ser sustituidas por otras proteínas de secuencia no homóloga.

Se han realizado estudios de estas dos enzimas empleando mutantes de los genes *slI1625* y *slI0823* (Cooley *et al.*, 2000), cuyo resultado más llamativo consiste en que, tras añadir al medio de cultivo 2-oxoglutarato, el doble mutante acumula succinato, lo que indica la presencia de alguna ruta alternativa a la 2-oxoglutarato deshidrogenasa para transformar 2-oxoglutarato en succinato.

Del resto de rutas que podrían completar el ciclo de Krebs soslayando la ausencia de 2-oxoglutarato deshidrogenasa, se analizaron dos: el ciclo del glioxilato y la ruta del GABA. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Presencia de las enzimas del ciclo del glioxilato y de la ruta del γ -aminobutirato en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

CICLO DEL GLIOXILATO					
Enzima	Número E.C.	<i>E. coli</i> (Swiss-Prot)	<i>Synechocystis</i> (Orf)	Identidad (%)	Similitud (%)
Isocitrato liasa	4.1.3.1	ACEA_ECOLI	ausente	-	-
Malato sintasa	4.1.3.2	MASY_ECOLI	ausente	-	-

RUTA DEL GABA					
Enzima	Número E.C.	<i>E. coli</i> (Swiss-Prot)	<i>Synechocystis</i> (Orf)	Identidad (%)	Similitud (%)
Glutamato descarboxilasa	4.1.1.15	DCEB_ECOLI	sll1641	49,89	60,35
γ -aminobutirato aminotransferasa	2.6.1.19	GOAG_ECOLI GABT_ECOLI	slr1022 (<i>argD</i>)	34,75	43,50
Succinato semialdehido deshidrogenasa	1.2.1.16	GABD_ECOLI	slr0370	35,90	44,93

Los porcentajes de identidad y similitud se calcularon mediante el programa GAP del Wisconsin Package. Las secuencias aminoacídicas de los genes de *E. coli* se obtuvieron de la base de datos Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/sprot/sprot-top.html>). Sólo se muestran los genes de *Synechocystis* cuya similitud a los de *E. coli* es superior al 37,5%.

De los resultados anteriormente expuestos, se deriva la ausencia de las enzimas del ciclo de glioxilato en *Synechocystis* y la presencia de genes homólogos a todas las enzimas que configuran la ruta del GABA.

Según estos datos, la ruta del GABA podría cerrar el ciclo de Krebs, aunque para ello sería necesario que el 2-oxoglutarato pasase a glutamato, vía glutamato deshidrogenasa o ciclo GS-GOGAT, como se ha discutido con anterioridad. Finalmente, existe otra forma de soslayar la ausencia de 2-oxoglutarato deshidrogenasa: descarboxilando directamente el 2-oxoglutarato hasta succinato semialdehido, que sería convertido en succinato mediante la SSDH. Esta reacción está catalizada por la 2-oxoglutarato descarboxilasa, enzima escasamente estudiada (*Bradyrhizobium japonicum*, Green *et al.*, 2000) y que, debido al escaso número de genes secuenciados de la misma, es frecuentemente confundida con otra enzima implicada en la biosíntesis de menaquinona, MenD, cuya reacción también incluye la descarboxilación del 2-oxoglutarato. El gen que codifica esta última enzima tiene una alta homología con el de la 2-oxoglutarato descarboxilasa. En el genoma de *Synechocystis* existe un gen *menD* que se pensó que podría codificar una 2-oxoglutarato descarboxilasa, pero que posteriormente ha sido identificado como el gen estructural de la proteína MenD, que participa en el metabolismo de la menaquinona (Wade Johnson *et al.*, 2003).

Por todo lo anteriormente expuesto, los estudios de vías alternativas de cierre del ciclo de Krebs se han centrado en identificar y caracterizar las enzimas que componen la ruta del GABA y en investigar a fondo la función que desempeña la glutamato deshidrogenasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

4.2. FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA EN *Synechocystis* SP. PCC 6803

Como consecuencia de la multitud de estudios que se han realizado sobre el metabolismo del nitrógeno en cianobacterias, ha quedado firmemente establecido que la asimilación de amonio tiene lugar, preferentemente, a través del ciclo GS-GOGAT. No obstante, la existencia en algunas especies de cianobacterias de NAD(P) glutamato deshidrogenasas, capaces de realizar una función similar en la asimilación de amonio, ha llevado a cuestionar el papel que juega esta última enzima en el metabolismo del nitrógeno. En cualquier caso, el hecho de que no puedan obtenerse en *Synechocystis* mutantes totalmente carentes de actividad GS o GOGAT al tiempo que se ha conseguido un mutante nulo de GDH (Chávez *et al.*, 1995) excluye la posibilidad de que la GDH tenga un papel primordial en el metabolismo del nitrógeno.

Se han llevado a cabo con anterioridad estudios de las dos GDHs existentes en *Synechocystis*, (Chávez, 1992, Chávez *et al.*, 1995 y Chávez *et al.*, 1999), de las cuales la dependiente de NADP, ha sido examinada en mayor profundidad. Esta NADP-GDH, la más importante en cuanto a actividad, tiene unas características cinéticas (Km. baja para el amonio y alta para el glutamato), que indican una clara preferencia por la actividad aminante y, por tanto, una función asimilatoria. El gen que codifica esta enzima, *gdhA*, ha sido clonado y se han obtenido diversos mutantes (Chávez *et al.*, 1995). Se ha empleado uno de ellos, el mutante SCh11, carente de actividad NADP-GDH, para intentar dilucidar la función fisiológica de la NADP-GDH. Se ha observado que este mutante crece de forma similar a la estirpe silvestre salvo en fase estacionaria, donde SCh11 tiene un crecimiento más limitado, hecho que se acentúa en presencia de amonio como fuente de nitrógeno. Es también en fase estacionaria donde se alcanzan los valores máximos de actividad específica de la GDH, al tiempo que disminuyen los de GS (Chávez *et al.*, 1999).

En este trabajo hemos continuado buscando, mediante una caracterización detallada de la estirpe carente de actividad NADP-GDH, las condiciones en las que la NADP-GDH pueda representar una ventaja selectiva.

Los resultados de los estudios de expresión del gen *gdhA* realizados a lo largo del crecimiento de un cultivo, refuerzan la hipótesis de que la NADP-GDH tenga una mayor importancia en la fase estacionaria, pues como se observa en la Figura 3 (p. 64) hay un aumento de expresión en dicha fase, si bien el mayor nivel de expresión se da en los primeros estadios de crecimiento. Por todo ello, los estudios realizados en el mutante carente de actividad se centraron tanto en la fase temprana de crecimiento como en la fase estacionaria.

Si la NADP-GDH llevase a cabo una función de asimilación de amonio, su falta podría provocar carencia de nitrógeno. Para comprobar esta posibilidad se determinó el estado nutricional de nitrógeno en el mutante nulo SCh11, siguiendo diversos parámetros indicativos de la

abundancia de este elemento: niveles de ficocianinas, contenido en glucógeno y relación C/N de las células.

Las ficocianinas, además de formar parte de los pigmentos antena, pueden actuar como reserva de nitrógeno que se moviliza en condiciones de déficit de este elemento. Por tanto, el hecho de que sus niveles sean significativamente inferiores en SCh11, con respecto a la estirpe silvestre, en la fase inicial de crecimiento, indica que las células muestran una deficiencia en nitrógeno y que, por tanto, se ve obligada a utilizar las ficocianinas (Figura 4, p. 65). En la fase estacionaria de crecimiento, SCh11 no presenta diferencias tan marcadas con respecto a la estirpe silvestre y sus niveles de ficocianinas son próximos a los normales. Esto puede deberse a que durante la fase inicial de crecimiento, la cantidad de luz que llega a las células es muy elevada y no se requieren pigmentos auxiliares, por lo que las células pueden degradar ficocianinas cuando exista deficiencia de nitrógeno, como ocurre en el caso de SCh11 que carece de NADP-GDH. En cambio, en fase estacionaria, la cantidad de luz que llega a las células es mucho menor y éstas requieren los pigmentos antena para captar la luz, por lo que las ficocianinas se vuelven necesarias para el organismo, y no se degradan tanto aunque exista carencia de nitrógeno. Por esta razón no existen diferencias de crecimiento entre SCh11 y la estirpe silvestre en las fases iniciales del cultivo, ya que la carencia de nitrógeno debida a la ausencia de NADP-GDH en SCh11 se suple con una menor aportación de nitrógeno a las ficocianinas. Sin embargo, cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria, las ficocianinas son imprescindibles y, como consecuencia, se limita el crecimiento.

