

ÍNDICES Y ABREVIATURAS

ÍNDICES Y ABREVIATURAS

1. ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICES Y ABREVIATURAS.....	1
1. ÍNDICE DE CONTENIDO.....	3
2. ÍNDICE DE FIGURAS	7
3. ÍNDICE DE TABLAS	12
4. ABREVIATURAS.....	13
4.1 Abreviaturas generales	11
4.2 Bases nitrogenadas	15
4.3 Aminoácidos.....	16
OBJETIVOS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	21
1. LAS CIANOBACTERIAS	23
2. METABOLISMO DEL NITRÓGENO	26
2.1 Asimilación de nitrógeno en cianobacterias.....	27
2.2 Ciclo GS-GOGAT	30
2.3 Regulación del metabolismo del nitrógeno	34
2.3.1 Regulación del metabolismo del nitrógeno en bacterias	34
2.3.1 Regulación de la GSI en cianobacterias.....	37
3. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LAS GLUTAMINA SINTETASAS	43
3.1 Glutamina sintetasa de tipo I.....	43
3.1.1 Relación entre la estructura y la función de la GSI	46
3.2 Glutamina sintetasa de tipo II.....	48
3.2.1 Glutamina sintetasa de tipo II de plantas.....	49
3.2.2 Glutamina sintetasa de tipo II de mamíferos.....	51
3.3 Glutamina sintetasa de tipo III.....	54
MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
A. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	59
1. Cianobacterias	59
1.1 Estirpes de cianobacterias	59
1.2 Medios y condiciones de cultivo	59

2. Escherichia coli	61
2.1 Estirpes de <i>E. coli</i>	61
3. Métodos de recogida de células.....	63
B. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN.....	63
1. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	63
1.1 Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.....	63
1.2 Plásmidos utilizados construidos en este trabajo.....	65
1.3 Oligonucleótidos utilizados.....	69
2. Aislamiento de ADN.....	76
2.1 Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	76
2.2 Aislamiento de ADN genómico de <i>Synechocystis</i>	77
3. Análisis de ADN	77
3.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	77
3.2 Cuantificación de ADN.....	78
3.3 Purificación de fragmentos de ADN.....	78
3.4 Manipulación enzimática de ADN.....	78
3.5 Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	79
3.6 Secuenciación de ADN.....	81
4. Introducción de ADN exógeno en organismos.....	81
4.1 Transformación de células de <i>E. coli</i>	81
4.1.1 Transformación por choque térmico:	81
4.1.2 Transformación por electroporación:	81
4.2 Transformación de células de <i>Synechocystis</i>	82
5. Mutagénesis dirigida.....	83
6. Detección de ADN mediante hibridación con sonda radiactiva (Southern Blot).....	83
6.1 Marcaje radiactivo de fragmentos de ADN	83
6.2 Transferencia de ADN a filtros de nylon	83
6.3 Hibridación de filtro con sonda radiactiva	84
6.4 Detección de radiactividad en filtros	84
C. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ARN	84
1. Tratamiento del material	84
2. Aislamiento de ARN total de <i>Synechocystis</i>	85
3. Análisis y cuantificación del ARN	85
3.1 Cuantificación de ARN.....	85
3.2 Electroforesis de ARN en geles de agarosa	86
4. Detección de ARNm mediante hibridación ARN-ADN (Northern blot).....	86
D. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	86
1. Expresión de proteínas en <i>E. coli</i>	86

2. Preparación de extractos celulares	87
2.1 Rotura con perlas de vidrio	87
2.2 Rotura por ultrasonidos.....	87
3. Cuantificación de proteínas.....	88
4. Electroforesis de proteínas	88
4.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes	88
4.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas	89
4.3 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	89
5. Inmunodetección de proteínas en membrana (Western Blot)	90
6. Purificación de proteínas	91
6.1 Cromatografía de afinidad por níquel	91
6.2 Cromatografía de exclusión molecular	92
7. Concentración de preparaciones de proteína por ultrafiltración	95
E. ENSAYOS ENZIMÁTICOS	95
1. Ensayo de actividad GS transferasa	95
1.1 Ensayo <i>in situ</i> de la GS.....	95
1.2 Ensayo <i>in vitro</i> de la GS.....	96
1.3 Inactivación <i>in vitro</i> de la GS.....	96
F. ESTUDIO CRISTALOGRAFÍCO DE LA GSI.....	96
1. Obtención de cristales de la GSI silvestre y del mutante GS-N456K de la GSI de <i>Synechocystis</i>	96
G. OTROS MÉTODOS.....	104
1. Análisis de secuencias de ADN y proteínas	104
2. Determinación de la concentración de clorofila	104
3. Medidas espectrofotométricas	105
4. Medidas de pH	105
RESULTADOS	107
1. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LOS FACTORES INACTIVANTES	109
1.1 Estudio de la región homóloga entre IF7 e IF17	111
1.1.1 Análisis <i>in vitro</i>	111
1.1.1.1 Análisis de la región carboxilo terminal de IF17	112
1.1.1.2 Análisis de IF7	115