Otro de los indicadores de que el organismo tiene estrés de nitrógeno es el glucógeno, principal reserva de carbono en cianobacterias, cuyos sus niveles fluctúan según las necesidades energéticas y la demanda biosintética de esqueletos carbonados. En condiciones de carencia de nitrógeno, la biosíntesis disminuye y el glucógeno se acumula.

El mutante SCh11 presenta unos niveles de glucógeno superiores a la estirpe silvestre, tanto en la fase temprana de crecimiento, como en la fase estacionaria (Tabla 6 p. 66), provocando un desequilibrio en la relación C/N en los cultivos con nitrato, (Tabla 7, p. 67). No obstante, está descrito que los niveles intracelulares de aminoácidos en estas estirpes no muestran diferencias significativas (Chávez, 1992), quizás como consecuencia de la movilización de las ficocianinas.

La variación de la NADP-GDH a lo largo del crecimiento de un cultivo, reflejada tanto en su actividad enzimática como en la expresión del gen *gdhA*, implica la existencia de fenómenos de regulación por fase de crecimiento, aunque ninguno de los dos promotores desde los que se puede expresar *gdhA* presenta cajas conocidas de unión a reguladores (Chávez *et al.*, 1995). Para determinar si la luz podría estar implicada en dicha regulación, se cultivó *Synechocystis* a baja intensidad luminosa, simulando la cantidad de luz que llega a las células de un cultivo en fase estacionaria. En estas condiciones el gen *gdhA* no se induce, es más, prácticamente se anula su expresión (Figura 6, p. 69), quizás como consecuencia de una bajada generalizada del

metabolismo. Esto implica que la luz, *per se*, no controla la expresión de *gdhA* y que intervienen otros factores relacionados con la fase de crecimiento.

Por tanto, aunque haya evidencias claras de que la asimilación de amonio se hace preferentemente a través del ciclo GS-GOGAT, pues tanto GS como GOGAT son esenciales para el organismo, la NADP-GDH tiene una función asimiladora y su ausencia produce desajustes metabólicos que pueden llegar a provocar una menor tasa de crecimiento en fase estacionaria. Por otra parte, a pesar de haberse demostrado la importancia de la glutamato deshidrogenasa en *Synechocystis* sp. 6803, cabe preguntarse el porqué de la existencia de la NADP-GDH cuando ya existe una ruta, aparentemente insustituible, que realiza su misma función. Esta cuestión ya ha sido planteada en otros organismos, como *Escherichia coli*, que también presentan ambas rutas, siendo la principal la GS-GOGAT, llegándose, en ese caso, a la conclusión de que en condiciones de limitación de energía y exceso de amonio, la GDH representa una alternativa eficiente al tener la ruta GS-GOGAT un mayor costo energético. En el caso de *Synechocystis* sp. 6803 puede suceder algo similar, ya que en fase estacionaria la célula tiene una menor capacidad energética, lo que favorecería la utilización de rutas energéticamente más baratas y, por otro lado, en los primeros estadios de crecimiento el organismo puede necesitar un mayor aporte de nitrógeno para mantener su tasa de crecimiento, para lo que, de nuevo, necesitaría rutas complementarias además de la principal. En definitiva, la presencia de la NADP-GDH representa una ventaja evolutiva importante como complemento del ciclo GS-GOGAT, punto de confluencia de los metabolismos de carbono y nitrógeno.

4.3. PRESENCIA Y FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL γ -AMINO BUTIRATO EN *Synechocystis* SP. PCC 6803

Como se ha comentado previamente, la ruta del GABA es una de las vías que podrían completar el ciclo de Krebs en cianobacterias, al soslayar la reacción catalizada por la 2-oxoglutarato deshidrogenasa. Por ello, una vez comprobada la presencia en *Synechocystis* de orfs con una alta homología a genes que codifican cada una de las enzimas de la ruta del GABA en otros organismos, nos dispusimos a averiguar si realmente esos genes codificaban dichas enzimas y si sus actividades enzimáticas estaban presentes en la célula. Igualmente, mediante la obtención y utilización de mutantes, estudiamos la función fisiológica de las mismas.

4.3.1. Presencia y caracterización de las enzimas de la ruta del γ -aminobutirato en *Synechocystis* sp. 6803

Dado que la glutamato descarboxilasa es la enzima mejor estudiada de las que forman la ruta del GABA, nuestros primeros estudios se centraron en ella. Como ya se ha expuesto con

anterioridad, a través de análisis de secuencias homólogas a la *gadA* de *E. coli*, se identificó una orf, la sll1641, que podría codificar una GAD.

Para asegurarnos de que la actividad GAD estaba presente en los extractos de *Synechocystis*, pusimos a punto un método de determinación de su actividad enzimática basado en la cuantificación de glutamato y GABA por HPLC con detección fluorimétrica. Esta forma de determinar la actividad GAD supone una gran ventaja por su sensibilidad y su capacidad de resolución de los metabolitos presentes en el ensayo, al tiempo que se consigue una mayor rapidez que con otros métodos. De hecho, este procedimiento ya había sido utilizado en varias ocasiones, empleando diversos agentes derivatizantes (Rossetti y Lombard, 1996; Allen y Griffiths, 1984). Nuestro método, derivatizando con OPA, permite conseguir una buena resolución en la separación de glutamato y GABA en los primeros 10 min. y, como se ha confirmado posteriormente, sirve para determinar la actividad GAD tanto en extractos crudos como empleando proteínas purificadas (Figura 9, p. 73). De hecho, una vez comprobado que el ensayo es útil en extractos crudos de *E. coli*, se confirmó la presencia de la actividad GAD en extractos de *Synechocystis* (Tabla 8, p. 73). Finalmente, una caracterización somera de la actividad GAD en extractos de *Synechocystis* nos permitió optimizar las condiciones de ensayo a emplear en estudios posteriores.

Una vez confirmada la presencia de la actividad glutamato descarboxilasa en *Synechocystis* nos dispusimos a clonar el gen *gadA*, orf sll1641, con el objetivo de purificar la GAD sobreexpresándola en *E. coli*. Para ello, aprovechando el conocimiento de su secuencia, la clonación se llevó a cabo mediante PCR (apartado 3.3.1., p. 74). Para la sobreexpresión en *E. coli* se utilizó el vector de expresión pET-3a. De esta forma, se consiguió una expresión óptima de la enzima lo que ha permitido purificarla a homogeneidad electroforética (Figura 11, p. 76) en tres pasos sencillos: precipitación con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y cromatografía de filtración en gel (Tabla 9, p. 76). Para ello, se ha utilizado un sistema de FPLC con el que se ha conseguido una mayor rapidez en el proceso, así como obtener la proteína pura en cantidad suficiente para poder caracterizarla adecuadamente.

La caracterización físico-química de la enzima pura indica que se trata de una glutamato descarboxilasa típica de bacterias, sobre todo con relación a dos características específicas de las GADs bacterianas: la enzima nativa es hexamérica con unos 300 kDa de masa molecular (Figura 12, p. 77) y tiene una estricta dependencia del pH, pues su actividad se pierde a pH superior a 6 (Figura 13, p. 78). Su K_m para el glutamato se encuentra en torno a 2,3 mM, dentro de los valores normales (Figura 14, p. 79). Con respecto al fosfato del piridoxal como cofactor de la GAD, los estudios han demostrado claramente que es necesario, no sólo para la actividad enzimática (Tabla 11, p. 82), sino también para mantener la estructura nativa de la proteína. Como se observa en la Figura 15 (p. 82), la apoenzima muestra una movilidad tanto electroforética como cromatográfica distinta a la holoenzima. Por tanto, el cofactor es esencial para mantener la estructura hexamérica activa de la holoenzima. No se ha determinado si realmente la apoenzima tiene una estructura

dimérica, como parece indicar la cromatografía de filtración en gel (Figura 15, p. 82), o si su comportamiento es debido a un cambio en su conformación espacial que provoca que migre a través de la columna de filtración de manera distinta a como lo haría una proteína globular compacta. Este proceso de desnaturalización es reversible, pues la estructura nativa se recupera tras la incubación de la apoenzima con el PLP (Figura 15, p. 82). La necesidad del fosfato de piridoxal para mantener la estructura nativa también se ha observado en la GAD de humanos, aunque en este caso se ha demostrado mediante estudios de dicroísmo circular, donde se detectan cambios de estructura secundaria (Chen *et al.*, 1998). Los factores implicados en la estabilidad de la holoenzima pueden ser varios, siendo el más importante de ellos la base de Schiff que se forma entre el PLP y la apoenzima, que a su vez se favorece por la implicación de más residuos que interaccionan con el cofactor. Entre estos, parece estar una His conservada, la H279 en *Synechocystis*, inmediata a la Lys 280 por donde se une al PLP, y que, si bien no participa activamente en la catálisis, en *E. coli* contribuye significativamente a la unión al cofactor a través de la formación de un puente de hidrógeno (Tramonti *et al.*, 1998).