1.1.2 Análisis <i>in vivo</i>	117
1.1.2.1 Generación y caracterización de estirpes de <i>Synechocystis</i> con mutaciones puntuales en el gen <i>gifB</i>	118
1.1.2.2 Generación y caracterización de estirpes de <i>Synechocystis</i> con mutaciones puntuales en el gen <i>gifA</i>	123
1.2 Estudio de la región amino terminal de IF17	127
1.3 Caracterización de los mutantes SIF y LIF	131
2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA GSI	137
2.1 Estudio de la especificidad de la interacción GS/IFs.....	137
2.1.1 Proteínas quiméricas entre la GS de <i>Synechocystis</i> y de <i>A. variabilis</i>	139
2.1.2 Identificación mediante mutagénesis dirigida de los residuos que confieren especificidad a la interacción GS/IF	141
2.2 Mutagénesis dirigida de residuos del extremo carboxilo terminal de la GSI de <i>Synechocystis</i>	149
2.3 Estudio mutacional del residuo E466 de la GSI de <i>Synechocystis</i>	154
3. ESTUDIO CRISTALOGRAFICO DE LA GSI DE SYNECHOCYSTIS	158
3.1 Obtención de cristales de la glutamina sintetasa de <i>Synechocystis</i>	159
3.2 Difracción de cristales de la glutamina sintetasa de <i>Synechocystis</i>	161
3.3 Análisis de los datos recogidos	161
3.4 Refinamiento de los modelos estructurales construidos	161
3.5 Análisis de los modelos estructurales obtenidos.....	164
DISCUSIÓN	175
1. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LOS FACTORES INACTIVANTES	177
2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA GLUTAMINA SINTETASA.....	183
3. ESTUDIO CRISTALOGRAFICO DE LA GSI DE SYNECHOCYSTIS	197
CONCLUSIONES	203
BIBLIOGRAFÍA.....	207
ANEXOS	223

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes de las cianobacterias empleadas en este trabajo.	24
Figura 2. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, de las cianobacterias <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (A) y <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (B).	26
Figura 3. Esquema de las rutas metabólicas de compuestos de carbono y nitrógeno.	30
Figura 4. Regulación de la glutamina sintetasa en bacterias.	35
Figura 5. Representación esquemática del proceso de inactivación/reactivación de la GSI mediada por amonio.	39
Figura 6. Modelo de regulación de la GSI en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	40
Figura 7. Estructuras de las glutamina sintetasas de <i>Salmonella typhimurium</i> (A) y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (B).	44
Figura 8. Sitio activo de la glutamina sintetasa bacteriana.	45
Figura 11. Estructura de la GS1a de <i>Zea Mays</i> L.	49
Figura 10. Comparación de las estructuras oligoméricas de las glutamina sintetasas de maíz (A) y de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (B).	50
Figura 11. Estructura de la GS de tipo II de <i>Canis familiaris</i> (A) y <i>Homo sapiens</i> (B).	52
Figura 12. Estudio estructural de la GS de tipo III de <i>Bacteroides fragilis</i>	55
Figura 13. Esquema de la PCR en tres fases para generar mutaciones en el interior de un gen.	80
Figura 14. Diagrama de solubilidad de proteínas en la formación de cristales en presencia de precipitante.	97
Figura 15. Técnicas para la obtención de cristales a partir de moléculas en solución.	98
Figura 16. Refinamiento de la molécula de AMP-PNP localizada en el sitio activo de la GS silvestre.	103
Figura 17. Alineamiento de proteínas homólogas a IF7 e IF17.	110
Figura 18. Inactivación <i>in vitro</i> de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con IF17 y sus versiones mutantes.	113

Figura 19. Ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturalizantes de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 incubada con cantidades crecientes de IF17, IF17-R90E, IF17-R103E, IF17-R103K e IF17-R110E.	114
Figura 20. Inactivación <i>in vitro</i> de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con IF7 y sus versiones mutantes indicadas.	115
Figura 21. Ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturalizantes de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 incubada con cantidades crecientes de IF7, IF7-R8E, IF7-R21E, IF17-R28E e IF7-K48E.....	116
Figura 22. Obtención y comprobación de estirpes mutantes del gen <i>gifB</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	119
Figura 23. Expresión del gen <i>gifB</i> en las diferentes estirpes silvestre y mutantes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	120
Figura 24. Análisis de la inactivación de la GS en estirpes mutantes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 que expresan diferentes versiones de la proteína IF17.	121
Figura 25. Acumulación de IF17 e IF7 en diferentes estirpes de <i>Synechocystis</i> sp PCC 6803 en una cinética de inactivación por amonio.	122
Figura 26. Obtención y comprobación de estirpes mutantes del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	124
Figura 27. Expresión del gen <i>gifA</i> en las diferentes estirpes silvestre y mutantes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	125
Figura 28. Análisis de la inactivación de la GSI en estirpes mutantes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 que expresan diferentes versiones de la proteína IF7.	126
Figura 29. Acumulación de IF7 en diferentes estirpes de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 durante una cinética de inactivación por amonio.	126
Figura 30. Inactivación <i>in vitro</i> de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con cantidades crecientes de IF17 silvestre y mutantes de la región amino terminal.	127
Figura 31. Estudio de la estabilidad de IF17 exógeno en extractos crudos de células de la estirpe SLIF ($\Delta gifA \Delta gifB$) en diferentes pH.	129
Figura 32. Efecto de la glutamina y la oscuridad en la actividad GS de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	132

Figura 33. Análisis de la actividad GS de las estirpes mutantes SIF (A), carente de IF7, y LIF (B), carente de IF17, de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	133
Figura 34. Expresión de los genes <i>gifA</i> y <i>gifB</i> en las estirpes silvestre y mutantes SIF y LIF de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	135
Figura 35. Acumulación de IF7 e IF17 en las estirpes silvestre y mutantes SIF y LIF de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 durante una cinética de inactivación por glutamina y oscuridad y durante una cinética de reactivación por luz.	136
Figura 36. Inactivación <i>in vitro</i> de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 con IF7 (A), IF17 (B) e IF7A (C).	138
Figura 37. Representación esquemática de las proteínas quiméricas purificadas.....	139
Figura 38. Inactivación <i>in vitro</i> de las proteínas quiméricas, la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y la GS de <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 con IF7 (A), IF17 (B) e IF7A (C).	140
Figura 39. Análisis de la especificidad de la interacción GS/IFs	142
Figura 40. Inactivación <i>in vitro</i> de las proteínas GS-E430A, GS-E444Q, GS-D452A, GS-AQA y GS-N456K con IF7 (A), IF17 (B) e IF7A (C).....	144
Figura 41. Inactivación <i>in vitro</i> de las proteínas GS-syn, GS-var y GS-N456K con IF7, IF17 e IF7A.....	145
Figura 42. Ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturalizantes de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y sus versiones mutantes GS-D452A, GS-AQA y GS-N456K, así como la GS de <i>A. variabilis</i> , incubadas con IF7, IF17 e IF7A.....	146
Figura 43. Inactivación <i>in vitro</i> de la proteína GSvar-K457N con IF7 (A), IF17 (B) e IF7A (C) 147	
Figura 44. Caracterización de la proteína GSvar-K457N.....	148
Figura 45. Alineamiento del extremo carboxilo terminal de la GS de cianobacterias y de <i>Escherichia coli</i>	150
Figura 46. Inactivación <i>in vitro</i> de las proteínas GS-D441A, GS-E448A, GS-E454A, GS-E466A y GS-D472A con IF7 (A) e IF17 (B).....	151
Figura 47. Ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturalizantes de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y sus versiones mutantes GS-D441A, GS-E448A, GS-E454A y GS-D472A incubadas con IF7 e IF17.	152

Figura 48. Análisis mediante cromatografía de exclusión molecular de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y sus versiones mutantes GS-E454A y GS-D472A.	154
Figura 49. Análisis de solubilidad de las proteínas GSI, GS-E466D, GS-E466Q, GS-E466A y GS-466K mediante Western blot.	155
Figura 50. Actividad <i>in situ</i> de las proteínas GSI, GS-E466D, GS-E466Q, GS-E466A y GS-E466K en la estirpe ET6017 de <i>Escherichia coli</i>	156
Figura 51. Ensayo de complementación de la auxotrofia de glutamina de la estirpe ET6017 de <i>Escherichia coli</i> por la expresión de las proteínas GSI, GS-E466D, GS-E466Q, GS-E466A y GS-E466K.	157
Figura 52. Cristales vistos al microscopio, obtenidos a partir de muestras puras de GS silvestre (A), y mutante GS-N456K (B y C) de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	159
Figura 53. Patrón de difracción de un cristal de GS-N456K de <i>Synechocystis</i>	160
Figura 54. Características de un cristal translocado.	162
Figura 55. Modelos estructurales de la glutamina sintetasa de <i>Synechocystis</i> obtenidos en este trabajo.	164
Figura 56. Estructura de la glutamina sintetasa de <i>Synechocystis</i>	165
Figura 57. Análisis de los residuos Glu466 (A) y Phe467 (B) de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	167
Figura 58. Modelo esquemático de las moléculas de ATP (Adenosín trifosfato) (A) y AMP-PNP (B).	168
Figura 59. Análisis del AMP-PNP en el sitio activo de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	170
Figura 60. Análisis de los iones Mn^{2+} en el sitio activo de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	171
Figura 61. Análisis comparativo del residuo localizado en la posición 456 de la GSI silvestre y de la proteína mutante GS-N456K de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	172
Figura 62. Residuos D452 y N456 de la glutamina sintetasa de <i>Synechocystis</i> a una resolución de 2.8 Å.	184
Figura 63. Residuo E448 de la glutamina sintetasa de <i>Synechocystis</i> a una resolución de 2.8 Å.	188

- Figura 64.** Posición relativa del glutamato 448 y el glutamato 330 en la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cuando el sitio activo se encuentra abierto para el sustrato (A) o cerrado (B). . 189
- Figura 65.** Posición relativa del glutamato 448 y los residuos Asp53 (A), Ser56 (B), Tyr182 (C), Glu215 (D) y del sitio activo (E) en la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803. 191
- Figura 66.** Estructura de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 a una resolución de 2.8 Å 193
- Figura 67.** Análisis del entorno bioquímico del residuo E461 en la GS de *Salmonella typhimurium*. 194
- Figura 68.** Representación del sitio activo de las glutamina sintetasas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (A y C), *Salmonella typhimurium* (B y D) y *Zea Mays* (E). 199
- Figura 69.** Alineamiento de las secuencias de las glutamina sintetasas de *Salmonella typhimurium*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Mycobacterium tuberculosis*, *Zea mays* y *Homo Sapiens*. 200
- Figura 70.** Representación del sitio de adenililación de la glutamina sintetasa de *Salmonella typhimurium* (C y D) y de su homólogo en la GS de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (A y B). 201

3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los tres tipos de glutamina sintetasas	31
Tabla 2. Residuos conservados que se encuentran en el sitio activo de la GS.	48
Tabla 3. Estirpes mutantes de <i>Synechocystis</i> utilizadas en este trabajo.	60
Tabla 4. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	61
Tabla 5. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo	64
Tabla 6. Plásmidos utilizados construidos en este trabajo.	69
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	76
Tabla 8. Proteínas purificadas durante la realización de este trabajo.	95
Tabla 9. Condiciones de cristalización de las proteínas estudiadas.	100
Tabla 10. Programas informáticos utilizados para la resolución de estructuras.	102
Tabla 11. Resultados estadísticos del modelo estructural de la GSI silvestre y de la proteína GS-N456K de <i>Synechocystis</i> obtenidos mediante cristalografía a una resolución de 2.8 Å, 3.0 Å y 3.69 Å.....	163
Tabla 12. Distancias comprendidas entre los últimos 50 residuos del extremo carboxilo terminal de la cadena A, y los residuos de la cadena G (adyacente a la anterior) de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	166
Tabla 13. Distancias comprendidas entre los grupos fosfatos del AMP-PNP y los componentes del sitio activo de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	169
Tabla 14. Distancias comprendidas entre los iones Mn ²⁺ y los residuos del sitio activo de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 así como el AMP-PNP.	171