Otra característica interesante es el efecto del pH en la interacción fosfato de piridoxal-enzima, causante de que la actividad disminuya bruscamente a pHs superiores a 6. Dicha interacción se establece con el residuo de Lys 280, el cual se une covalentemente al fosfato del piridoxal mediante una base de Schiff, al tiempo que está implicado en la catálisis orientando correctamente el $\alpha\text{-COO}^-$ del glutamato. Como se observa en los espectros de absorción de la apoenzima con el PLP a distintos pHs (Figura 18, p. 85), el efecto del pH en la GAD de *Synechocystis* muestra un patrón similar al de las GADs bacterianas, donde a pHs inferiores a 6 el máximo de absorción se encuentra a 420 nm, lo que implica una interacción correcta entre el residuo de Lys y el cofactor y que coincide con la zona de pH óptimo de la enzima. En cambio, a pHs superiores a 6, el patrón de absorción cambia, mostrando un máximo a 340 nm, lo que conlleva una inactivación de la enzima, provocada, muy probablemente, por la protonación de la aldimina interna, lo que impide que se produzca la reacción. Se ha sugerido también, que el cambio de absorbencia debido al pH es debido, no tanto a la aldimina interna, como a una transición de la conformación en la proteína inducida por el cambio de pH.

Para averiguar si los genes identificados como codificantes de las otras dos enzimas de la ruta del GABA expresaban las enzimas esperadas, se realizaron ensayos de actividad de ambas enzimas en extractos crudos de *Synechocystis*. De éstas, la GABA transaminasa es la que ha sido menos estudiada y, como consecuencia, no existe un ensayo estándar definido para dicha actividad. Por tanto, se utilizaron dos protocolos distintos de medida de la actividad GABA-T; por un lado se cuantificaron los aminoácidos que participan en la reacción mediante HPLC y, por otro, se determinó la actividad mediante radiactividad, separando los sustratos de los productos tras la reacción, utilizando un protocolo previamente descrito (Sterri y Fonnum, 1978). En cualquier caso, el hecho de que en *E. coli*, la actividad se observe, como estaba descrito, independientemente del protocolo seguido, confirmó que los ensayos eran adecuados (Tabla 16, p. 94). En cambio, en

extractos de *Synechocystis*, no se observó actividad GABA-T en ningún caso, ni siquiera utilizando diversos oxoácidos como aceptores del grupo amino procedente del GABA (Tabla 16, p. 95). Estos datos hacen improbable que la GABA-T esté presente en *Synechocystis*, a menos que ésta tenga unas características cinéticas o un aceptor del grupo amino muy diferentes a los hasta ahora definidos. Estos resultados excluyen la posibilidad que el gen *argD*, que presenta una alta homología a otras GABA transaminasas convencionales, pueda codificar una GABA-T, sobre todo cuando está descrito que un mutante de *argD* en *Synechocystis* presenta un fenotipo que revela una función dentro del metabolismo de la arginina y, por tanto es probable que la ArgD se encargue específicamente de la transaminación del grupo amino de la N-acetilamina (Quintero *et al.*, 2000).

La presencia de actividad succinato semialdehido deshidrogenasa dependiente de NADP se detectó en extractos crudos de *Synechocystis* empleando un ensayo espectrofotométrico donde la actividad se determinó siguiendo el cambio a 340 nm de la absorbencia de los piridín nucleótidos. El proceso de clonación del gen *gabD* (orf slr0370) y su posterior sobreexpresión en *E. coli*, fueron idénticos a los utilizados para la *gadA*, confirmándose que dicho gen codifica una NADP-SSDH. El hecho de que la enzima sobreexpresada en *E. coli* tienda a agregarse y precipitar (Figura 24, p. 96) ha imposibilitado su purificación a homogeneidad y posterior caracterización. Por tanto, habría que utilizar otros sistemas de expresión o bien intentar purificarla directamente en *Synechocystis*, para conseguir la cantidad de enzima suficiente para poder caracterizarla, lo que sería muy útil a la hora de estudiar sus posibles funciones y relacionarla con las SSDHs de otros organismos.

4.4. PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS ENZIMAS DE LA RUTA DEL γ -AMINO BUTIRATO EN EL METABOLISMO DE *Synechocystis* SP. PCC 6803

Una vez concluido que la ruta del GABA no parece existir como tal en *Synechocystis* debido a la ausencia de la GABA transaminasa, se plantea el problema de determinar la función fisiológica de las otras dos enzimas que sí están presentes. En relación con este punto, la obtención y posterior estudio de mutantes carentes de actividad GAD o SSDH podría dar información valiosa respecto a las funciones de ambos genes dentro del metabolismo de *Synechocystis*.

Aprovechando la clonación de los genes *gadA* y *gabD* y la facilidad con la que *Synechocystis* es capaz de ser transformado, se han conseguido sendos mutantes carentes de actividad GAD y SSDH (Figura 19, p. 87 y Figura 25, p. 97, respectivamente). La falta de actividad de los mutantes confirma que ambos genes son los únicos responsables de las mismas, al tiempo que indica que su función no es esencial dado que los mutantes son perfectamente viables. Para

descubrir algún fenotipo que ayudase a vislumbrar la función de cada una de estas enzimas se realizaron diversos estudios en cada mutante.

Los estudios referentes a la glutamato descarboxilasa se centraron en dilucidar si la GAD tiene una función similar a la de otras GADs bacterianas ya estudiadas, principalmente la implicada en la respuesta AR, dentro del sistema de resistencia a estrés ácido. Este sistema está presente en muchos microorganismos, sobre todo en aquellos que forman parte de la flora microbiana del sistema digestivo de animales, incluyendo especies especialmente virulentas.

Si bien, ni el hábitat ni las condiciones óptimas de crecimiento de *Synechocystis* tienen por qué requerir un sistema específico de resistencia a estrés ácido, se ha observado que otras cianobacterias sí pueden vivir en medios ácidos. Los estudios realizados en condiciones de estrés ácido parecen indicar que, efectivamente, *Synechocystis* es capaz de tamponar parcialmente el medio externo como respuesta a una bajada en el pH, aunque sea incapaz de crecer a pHs inferiores a 6,5 (Figura 23, p. 92). No obstante, el hecho de no haber diferencias importantes entre las estirpes silvestre y MGAD, carente de actividad GAD, indica que la GAD no está implicada en el proceso de tamponamiento del medio externo, donde según Huang *et al.*, 2002 sí participa la fotosíntesis, ya que el aumento de pH que se produce, por defecto, en un cultivo a lo largo de varios días, se acelera hasta producirse en pocos minutos cuando el pH externo baja hasta 5-6.

Los estudios de crecimiento de la estirpe MGAD en distintas condiciones relacionadas con el metabolismo energético han dado como resultado más significativo que la estirpe MGAD tiene un crecimiento muy limitado en condiciones fotoheterotróficas (Tabla 14, p. 91). En estas condiciones la glucosa es la principal fuente de poder reductor, pues al inhibir el DCMU la fotosíntesis no cíclica, se limita la producción de poder reductor, aunque no la de ATP, producido por fotofosforilación cíclica. Por tanto, la GAD podría estar implicada en la obtención de poder reductor a partir de glucosa. Aun así, estas condiciones no corresponden a un ambiente natural, por lo que habría que estudiar las condiciones equivalentes en el medio ambiente a un crecimiento fotoheterotrófico.

En cuanto a determinar la importancia de la GAD en el metabolismo del glutamato, se han obtenidos datos aparentemente contradictorios. Por un lado, se ha demostrado por medidas de actividad, que la GAD está presente en la célula (Tabla 8, p. 73) y que, además, los niveles de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido por la GAD a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato, indican que una gran parte del glutamato que entra en la célula es metabolizado vía glutamato descarboxilasa (Tabla 17, p. 99). Sin embargo, cuando se han estudiado los metabolitos radiactivos generados a partir de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -glutamato, no se ha observado señal alguna de GABA radiactivo ni en la estirpe silvestre ni en la MGAD (Figura 26, p. 101). Es significativa la ausencia de GABA como compuesto libre en la célula (Tabla 13, p. 90), ni siquiera cuando se añade glutamato no marcado en exceso, lo que hace pensar que el GABA producido vía GAD es rápidamente metabolizado. Al analizar por TLC los metabolitos radiactivos producidos a partir de $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -glutamato se observó una mancha presente

en la estirpe silvestre que no aparecía en el mutante carente de actividad GAD (Figura 26, p. 101) si bien la naturaleza de este compuesto no ha sido determinada.

Queda por definir, por tanto, la función fisiológica de la glutamato descarboxilasa, para lo que sería muy útil la utilización de [U-¹⁴C]-GABA en experimentos diferenciales entre el metabolismo de las estirpes silvestre y mutante, MGAD.

Finalmente, la secuenciación de los genomas de organismos pertenecientes a todas los grupos taxonómicos ha permitido construir árboles evolutivos que nos dan información del origen y desarrollo de los genes, así como deducir las estructuras conservadas relacionadas con la función de las proteínas. De la comparación de las secuencias de las GADs y de los árboles evolutivos contruidos a partir de ellas, se concluye que la glutamato descarboxilasa de *Synechocystis* se engloba dentro de las GADs bacterianas, como ya se había establecido por la caracterización de la enzima. Estas GADs se agrupan, a su vez, con las de plantas y hongos, bien diferenciadas de las de animales y arqueobacterias. El grupo de GADs de bacterias y plantas es extraordinariamente homogéneo a lo largo de toda su secuencia (Figura 28, p. 102), sobre todo en la región de unión al fosfato de piridoxal. Por otro lado, según se observa en los árboles obtenidos de la comparación de las secuencias (Figura 29, p. 103), las GADs de bacterias se dividen en subgrupos muy relacionados con su origen evolutivo, siendo de destacar que la mayor parte de las GADs han sido confirmadas como tales mediante ensayos de actividad, lo que hace más fiables los resultados. La GAD de *Synechocystis* tiene una mayor similitud a la de actinobacterias (Gram positivas), lo que coincide con las últimas teorías evolutivas según las cuales las cianobacterias se encontrarían a medio camino entre las bacterias Gram positivas (más primitivas) y las proteobacterias (Gram negativas), más evolucionadas. No obstante, la ausencia de genes homólogos a *gadA* en las demás cianobacterias cuyo genoma ha sido secuenciado hace replantearse si la GAD de *Synechocystis* ha evolucionado desde las actinobacterias y se ha mantenido sólo en *Synechocystis* sp. 6803, o bien le ha llegado por transferencia horizontal. El caso de la GAD de *Prochlorococcus marinus* sp. MIT9313, encontrada por análisis *in silico*, habría que estudiarlo más a fondo, para confirmar que el gen codifica realmente una enzima con actividad glutamato descarboxilasa, ya que su secuencia difiere bastante de la de *Synechocystis*, lo que implicaría orígenes distintos.

Otra incógnita a resolver es cómo se metaboliza el GABA producido por la GAD en un organismo que, en principio, parece carecer de GABA-T. Según estudios previos, el GABA puede ser producido por distintas enzimas, tales como glutamato descarboxilasa, aminobutiraldehído deshidrogenasa, 4-acetamidobutirato desacetilasa y 4-guanidino butirasa. De todas ellas la glutamato descarboxilasa es la principal y más estudiada, y es la que parece ser responsable de la producción de GABA en *Synechocystis*, dada la aparente ausencia de las otras enzimas en su genoma. Sin embargo, en todos los organismos estudiados hasta la fecha, el GABA solo es catabolizado vía GABA-T/SSDH, aunque estos estudios se han realizado en organismos que tienen GABA-T descrita, y nada se sabe en aquellos organismos con una GAD detectada bien por

medio de actividad (como *Lactococcus lactis* o *Bacteroides thetaiotaomicron*) bien por la presencia de un gen homólogo a una *gadA* y que, potencialmente, carece de GABA transaminasa. Por tanto, es muy posible que el GABA pueda ser metabolizado a través de otras rutas, cuyo estudio no se ha realizado hasta el momento. En *Synechocystis* hemos intentado abordar esta cuestión, pero los resultados no han aportado respuestas claras. Como se ha comentado, a pesar de la presencia de una GAD, demostrada bien *in vitro* como actividad, bien *in vivo* por la obtención de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -glutamato, no se encuentra GABA en la célula, por lo que, para seguir su metabolismo se ha recurrido a su adición al medio extracelular y a estudiar su acumulación en el interior. Según se observa en la Figura 22 (p. 90), el GABA se acumula en la célula de manera lineal, pero sin que se observen cambios drásticos en la acumulación de otros metabolitos, ni en el interior ni en el exterior, de forma lo suficientemente significativa como para presuponer alguna salida metabólica del GABA. Solo destaca el aumento de los niveles de prolina y una bajada en los niveles de glutamato. La interpretación de estos datos es complicada, a pesar de que tanto glutamato como prolina formen parte de la misma ruta metabólica, si bien podría implicar algún tipo de transaminación diferente a la catalizada por la GABA transaminasa.

La succínico semialdehído deshidrogenasa, como se ha comentado en la introducción, es una enzima que a pesar de estar estrechamente relacionada con la ruta del GABA, tiene otras funciones fisiológicas adicionales en diversos organismos. De hecho, destaca que se encuentra presente, aunque sea sólo como posible gen homólogo a otras SSDH ya secuenciadas, en un gran número de microorganismos, pese a la ausencia de GABA-T o de GAD en sus genomas. Este puede que sea el caso de *Synechocystis* donde la SSDH está codificada por el gen *gabD*, responsable único de dicha actividad, como demuestra el hecho de que las estirpes que tienen inactivado dicho gen (MSSDH+/-), carezcan de actividad NADP-SSDH (Figura 25, p. 97). De nuevo, se trata de un gen que no es necesario para la viabilidad de la célula y el hecho de que la estirpe MSSDH carezca de un fenotipo detectable cuando las células son cultivadas en distintas condiciones de crecimiento dificulta un estudio más profundo de su función. La carencia de algún fenotipo observable puede ser debida bien a que no se hayan encontrado las condiciones donde la SSDH adquiera mayor relevancia en el metabolismo celular, o bien a la existencia de alguna ruta alternativa que, en ausencia de SSDH, pudiera sustituirla desde un punto de vista funcional.