4. ABREVIATURAS

4.1 Abreviaturas generales

[Fe-S]	Centro sulfo-férrico
2-OG	2-oxoglutarato
A	Amperio
Å	Ångström
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMP-PNP	Adenosina imidotrifosfato
Ap	Ampicilina
APS	Sincrotón Advance Photon Source (Chicago)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
AT	Adenilil transferasa
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C/N	Relación Carbono/Nitrógeno
cAMP	AMP cíclico
CC1	Cassette de resistencia a cloramfenicol
Chl	Clorofila
Ci	Curio
CK1	Cassette de resistencia a kanamicina
Cm	Cloramfenicol
CRP	cAMP receptor protein (proteína receptora de AMP cíclico)
CTP	Citosina trifosfato
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
E	Einstein
EDTA	Etilendiaminotetraacetato de sodio
FAD	Flavina adenina dinucleótido
Fd	Ferredoxina
FMN	Flavin mononucleótido
FPLC	Cromatografía líquida de proteínas de desarrollo rápido

g	Gramo
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa (Glutamina oxoglutarato amidotransferasa)
GS	Glutamina sintetasa
GS1	Glutamina sintetasa tipo II localizada en el citosol de células de plantas
GS2	Glutamina sintetasa tipo II localizada en cloroplastos de células de plantas
GSI	Glutamina sintetasa de tipo I
GSII	Glutamina sintetasa de tipo II
GSIII	Glutamina sintetasa de tipo III
h	hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HTH	Dominio hélice-vuelta-hélice
Hz/kHz	Herzio/Kiloherzio
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IF(s)	Factor(es) inactivante(s)
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
Km	Kanamicina
l	litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
m	metro
M	Molar
MAD	Dispersión de rayos X anómala
MBI	Molecular Biology Institute
min	minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
N	Normal
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
°C	Grado centígrado
Oligo	Oligonucleótido
ORF	<i>Open reading frame</i> (marco abierto de lectura)
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/volumen

pb	Pares de bases
PCC	Colección de cultivos del Instituto Pasteur
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sp	Espectinomicina
sp.	Especie
SSPE	Tampón compuesto por una mezcla de NaCl, fosfato de sodio y EDTA
St	Estreptomina
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamida
TES	Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSP	Sitio de inicio de la transcripción
U	Unidad de actividad enzimática
UCLA	University of California Los Angeles
UMP	Uridilo monofosfato
UT/UR	Uridililtransferasa
V	Voltio
v/v	Relación volumen/volumen
V _{máx}	Velocidad máxima
W	Watio
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

4.2 Bases nitrogenadas

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timina

4.3 Aminoácidos

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

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- I. Identificación de los aminoácidos involucrados en la interacción e inactivación de la GSI, presentes en los factores inactivantes y en la propia enzima.
- II. Identificación de los residuos responsables de la especificidad de los componentes del sistema de inactivación GS/IFs en distintas estirpes de cianobacterias.
- III. Resolución de la estructura de la GSI y del complejo GSI/IFs de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias constituyen un grupo de eubacterias capaces de realizar una fotosíntesis oxigénica similar a la de las plantas superiores (Blankenship, 1992; Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Woese, 1987). Se originaron hace 2800 millones de años (García-Ruiz *et al.*, 2003; Knoll, 2008) y han desempeñado un papel decisivo en la evolución de la vida en la Tierra puesto que son responsables del cambio de la atmósfera desde reductora a oxidante y de la aparición de la capa de ozono (Buick, 1992; Schopf, 1993). Las cianobacterias contribuyen en dos tercios a la producción primaria de los océanos, y ésta constituye la mitad de la producción primaria global (García-Fernández *et al.*, 2004). Debido a su participación en los ciclos del carbono y del nitrógeno se consideran unos organismos de gran importancia en el mantenimiento de la biosfera. Aunque la representación oceánica sea mayoritaria, son capaces de colonizar diversos entornos abarcando casi la totalidad de los ecosistemas. Además, algunas estirpes pueden establecer simbiosis con hongos, plantas y otros organismos. Esta adaptabilidad se debe en gran medida a la capacidad de fijar carbono y, en algunos casos, nitrógeno atmosférico, a la adaptación a la luz así como a la existencia de estructuras de resistencia (akinetos) o de dispersión (hormogonios) en algunas especies.

Según la teoría endosimbiótica, firmemente apoyada por el análisis genómico tanto nuclear como plasmídico de los organismos fotosintéticos, los cloroplastos de algas y plantas superiores provienen de un antecesor cianobacteriano (Gray, 1989). Las cianobacterias son consideradas bacterias Gram (-), puesto que presentan una membrana externa y una capa de peptidoglicano en su envuelta celular (Woese, 1987). Sin embargo, a diferencia de otras bacterias Gram (-) como *Escherichia coli*, presentan un sistema de endomembranas denominados tilacoides (Spence *et al.*, 2003), a excepción de *Gloeobacter violaceus* (Nakamura *et al.*, 2003).

Atendiendo a su morfología y al tipo de división celular que presentan, se han diferenciado cinco grupos de cianobacterias (Rippka *et al.*, 1979). La Sección I está compuesta por estirpes unicelulares que se dividen por fisión binaria o por gemación; a este grupo pertenecen los géneros *Synechococcus* y *Synechocystis*. La Sección II también incluye estirpes unicelulares pero se reproducen por fisión múltiple y/o fisión binaria; como los géneros *Dermocarpa* y *Pleurocarpa*. A la Sección III pertenecen

estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos, como *Pseudoanabaena* y *Spirulina*. Las Secciones IV y V agrupan a las estirpes filamentosas formadoras de heterocistos, se diferencian entre sí según cómo sea el plano de división de las células: las estirpes de la Sección IV, como las de los géneros *Anabaena* y *Nostoc*, se dividen en un único plano, mientras que estirpes del género *Fischerella*, pertenecientes a la Sección V, se dividen en más de un plano. No obstante, esta clasificación se encuentra en constante revisión debido al empleo de nuevas técnicas como el uso de marcadores quimiotaxonómicos y el análisis comparativo de macromoléculas. De acuerdo con el análisis filogenético de las secuencias del ARN ribosómico 16S, sólo las Secciones II, IV y V forman grupos verdaderos (Giovannoni *et al.*, 1988).

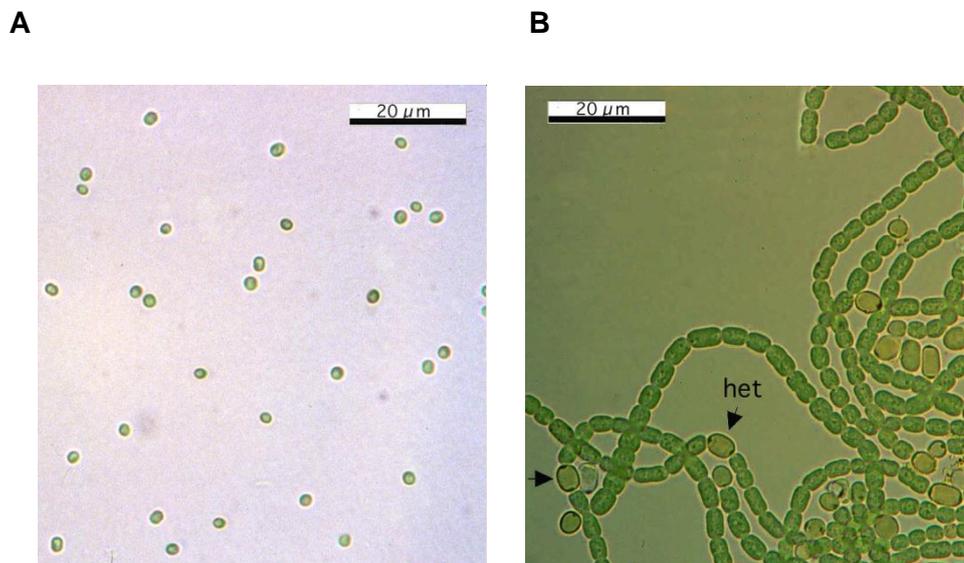


Figura 1. Imágenes de las cianobacterias empleadas en este trabajo.

A. *Synechocystis* sp. PCC 6803. B. Filamentos de *Anabaena variabilis* ATCC 29413; los heterocistos aparecen señalados con la palabra *het*. Imágenes obtenidas en el Servicio de Cultivos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

La mayoría de las estirpes son fotoautotróficas, pero algunas pueden crecer también mixotrófica, fotoheterotrófica o heterotróficamente en presencia de alguna fuente de carbono. Las cianobacterias fijan el dióxido de carbono mediante el Ciclo de Calvin, análogo al que llevan a cabo las plantas superiores. Sin embargo, a diferencia de éstas, las cianobacterias presentan un ciclo de Krebs incompleto, caracterizado por la ausencia del complejo enzimático 2-oxoglutarato deshidrogenasa. Esto confiere a esta ruta una función anabólica que desemboca en la formación de 2-oxoglutarato, esqueleto carbonado sobre el que se realiza la incorporación de nitrógeno mediante el

ciclo GS-GOGAT (Muro-Pastor *et al.*, 2005). En cuanto a la degradación de azúcares, las cianobacterias usan la vía alternativa de oxidación de las pentosas fosfato (Smith, 1982; Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Las cianobacterias presentan un contenido variable en G+C, que oscila entre 32 y 71%. Esta variabilidad también se ve reflejada en el tamaño de sus genomas, desde 9.06 Mb (*Nostoc punctiforme*) a 1.64 Mb (*Prochlorococcus marinus* str. MIT 9301). La mayoría de las especies son altamente poliploides, presentando en torno a 12 copias cromosómicas por célula (Labarre *et al.*, 1989). Muchas cianobacterias tienen la capacidad de incorporar ADN exógeno a su genoma de manera estable por medio de recombinación homóloga (Porter, 1986). Además, se han desarrollado técnicas de transferencia genética como la conjugación (Flores y Wolk, 1985; Wolk *et al.*, 1984) o la electroporación (Thiel y Poo, 1989). Se ha llevado a cabo también la mutagénesis de genes por inserción o sustitución de genes de resistencia a diferentes antibióticos (Suzuki *et al.*, 2000), permitiendo la interrupción o sustitución de fragmentos genómicos para determinar sus funciones. En la actualidad contamos con un amplio número de genomas cianobacterianos totalmente secuenciados (Cyanobase, <http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>). Todo ello hace de las cianobacterias unos excelentes organismos modelo para el estudio de procesos metabólicos desde un punto de vista molecular.

En este trabajo se han utilizado las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 (desde ahora denominada también *Synechocystis*) y *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (desde ahora denominada también *A. variabilis*) (Figura 1).