5. CONCLUSIONES

1. La NADP-glutamato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 tiene una función preferencial en la asimilación de nitrógeno en las fases inicial y tardía de crecimiento de los cultivos, ya que un mutante carente de actividad NADP-GDH muestra deficiencia de nitrógeno en tales condiciones.
2. La disminución de la intensidad de luz no es, *per se*, el factor que provoca el aumento de expresión del gen *gdhA* en la fase tardía de crecimiento.
3. El gen *gadA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 codifica una enzima con actividad glutamato descarboxilasa. Su secuencia de aminoácidos es similar a la del resto de glutamato descarboxilasas de bacterias y plantas, en especial a la de bacterias Gram positivas, y diferente de la de animales y arqueobacterias. No obstante, la ausencia de genes homólogos a GADs en otras cianobacterias indica que la GAD de *Synechocystis* es una excepción dentro de este grupo.
4. La glutamato descarboxilasa de *Synechocystis*, purificada tras su sobreexpresión en *Escherichia coli*, tiene una configuración nativa hexamérica y unos parámetros cinéticos que coinciden con los de las GADs bacterianas. La enzima contiene fosfato de piridoxal como cofactor, cuya presencia es necesaria no solo desde el punto de vista catalítico, sino también para mantener su conformación nativa. Se precisa un pH inferior a 6 para que la interacción cofactor-glutamato descarboxilasa sea la adecuada para que tenga lugar la reacción.
5. La viabilidad de un mutante de *Synechocystis* carente de actividad glutamato descarboxilasa, indica que la enzima no es esencial. El rasgo fenotípico más importante del mutante es la limitación de su crecimiento en condiciones fotoheterotróficas.
6. En *Synechocystis* sp. PCC 6803 existe una enzima con actividad succinato semialdehído deshidrogenasa, codificada por el gen *gabD*. Esta enzima no es esencial para la célula en las condiciones de cultivo utilizadas, ya que el mutante carente de actividad SSDH es viable y su fenotipo no difiere del de la estirpe silvestre.
7. La ausencia de actividad γ -aminobutirato transaminasa en extractos crudos de *Synechocystis* sp. PCC 6803, así como la adscripción del gen *argD*, único homólogo a las GABA transaminasas, a otra ruta metabólica reduce la posibilidad de la existencia de una ruta del GABA funcional en esta cianobacteria.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, I. C. y Griffiths, R.** (1984). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for determination of brain glutamate decarboxylase suitable for use in kinetic studies. *J. Chromatogr.* 336: 385-391.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Anderson, S. L. y McIntosh, L.** (1991). Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.* 173: 2761-2767.
- Arazi, T., Baum, G., Snedden, W. A., Shelp, B. J. y Fromm, H.** (1995). Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase. *Plant Physiol.* 108: 551-561.
- Areshev, A. G., Mamaeva, O. K., Andreeva, N. S. y Sukhareva, B. S.** (2000). Structure of glutamate decarboxylase and related PLP-enzymes: computer- graphical studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 18: 127-136.
- Aubert, S., Bligny, R., Douce, R., Gout, E., Ratcliffe, R. G. y Roberts, J. K.** (2001). Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by (^{13}C) and (^{31}P) nuclear magnetic resonance. *J. Exp. Bot.* 52: 37-45.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K.** (1996). *Currents Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Baker, P. J., Britton, K. L., Engel, P. C., Farrants, G. W., Lilley, K. S., Rice, D. W. y Stillman, T. J.** (1992). Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase. *Proteins* 12: 75-86.
- Balazs, R., Machiyama, Y., Hammond, B. J., Julian, T. y Richter, D.** (1970). The operation of the γ -aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in brain tissue in vitro. *Biochem. J.* 116: 445-461.
- Beauclerk, A. A. y Smith, A. J.** (1978). Transport of D-glucose and 3-O-methyl-D-glucose in the cyanobacteria *Aphanocapsa* 6714 and *Nostoc* strain Mac. *Eur. J. Biochem.* 82: 187-197.
- Belitsky, B. R. y Sonenshein, A. L.** (1998). Role and regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase genes. *J. Bacteriol.* 180: 6298-6305.
- Benachenhou-Lahfa, N., Forterre, P. y Labedan, B.** (1993). Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaeobacteria in the universal tree of life. *J. Mol. Evol.* 36: 335-346.
- Bergmeyer, H. U., Grassl, M. y Walter, H. E.** (1983). *Methods of enzymatic analysis*, vol. 2. (H.U. Bergmeyer, ed.) Verlag Chemie, Weinheim.
- Blaner, W. S. y Churchich, J.** (1979). Succinic semialdehyde dehydrogenase. Reactivity of lysyl residues. *J. Biol. Chem.* 254: 1794-1798.
- Blankenship, R. E.** (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33: 91-111.
- Blindermann, J. M., Maitre, M., Ossola, L. y Mandel, P.** (1978). Purification and some properties of L-glutamate decarboxylase from human brain. *Eur. J. Biochem.* 86: 143-152.

Blumenthal, K. M. y Smith, E. L. (1975). Functional arginine residues involved in coenzyme binding by glutamate dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 250: 6555-6559.

Bonete, M. J., Camacho, M. L. y Cadenas, E. (1990). Analysis of the kinetic mechanism of halophilic NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 1041: 305-310.

Bown, A. W. y Shelp, B. J. (1997). The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* 115: 1-5.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Britton, K. L., Baker, P. J., Rice, D. W. y Stillman, T. J. (1992). Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 209: 851-859.

Britton, K. L., Yip, K. S., Sedelnikova, S. E., Stillman, T. J., Adams, M. W., Ma, K., Maeder, D. L., Robb, F. T., Tolliday, N., Vetriani, C., Rice, D. W. y Baker, P. J. (1999). Structure determination of the glutamate dehydrogenase from the hyperthermophile *Thermococcus litoralis* and its comparison with that from *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* 293: 1121-1132.

Brock, T. D. (1973). Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. *Science* 179: 480-483.

Busch, K. B. y Fromm, H. (1999). Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant Physiol.* 121: 589-597.

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

Calhoun, M. W., Oden, K. L., Gennis, R. B., de Mattos, M. J. y Neijssel, O. M. (1993). Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J. Bacteriol.* 175: 3020-3025.

Cardoza, R. E., Moralejo, F. J., Gutierrez, S., Casqueiro, J., Fierro, F. y Martín, J. F. (1998). Characterization and nitrogen-source regulation at the transcriptional level of the *gdhA* gene of *Aspergillus awamori* encoding an NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Curr. Genet.* 34: 50-59.

Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F. y Foster, J. W. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 3525-3535.

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

Chauvat, F., Labarre, J. y Ferino, F. (1988). Development of genes transfer system for the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 629-637.

Chávez, S. (1992). Glutamato deshidrogenasas en cianobacterias. *Tesis Doctoral*. Universidad de Sevilla.

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

- Chávez, S., Lucena, J. M., Reyes, J. C., Florencio, F. J. y Candau, P.** (1999). The presence of glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under nonexponential growth conditions. *J. Bacteriol.* 181: 808-813.
- Chávez, S., Reyes, J. C., Chauvat, F., Florencio, F. J. y Candau, P.** (1995). The NADP-glutamate dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: cloning, transcriptional analysis and disruption of the *gdhA* gene. *Plant Mol. Biol.* 28: 173-188.
- Chen, C. H., Wu, S. J. y Martín, D. L.** (1998). Structural characteristics of brain glutamate decarboxylase in relation to its interaction and activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 349: 175-182.
- Churchich, J. E. y Moses, U.** (1981). 4-Aminobutyrate aminotransferase. The presence of nonequivalent binding sites. *J. Biol. Chem.* 256: 1101-1104.
- Collier, J. L. y Grossman, A. R.** (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J. Bacteriol.* 174: 4718-4726.
- Colman, R. F.** (1991). Glutamate dehydrogenase (bovine liver). En: *A study of enzymes*, vol. II. *Mechanism of enzyme action* (S. A. Kuby, ed.), pp. 173-192. CRC Press, Boca Raton (Florida, EE.UU.).
- Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Gambacorta, A., De Rosa, M. y Scandurra, R.** (1991). Glutamate dehydrogenase from the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Eur. J. Biochem.* 196: 459-467.
- Cooley, J. W., Howitt, C. A. y Vermaas, W. F.** (2000). Succinate:quinol oxidoreductases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: presence and function in metabolism and electron transport. *J. Bacteriol.* 182: 714-722.
- Cotter, P. D., O'Reilly, K. y Hill, C.** (2001). Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. *J. Food Prot.* 64: 1362-1368.
- Cronan, J. E. y LaPorte, D.** (1996). Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. En *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and molecular biology* (F. C. Neidhardt, ed.), pp. 206-216. ASM Press, Washington D.C.
- De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F. y Visca, P.** (1999). The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol. Microbiol.* 32: 1198-1211.
- DeLuna, A., Avendaño, A., Riego, L. y González, A.** (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties, and physiological roles. *J. Biol. Chem.* 276: 43775-43783.
- Donnelly, M. I. y Cooper, R. A.** (1981). Succinic semialdehyde dehydrogenases of *Escherichia coli*: their role in the degradation of p-hydroxyphenylacetate and γ -aminobutyrate. *Eur. J. Biochem.* 113: 555-561.
- Dover, S. y Halpern, Y. S.** (1972). Control of the pathway of γ -aminobutyrate breakdown in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 110: 165-170.
- Engels, A. y Pistorius, E. K.** (1997). Characterization of a gene encoding dihydrolipoamide dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Microbiology* 143: 3543-3553.

- Ernst, A., Kirschenlohr, H., Diez, J. y Böger, P.** (1984). Glycogen content and nitrogenase activity in *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* 140: 120-125.
- Ferino, F. y Chauvat, F.** (1989). A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. *Gene* 84: 257-266.
- Ferson, A. E., Wray, L. V., Jr. y Fisher, S. H.** (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* *gabP* gene is regulated independently in response to nitrogen and amino acid availability. *Mol. Microbiol.* 22: 693-701.
- Florencio, F. J., Marqués, S. y Candau, P.** (1987). Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Lett.* 223: 37-41.
- Flores, E., Guerrero, M. G. y Losada, M.** (1983). Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 722: 408-416.
- Flores, E. y Herrero, A.** (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En: *The Molecular Biology of the Cyanobacteria* (D. A. Bryant, ed.), pp. 487-517. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Fonda, M. L.** (1972). Glutamate decarboxylase. Substrate specificity and inhibition by carboxylic acids. *Biochemistry* 11: 1304-1309.
- García-Domínguez, M., Reyes, J. C. y Florencio, F. J.** (1999). Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 7161-7166.
- Gerhardt, A., Cinkaya, I., Linder, D., Huisman, G. y Buckel, W.** (2000). Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4- hydroxybutyryl-CoA. *Arch. Microbiol.* 174: 189-199.
- Gerig, J. T. y Kwock, L.** (1979). Inhibition of bacterial glutamate decarboxylase by tricarboxylic acid cycle intermediates. *FEBS Lett.* 105: 155-157.
- Gharbia, S. E. y Shah, H. N.** (1993). Measurement of metabolic activities of *Porphyromonas gingivalis* by impedance measurements and fluorescamine labelling technique. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 6: 179.
- 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.
- Glass, T. L. y Hylemon, P. B.** (1980). Characterization of a pyridine nucleotide-nonspecific glutamate dehydrogenase from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* 141: 1320-1330.
- Gray, M. W.** (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* 5: 294-299.
- Green, L. S., Li, Y., Emerich, D. W., Bergersen, F. J. y Day, D. A.** (2000). Catabolism of alpha-ketoglutarate by a *sucA* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*: evidence for an alternative tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* 182: 2838-2844.
- Grigorieva, G. y Shestakov, S.** (1982). Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 13: 367-370.

- Hagemann, M. y Zuther, E.** (1992). Selection and characterization of mutants of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 unable to tolerate high salt concentrations. *Arch. Microbiol.* 158: 429-434.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580.
- Hanahan, D.** (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. En: *DNA cloning* vol. 1 (D. M. Glover, ed.), IRL Press, Oxford.
- Hao, R. y Schmit, J. C.** (1991). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Neurospora crassa* conidia. *J. Biol. Chem.* 266: 5135-5139.
- Hayden, B. M., Bonete, M. J., Brown, P. E., Moir, A. J. y Engel, P. C.** (2002). Glutamate dehydrogenase of *Halobacterium salinarum*: evidence that the gene sequence currently assigned to the NADP⁺-dependent enzyme is in fact that of the NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 37-41.
- Heinrikson, R. L. y Meredith, S. C.** (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136: 65-74.
- Helling, R. B.** (1994). Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* 176: 4664-4668.
- Helling, R. B.** (1998). Pathway choice in glutamate synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 4571-4575.
- Helling, R. B.** (2002). Speed versus efficiency in microbial growth and the role of parallel pathways. *J. Bacteriol.* 184: 1041-1045.
- Hemmila, I. A. y Mantsala, P. I.** (1978). Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem. J.* 173: 45-52.
- Herdman, M., Janvier, M., Waterbury, J. B., Rippka, R. y Stanier, R. Y.** (1979). Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiology.* 111: 63-71.
- Hernández, G., Sánchez-Pescador, R., Palacios, R. y Mora, J.** (1983). Nitrogen source regulates glutamate dehydrogenase NADP synthesis in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 154: 524-528.
- Herrero, A., Muro-Pastor, A. M. y Flores, E.** (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183: 411-425.
- Holmes, D. S. y Quigley, M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Hornby, D. P. y Engel, P. C.** (1984). A kinetic study of the oxidative deamination of L-glutamate by *Peptostreptococcus asaccharolyticus* glutamate dehydrogenase using a variety of coenzymes. *Eur. J. Biochem.* 143: 557-560.
- Huang, J. J., Kolodny, N. H., Redfearn, J. T. y Allen, M. M.** (2002). The acid stress response of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6308. *Arch. Microbiol.* 177: 486-493.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, J. F.** (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989-2998.

- Jovin, T., Chrumbach, A. y Naughton, M. A.** (1964). Apparatus for preparative temperature regulated polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 9: 351-364.
- Jurgens, U. J., Drews, G. y Weckesser, J.** (1983). Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *J. Bacteriol.* 154: 471-478.
- Kanamori, K. y Ross, B. D.** (1995). Steady-state in vivo glutamate dehydrogenase activity in rat brain measured by ^{15}N NMR. *J. Biol. Chem.* 270: 24805-24809.
- Kanamori, K., Weiss, R. L. y Roberts, J. D.** (1987). Role of glutamate dehydrogenase in ammonia assimilation in nitrogen-fixing *Bacillus macerans*. *J. Bacteriol.* 169: 4692-4695.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. y Tabata, S.** (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res.* 3: 185-209.
- Kobayashi, T., Higuchi, S., Kimura, K., Kudo, T. y Horikoshi, K.** (1995). Properties of glutamate dehydrogenase and its involvement in alanine production in a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus profundus*. *J. Biochem. (Tokyo)*. 118: 587-592.
- Kujo, C., Sakuraba, H., Nunoura, N. y Ohshima, T.** (1999). The NAD-dependent glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum islandicum*: cloning, sequencing, and expression of the enzyme gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1434: 365-371.
- Labarre, J., Chauvat, F. y Thuriaux, P.** (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171: 3449-3457.
- Lara, C., Romero, J. M. y Guerrero, M. G.** (1987). Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 169: 4376-4378.
- Lehmann, M. y Wober, G.** (1976). Accumulation, mobilization and turn-over of glycogen in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* 111: 93-97.
- Lindblad, P., Rai, A. N. y Bergman, B.** (1987). The *Cycas revoluta*-*Nostoc* symbiosis: enzyme activities of nitrogen and carbon metabolism in the cyanobiont. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1695-1699.
- Lindroth, P. y Mopper, K.** (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* 51: 1667-1674.
- 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: 264-275.
- Ma, K., Robb, F. T. y Adams, M. W.** (1994). Purification and characterization of NADP-specific alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 562-568.
- Mackinney, G.** (1941). Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.
- Magalhaes, J. R., Ju, G. C., Rich, P. J. y Rhodes, D.** (1990). Kinetics of $^{15}\text{NH}_4^+$ assimilation in *Zea mays*. Preliminary studies with a glutamate dehydrogenase (GDH1) null mutant. *Plant Physiol.* 94: 647-656.