La cianobacteria unicelular no fijadora de dinitrógeno *Synechocystis* fue aislada por primera vez de aguas dulces de California en 1968 (Stanier *et al.*, 1971). Pertenece a la sección taxonómica I de la clasificación de Rippka (Rippka *et al.*, 1979) puesto que presenta morfología unicelular y división binaria. Como en el resto de cianobacterias, podemos observar tilacoides bien definidos en el interior celular. A nivel genómico, *Synechocystis* presenta una proporción de G+C del 47-50% y es altamente poliploide. Además, presenta la capacidad natural de incorporar ADN exógeno en su genoma.

Anabaena variabilis ATCC 29413 es una cianobacteria fijadora de dinitrógeno perteneciente a la sección IV de la clasificación de Rippka (Rippka *et al.*, 1979). La fijación de nitrógeno en este organismo tiene lugar en células diferenciadas denominadas heterocistos, que aparecen en los cultivos en ausencia de nitrógeno combinado. El uso de estas células permite separar espacialmente la fijación de

nitrógeno atmosférico del proceso de fotosíntesis y evitar así la inactivación irreversible de la nitrogenasa a causa del oxígeno molecular (Flores y Herrero, 1994). Las características morfológicas y bioquímicas de esta cianobacteria la hacen útil para la producción de hidrógeno como fuente renovable de energía (Shah *et al.*, 2001).

La pared celular de estos organismos está formada por las cuatro capas típicas de cianobacterias, denominadas envuelta, membrana externa, capa de peptidoglicano y membrana celular, desde la parte externa hacia el citoplasma. El sistema de membrana tilacoidal radia desde varias áreas de la periferia celular y/o de la región central (Figura 2).

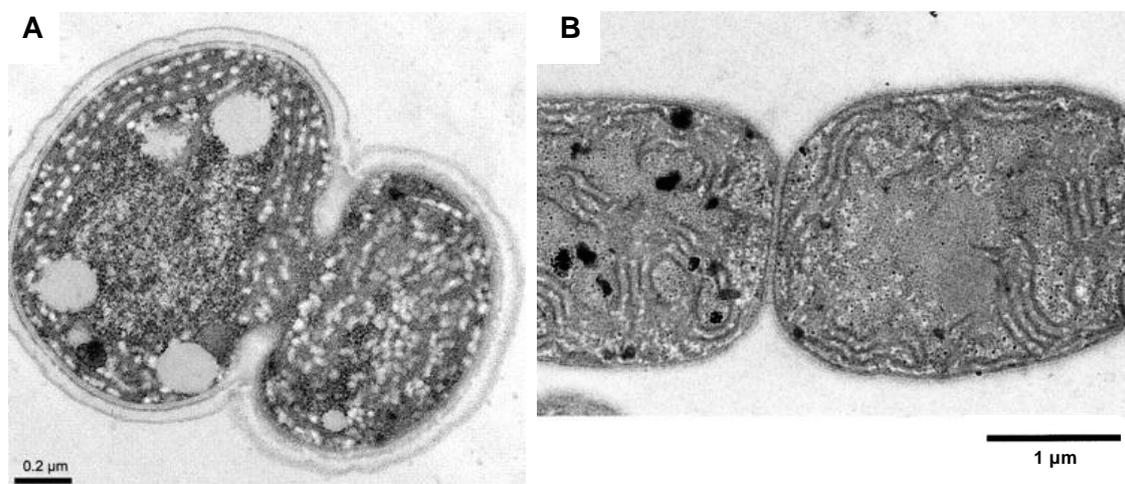


Figura 2. Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión, de las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 (A) y *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (B).

Imágenes obtenidas de Liu *et al.*, 2009 y Ziegler *et al.*, 2001, respectivamente.

La capacidad para adaptarse a distintas condiciones ambientales, su fácil manejo genético, la disponibilidad de sus genomas secuenciados así como sus sencillos requerimientos nutricionales, hacen de *Synechocystis* y *Anabaena* excelentes modelos de estudio de organismos fotosintéticos (Ikeuchi y Tabata, 2001; Koksharova y Wolk, 2002).

2. METABOLISMO DEL NITRÓGENO

El nitrógeno es incorporado en la biosfera mediante la asimilación que realizan microorganismos y plantas (Herrero *et al.*, 2001). Estos organismos tienen la

capacidad de incorporar al metabolismo celular una amplia gama de compuestos nitrogenados, incluyendo amonio, nitrato, nitrito, urea o aminoácidos. El amonio es la forma nitrogenada más reducida y por tanto su asimilación requiere de un menor gasto energético. Es por eso que los microorganismos prefieren el amonio como fuente de nitrógeno. Por otro lado, el nitrógeno combinado es escaso en muchos ambientes, especialmente en los océanos. La forma de nitrógeno más abundante en la tierra es el nitrógeno molecular gaseoso o dinitrógeno. La asimilación de dinitrógeno, también denominada fijación de nitrógeno, requiere la participación de un complejo enzimático denominado nitrogenasa, que reduce el nitrógeno atmosférico generando amonio. Sólo aquellos organismos que presenten dicho complejo enzimático podrán utilizar dinitrógeno como aporte de nitrógeno para su metabolismo (Stal y Zher, 2008).

2.1 Asimilación de nitrógeno en cianobacterias

A una alta concentración y en un medio alcalino, el amonio (NH_4^+) está presente mayoritariamente en forma de amoniaco (NH_3), compuesto capaz de difundir a través de las membranas (Kleiner, 1981). Sin embargo, los ecosistemas acuáticos contienen bajas concentraciones de amonio ($< 1 \mu\text{M}$), por lo que las cianobacterias han desarrollado sistemas específicos de transporte para concentrar el amonio en el interior celular, con gasto de energía. Estas permeasas han sido descritas en plantas, levaduras y algunas bacterias, y están codificadas por los genes denominados *MEP*, *AMT* o *amt*, respectivamente (Marini *et al.*, 1994; Siewe *et al.*, 1996; Rawat *et al.*, 1999). Estas permeasas pertenecen a una familia de proteínas altamente hidrofóbicas que portan entre 10 y 12 segmentos transmembrana (Thomas *et al.*, 2000). El canal transportador AmtB de *E. coli* presenta 11 segmentos transmembrana y su estructura ha sido resuelta a 1.35 Å por Khademi *et al.* (2004) (archivo 1U7C.pdb). En los genomas cianobacterianos disponibles se pueden encontrar de uno a tres genes que codifican una posible permeasa de amonio. En la cianobacteria *Synechocystis* se han identificado tres genes *amt*: *amt1*, *amt2*, y *amt3*, que se expresan en condiciones de deficiencia de nitrógeno y son reprimidos en presencia de amonio, sustrato natural de las permeasas Amt (Montesinos *et al.*, 1998). Mediante análisis mutacional de las tres permeasas de amonio de *Synechocystis* y el uso de [^{14}C]metilamonio como análogo, se ha probado que la permeasa Amt1 es responsable del 95 % de la incorporación radiactiva al interior celular. En el caso de *Synechococcus* sp. PCC 7942 se ha identificado un único gen *amt1* (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b). Tanto el gen *amt1* de *Synechocystis*, como el presente en *Synechococcus* están regulados por el factor

transcripcional NtcA (ver apartado 2.3.1) (Montesinos *et al.*, 1998; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002b).

La asimilación de nitrato por las cianobacterias implica la participación de un transporte activo constituido por un transportador de tipo ABC de alta afinidad, codificado por los genes *nrtABCD* y capaz de incorporar tanto nitrato como nitrito al interior celular (Frías *et al.*, 1994; Luque *et al.*, 1994). Por otro lado, algunas cianobacterias marinas como *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Sakamoto *et al.*, 1999) presentan un transportador secundario de la superfamilia MFS (“Mayor Facilitator Superfamily”) codificado por el gen *nrtP* (Wang *et al.*, 2000). El nitrato intracelular es reducido secuencialmente a nitrito y amonio mediante las enzimas nitrato reductasa, codificada por el gen *narB*, y nitrito reductasa, codificada por el gen *nir*, usando la ferredoxina como donador de electrones. Los genes *narB* y *nir* de muchas cianobacterias se encuentran agrupados formando un operón junto con los genes que codifican la permeasa de nitrato/nitrito (Flores y Herrero, 2005).

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico lo hacen utilizando el complejo enzimático de la nitrogenasa, y han desarrollado eficaces sistemas para aumentar el rendimiento enzimático. La nitrogenasa cataliza la reducción de dinitrógeno a dos moléculas de amonio, utilizando de 10 a 12 moles de ATP por mol de dinitrógeno reducido. El complejo enzimático que cataliza esta reacción está formado por dos componentes proteicos: una proteína de unión a Fe-Mo denominada dinitrogenasa y una proteína de unión a Fe conocida como dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β codificadas por los genes *nifD* y *nifK*, respectivamente. La dinitrogenasa reductasa es un homodímero, codificado por el gen *nifH*. La dinitrogenasa reductasa media la transferencia de electrones, procedentes de donadores como la ferredoxina o la flavodoxina, a la dinitrogenasa, con gasto de ATP. La dinitrogenasa interacciona con el dinitrógeno mediante el cofactor Fe-Mo y cataliza la reducción de éste a amonio (Flores y Herrero, 1994; Stal y Zehr, 2008). El oxígeno atmosférico inhibe la fijación de nitrógeno, por lo que muchos organismos la separan temporal o espacialmente de la fotosíntesis oxigénica. Algunas cianobacterias presentan células diferenciadas especializadas en la fijación de nitrógeno denominadas heterocistos. Los heterocistos proporcionan un ambiente anaeróbico finamente regulado para aumentar la eficiencia funcional y la protección de la nitrogenasa. La diferenciación de los heterocistos implica cambios estructurales y bioquímicos, que incluyen la deposición de una envuelta externa de polisacáridos y glicopéptidos en la pared celular y la ausencia de fotosistema II. La presencia de una

envuelta externa reduce la difusión de gases al interior celular, mientras que la ausencia del fotosistema II evita la liberación de oxígeno procedente de la fotosíntesis (Flores y Herrero, 2010). La ausencia de Fd-GOGAT en los heterocistos de cianobacterias filamentosas como *Anabaena* supone la importación del glutamato desde las células vegetativas para poder ser utilizado en la incorporación de amonio. De la misma forma, la glutamina proveniente de la asimilación de amonio debe ser exportada a las células vegetativas para sintetizar compuestos nitrogenados (Martín-Figueroa *et al.*, 2000). En cianobacterias no formadoras de heterocistos, la protección de la nitrogenasa frente al oxígeno exógeno (atmosférico) o endógeno (fotosintético) tiene lugar de diferentes formas. La más extendida es la separación temporal entre la fijación de nitrógeno (en oscuridad) y la fotosíntesis (en luz) (Mitsui *et al.*, 1987).

La urea representa una importante fuente de nitrógeno para las cianobacterias en su ambiente natural, encontrándose en los océanos a una concentración similar a la del nitrato o el amonio (0,1- 5 μM) (Flores y Herrero, 1994). Se han identificado los genes codificantes del transportador de urea de tipo ABC (operón *urtABCDE*) presente en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Valladares *et al.*, 2002), así como los genes estructurales que codifican la ureasa encargada de metabolizar la urea, generando amonio y CO_2 (*ureA*, *ureB*, *ureC*). Esta enzima típica bacteriana ha sido identificada en las cianobacterias *Synechococcus* sp. WH7805, *Synechocystis* y *Anabaena* sp. PCC 7120 (Flores y Herrero, 1994).