- Markwell, M. A., 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.
- Marqués, S., Florencio, F. J. y Candau, P.** (1989). Ammonia assimilating enzymes from cyanobacteria: *in situ* and *in vitro* assay using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 180: 152-157.
- Martínez-Bilbao, M., Martínez, A., Urkijo, I., Llama, M. J. y Serra, J. L.** (1988). Induction, isolation, and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the nonheterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J. Bacteriol.* 170: 4897-4902.
- Meeks, J. C., Wolk, C. P., Lockau, W., Schilling, N., Shaffer, P. W. y Chien, W. S.** (1978). Pathways of assimilation of [^{13}N]N $_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.* 134: 125-130.
- Meeks, J. C., Wolk, C. P., Thomas, J., Lockau, W., Shaffer, P. W., Austin, S. M., Chien, W. S. y Galonsky, A.** (1977). The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 252: 7894-7900.
- Metzer, E. y Halpern, Y. S.** (1990). *In vivo* cloning and characterization of the *gabCTDP* gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 172: 3250-3256.
- Metzer, E., Levitz, R. y Halpern, Y. S.** (1979). Isolation and properties of *Escherichia coli* K-12 mutants impaired in the utilization of γ -aminobutyrate. *J. Bacteriol.* 137: 1111-1118.
- Miller, S. M. y Magasanik, B.** (1990). Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172: 4927-4935.
- Miñambres, B., Olivera, E. R., Jensen, R. A. y Luengo, J. M.** (2000). A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biol. Chem.* 275: 39529-39542.
- Misono, H., Goto, N. y Nagasaki, S.** (1985). Purification, crystalization and properties of NADP-specific glutamate dehydrogenase from *Lactobacillus fermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 49: 117-123.
- Miyamoto, K. y Katsuki, H.** (1992). Possible physiological roles of aspartase, NAD- and NADP-requiring glutamate dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biochem. (Tokyo)*. 112: 52-56.
- Molnar-Perl, I.** (2001). Derivatization and chromatographic behavior of the *o*-phthaldialdehyde amino acid derivatives obtained with various SH-group-containing additives. *J. Chromatogr. A.* 913: 283-302.
- Morden, C. W. y Golden, S. S.** (1991). Sequence analysis and phylogenetic reconstruction of the genes encoding the large and small subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the chlorophyll b-containing prokaryote *Prochlorothrix hollandica*. *J. Mol. Evol.* 32: 379-395.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. y Florencio, F. J.** (1996). The NADP $^+$ -isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 178: 4070-4076.
- Narayan, V. S. y Nair, P. M.** (1990). Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29: 367-375.
- Neilson, A. H. y Doudoroff, M.** (1973). Ammonia assimilation in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 89: 15-22.

- Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., Kobayashi, M., Kimoto, H., Suzuki, I. y Aso, H. (1999).** *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology*. 145: 1375-1380.
- Ogawa, T., Marco, E. y Orus, M. I. (1994).** A gene (*ccmA*) required for carboxysome formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J. Bacteriol.* 176: 2374-2378.
- O'Leary, M. H. y Brummund, W., Jr. (1974).** pH jump studies of glutamate decarboxylase. Evidence for a pH-dependent conformation change. *J. Biol. Chem.* 249: 3737-3745.
- Pamula, F. y Wheldrake, J. F. (1991a).** The NAD-dependent glutamate dehydrogenase from *Dictyostelium discoideum*: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 291: 225-230.
- Pamula, F. y Wheldrake, J. F. (1991b).** Purification and properties of the NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biochem.* 105: 85-92.
- Pearce, J., Leach, C. K. y Carr, N. G. (1969).** The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 55: 371-378.
- Pelroy, R. A., Rippka, R. y Stanier, R. Y. (1972).** Metabolism of glucose by unicellular blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 87: 303-322.
- Platakis, A., Metaxari, M. y Shashidharan, P. (2000).** Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: implications for biologic function. *J. Neurochem.* 75: 1862-1869.
- Poole, P. y Allaway, D. (2000).** Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv. Microb. Physiol.* 43: 117-163.
- Prabhakaran, K., Harris, E. B. y Kirchheimer, W. F. (1983).** Glutamic acid decarboxylase in *Mycobacterium leprae*. *Arch. Microbiol.* 134: 320-323.
- Quintero, M. J., Muro-Pastor, A. M., Herrero, A. y Flores, E. (2000).** Arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway. *J. Bacteriol.* 182: 1008-1015.
- Ramputh, A. I. y Bown, A. W. (1996).** Rapid γ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. *Plant Physiol.* 111: 1349-1352.
- Reitzer, L. J., Bueno, R., Cheng, W. D., Abrams, S. A., Rothstein, D. M., Hunt, T. P., Tyler, B. y Magasanik, B. (1987).** Mutations that create new promoters suppress the sigma 54 dependence of *glnA* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 4279-4284.
- Rice, D. W., Hornby, D. P. y Engel, P. C. (1985).** Crystallization of an NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase from *Clostridium symbiosum*. *J. Mol. Biol.* 181: 147-149.
- Rippka, R., Derueles, J., Waterbury, J. B., Herman, M. y Stanier, R. Y. (1979).** Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.
- Robb, F. T., Maeder, D. L., DiRuggiero, J., Borges, K. M. y Tolliday, N. (2001).** Glutamate dehydrogenases from hyperthermophiles. *Methods Enzymol.* 331: 26-41.
- Robb, F. T., Park, J. B. y Adams, M. W. (1992).** Characterization of an extremely thermostable glutamate dehydrogenase: a key enzyme in the primary metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1120: 267-272.

- Roberts, E. y Simonsen, D. G.** (1963). Some properties of L-glutamic decarboxylase in mouse brain. *Biochem. Pharmacol.* 12: 113-134.
- Robinson, S. A., Stewart, G. R. y Phillips, R.** (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 98: 1190-1195.
- Rossetti, V. y Lombard, A.** (1996). Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 681: 63-67.
- Saitou, N. y Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sakakibara, H., Fujii, K. y Sugiyama, T.** (1995). Isolation and characterization of a cDNA that encodes maize glutamate dehydrogenase. *Plant Cell. Physiol.* 36: 789-797.
- Sallal, A. K. J. y Nimer, N. A.** (1990). The presence of glutamate dehydrogenase in *Chlorogloeopsis fritschii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67: 215-220.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, M., Álvarez, M. A., Balana, R. y Garrido-Pertierra, A.** (1988). Properties and functions of two succinic-semialdehyde dehydrogenases from *Pseudomonas putida*. *Biochim. Biophys. Acta* 953: 249-257.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.
- Satyanarayan, V. y Nair, P. M.** (1985). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Solanum tuberosum*. *Eur. J. Biochem.* 150: 53-60.
- Schaeffer, F. y Stanier, R. Y.** (1978). Glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Anabaena* sp. Kinetic and molecular properties. *Arch. Microbiol.* 116: 9-19.
- Schneider, B. L., Ruback, S., Kiupakis, A. K., Kasbarian, H., Pybus, C. y Reitzer, L.** (2002). The *Escherichia coli* *gabDTPC* operon: specific γ -aminobutyrate catabolism and nonspecific induction. *J. Bacteriol.* 184: 6976-6986.
- Schopf, J. W.** (1993). Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260: 640-646.
- Schwacke, R., Grallath, S., Breitzkreuz, K. E., Stransky, E., Stransky, H., Frommer, W. B. y Rentsch, D.** (1999). LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and γ -aminobutyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* 11: 377-392.
- Shaibe, E., Metzger, E. y Halpern, Y. S.** (1985). Metabolic pathway for the utilization of L-arginine, L-ornithine, agmatine, and putrescine as nitrogen sources in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 163: 933-937.
- Shashidharan, P., Clarke, D. D., Ahmed, N., Moschonas, N. y Plaitakis, A.** (1997). Nerve tissue-specific human glutamate dehydrogenase that is thermolabile and highly regulated by ADP. *J. Neurochem.* 68: 1804-1811.
- Shelp, B. J., Bown, A. W. y McLean, M. D.** (1999). Metabolism and functions of γ -aminobutyric acid. *Trends Plant. Sci.* 4: 446-452.

- Sherman, L., Bricker, T., Guikema, J. y Pakrasi, H.** (1987). The protein composition of the photosynthetic complexes from the cyanobacterial thylakoid membrane. En: *The cyanobacteria* (P. Fay y C. van Vaden, eds.), pp. 1-33. Elsevier, Amsterdam.
- Skinner, M. A. y Cooper, R. A.** (1982). An *Escherichia coli* mutant defective in the NAD-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase. *Arch. Microbiol.* 132: 270-275.
- Small, P. L. y Waterman, S. R.** (1998). Acid stress, anaerobiosis and *gadCB*: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* 6: 214-216.
- Smith, A. J.** (1983). Modes of cyanobacterial carbon metabolism. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 134B: 93-113.
- Smith, A. J., London, J. y Stanier, R. Y.** (1967). Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *J. Bacteriol.* 94: 972-983.
- Smith, E. L., Austen, B. M., Blumenthal, K. M. y Nyc, J. F.** (1975). Glutamate dehydrogenase. En: *The Enzymes* Vol. 11 (P. D. Boyer, ed.), pp. 293-367. Academic Press, New York.
- Sohling, B. y Gottschalk, G.** (1993). Purification and characterization of a coenzyme-A-dependent succinate-semialdehyde dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Eur. J. Biochem.* 212: 121-127.
- Srivastava, H. S. y Singh, R. P.** (1988). Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry* 26: 597-610.
- Stal, L. J. y Moezelaar, R.** (1997). Fermentation in cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 179-211.
- Standman, E. R. y Ginsburg, A.** (1974). The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. En: *The Enzyme* Vol. 10 (P. D. Boyer, ed.), pp. 755-807. Academic Press, New York.
- Stanier, R. Y. y Cohen-Bazire, G.** (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 225-274.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. y Cohen-Bazire, G.** (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.* 35: 171-205.
- Steinberg, C. E. W., Schäfer, H. y Beisker, W.** (1998). Do acid-tolerant cyanobacteria exist? *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 26: 13-19.
- Sterri, S. H. y Fonnum, F.** (1978). Isolation of organic anions by extraction with liquid anion exchangers and its application to micromethods for acetylcholinesterase and 4-aminobutyrate aminotransferase. *Eur. J. Biochem.* 91: 215-222.
- Stewart, G. R., Mann, A. F. y Fentem, P. A.** (1980). Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, and glutamate synthase. En: *The Biochemistry of Plants* Vol. 5. (K. Stumpf, y E. E. Conn, eds.), pp. 271-327. Academic Press, New York.
- Strausbauch, P. H. y Fischer, E. H.** (1970). Chemical and physical properties of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *Biochemistry* 9: 226-233.
- Strigacova, J., Chovanec, P., Liptaj, T., Hudecova, D., Tursky, T., Simkovic, M. y Varecka, L.** (2001). Glutamate decarboxylase activity in *Trichoderma viride* conidia and developing mycelia. *Arch. Microbiol.* 175: 32-40.

- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. y Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.
- Summers, M. L., Wallis, J. G., Campbell, E. L. y Meeks, J. C.** (1995). Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J. Bacteriol.* 177: 6184-6194.
- Tesch, M., de Graaf, A. A. y Sahm, H.** (1999). *In vivo* fluxes in the ammonium-assimilatory pathways in *Corynebacterium glutamicum* studied by ^{15}N nuclear magnetic resonance. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1099-1109.
- Thomas, J., Meeks, J. C., Wolk, C. P., Shaffer, P. W. y Austin, S. M.** (1977). Formation of glutamine from [^{13}N]ammonia, [^{13}N]dinitrogen, and [^{14}C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* 129: 1545-1555.
- Tramonti, A., De Biase, D., Giartosio, A., Bossa, F. y John, R. A.** (1998). The roles of His-167 and His-275 in the reaction catalyzed by glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273: 1939-1945.
- Tramonti, A., Visca, P., De Canio, M., Falconi, M. y De Biase, D.** (2002). Functional characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. *J. Bacteriol.* 184: 2603-2613.
- Turano, F. J. y Fang, T. K.** (1998). Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 117: 1411-1421.
- Turano, F. J., Thakkar, S. S., Fang, T. y Weisemann, J. M.** (1997). Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 113: 1329-1341.
- Tyler, B.** (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 1127-1162.
- Ueno, Y., Hayakawa, K., Takahashi, S. y Oda, K.** (1997). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1168-1171.
- Valentin, H. E., Zwingmann, G., Schonebaum, A. y Steinbuchel, A.** (1995). Metabolic pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Eur. J. Biochem.* 227: 43-60.
- Van Cauwenberghe, O. R. y Shell, B.J.** (1999). Biochemical characterization of partially purified gaba:pyruvate transaminase from *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 52: 575-581.
- Vancurova, I., Vancura, A., Volc, J., Kopecky, J., Neuzil, J., Basarova, G. y Behal, V.** (1989). Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Streptomyces fradiae*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 3311-3318.
- Veronese, F. M., Boccu, E. y Conventi, L.** (1975). Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: induction, purification and properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 377: 217-228.
- Johnson, T. W., Naithani, S., Stewart, C., Jr., Zybaïlov, B., Jones, A. D., Golbeck, J. H. y Chitnis, P. R.** (2003). The *menD* and *menE* homologs code for 2-succinyl-6-hydroxyl-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase and O-succinylbenzoic acid-CoA synthase in the phyloquinone biosynthetic pathway of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1557: 67-76.

- Wang, S., Feng, Y., Zhang, Z., Zheng, B., Li, N., Cao, S., Matsui, I. y Kosugi, Y.** (2003). Heat effect on the structure and activity of the recombinant glutamate dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Arch. Biochem. Biophys.* 411: 56-62.
- Wen, Z. y Morrison, M.** (1996). The NAD(P)H-dependent glutamate dehydrogenase activities of *Prevotella ruminicola* B(1)4 can be attributed to one enzyme (*gdhA*), and *gdhA* expression is regulated in response to the nitrogen source available for growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3826-3833.
- Williams, J. G. K.** (1988). Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.* 167: 766-778.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wolk, C. P., Thomas, J., Shaffer, P. W., Austin, S. M. y Galonsky, A.** (1976). Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 251: 5027-5034.
- Wootton, J. C.** (1983). Re-assessment of ammonium-ion affinities of NADP-specific glutamate dehydrogenases. Activation of the *Neurospora crassa* enzyme by ammonium and rubidium ions. *Biochem. J.* 209: 527-531.
- Wu, J. Y., Denner, L., Lin, C. T. y Song, G. X.** (1985). L-Glutamate decarboxylase from brain. *Methods Enzymol.* 113: 3-10.
- Wu, J. Y., Matsuda, T. y Roberts, E.** (1973). Purification and characterization of glutamate decarboxylase from mouse brain. *J. Biol. Chem.* 248: 3029-3034.
- Yamamoto, I., Abe, A. e Ishimoto, M.** (1987). Properties of glutamate dehydrogenase purified from *Bacteroides fragilis*. *J. Biochem. (Tokyo)* 101: 1391-1397.
- Yamaya, T. y Oaks, A.** (1987). Synthesis of glutamate by mitochondria. An anaplerotic function for glutamate dehydrogenase. *Physiol. Plant.* 70: 749-756.
- Yang, C., Hua, Q. y Shimizu, K.** (2002a). Integration of the information from gene expression and metabolic fluxes for the analysis of the regulatory mechanisms in *Synechocystis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 813-822.
- Yang, C., Hua, Q. y Shimizu, K.** (2002b). Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from ¹³C-labeled glucose. *Metab. Eng.* 4: 202-216.
- Yap, K. L., Yuan, T., Mal, T. K., Vogel, H. J. e Ikura, M.** (2003). Structural basis for simultaneous binding of two carboxy-terminal peptides of plant glutamate decarboxylase to calmodulin. *J. Mol. Biol.* 328: 193-204.
- Yonaha, K., Suzuki, K. y Toyama, S.** (1985). 4-Aminobutyrate:2-oxoglutarate aminotransferase of *Streptomyces griseus*: purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 146: 101-106.
- Yonaha, K. y Toyama, S.** (1980). γ -Aminobutyrate:alpha-ketoglutarate aminotransferase from *Pseudomonas* sp. F-126: purification, crystallization, and enzymologic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 200: 156-164.
- Zik, M., Arazi, T., Snedden, W. A. y Fromm, H.** (1998). Two isoforms of glutamate decarboxylase in *Arabidopsis* are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution. *Plant Mol. Biol.* 37: 967-975.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal compuesto por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la tesis doctoral de

D. JOSÉ MANUEL LUCENA SOTO

titulada LA DESCARBOXILACIÓN DEL GLUTAMATO EN SYNECHOCYSTIS

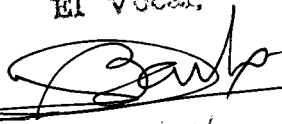
SP. PCC 6803: ENZIMAS IMPLICADAS Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA.

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE CON LAUDE

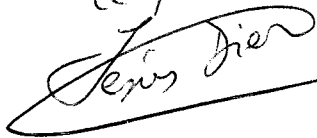
POR UNANIMIDAD

Sevilla, 31 de Octubre de 2003

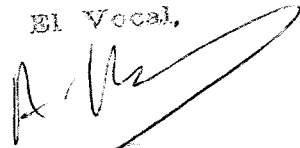
El Vocal,



El presidente



El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