En cuanto a la asimilación de aminoácidos como arginina, glutamina o asparragina, se han identificado eficaces sistemas de transporte en cianobacterias mediante el uso de aminoácidos marcados radiactivamente. Estos estudios realizados en *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis*, *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp. PCC 7937; *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107 y *Calothrix* sp. PCC 7601 demuestran que todas las estirpes analizadas presentan al menos un sistema de transporte de aminoácidos neutros como glutamina o asparragina, y algunas de ellas tienen adicionalmente un transportador específico de aminoácidos básicos o ácidos. Concretamente, se ha identificado un sistema de transporte de tipo ABC para aminoácidos neutros en *Synechocystis* y *Anabaena* sp. PCC 7120, codificado por los genes *nat* (Montesinos *et al.*, 1997; Picossi *et al.*, 2005).

Mediante la acción de la cianasa codificada por el gen *cysS*, el cianato se descompone en CO_2 y amonio, fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. En *Synechococcus* sp. PCC 7942, el gen *cysS* se encuentra formando un operon con los

tres genes *cynABD*, que codifican un transportador de tipo ABC de cianato y nitrito (Espie *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 2009).

Finalmente, el amonio proveniente de la reducción de compuestos nitrogenados así como de la asimilación desde el exterior celular, es incorporado a los esqueletos carbonados a través de la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), en el ciclo conocido como ruta GS-GOGAT (Figura 3). Como ruta alternativa y minoritaria, algunas cianobacterias pueden incorporar el amonio intracelular a través de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH), que cataliza la síntesis de glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato (Neilson y Doudoroff, 1973). Mediante el marcaje radiactivo de metabolitos así como el uso de MSX (L-metionina-D,L-sulfoximina) como inhibidor específico de la GS, se ha demostrado que la ruta principal de asimilación de nitrógeno es el ciclo GS-GOGAT (Meeks *et al.*, 1978; Wolk *et al.*, 1976; Stewart y Rowell, 1975).

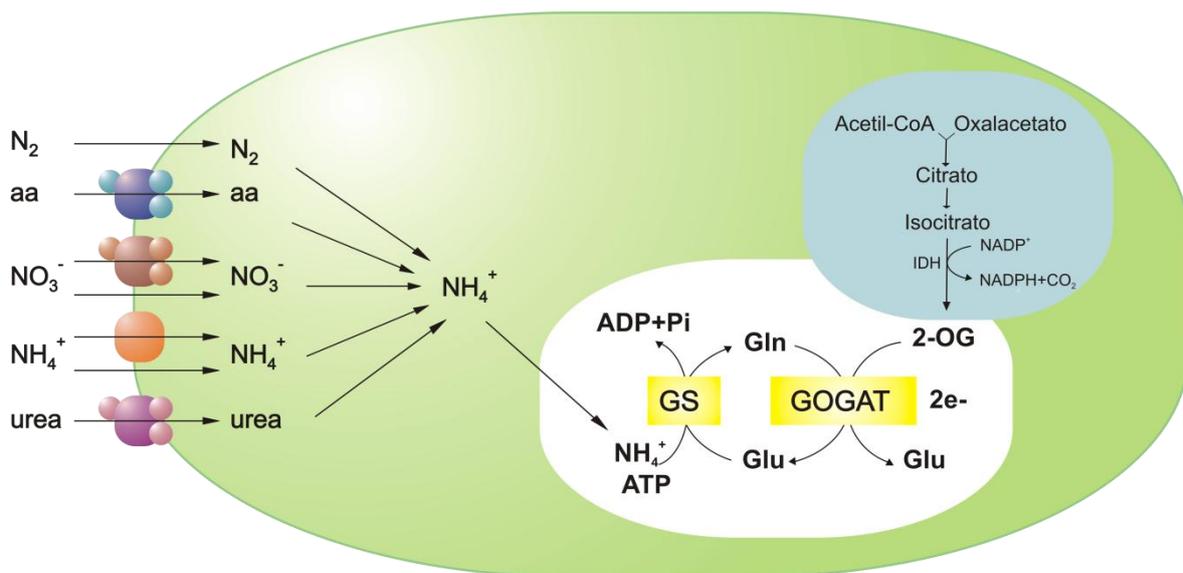


Figura 3. Esquema de las rutas metabólicas de compuestos de carbono y nitrógeno.

Los procesos pertenecientes al metabolismo de compuestos nitrogenados están sombreados en blanco, los del metabolismo del carbono en azul claro. GS, glutamina sintetasa; GOGAT, glutamato sintasa; aa, aminoácidos; e⁻, electrones; 2-OG, 2-oxoglutarato; Gln, glutamina; Glu, glutamato.

2.2 Ciclo GS-GOGAT

La glutamina sintetasa (EC 6.3.1.2) cataliza la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio en una reacción que depende de la presencia de cationes

divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y gasto de energía. Se han identificado tres tipos de GS (tabla 1). La GS de tipo I (GSI), típicamente procariota, está compuesta por 12 subunidades de aproximadamente 53 kDa organizadas en dos anillos hexámicos superpuestos con una masa molecular nativa de unos 636 kDa (Stadtman y Ginsburgs, 1974). Está codificada por el gen *glnA* y se ha caracterizado en varias estirpes cianobacterianas como *Synechocystis*, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anacystis nidulans*, *Phormidium laminosum*, *Calothrix* sp. PCC 7601 (actualmente denominada *Fremyella diplosiphon*) y *A. variabilis* (Florencio y Ramos, 1985; Blanco *et al.*, 1989; Mérida *et al.*, 1990; Orr *et al.*, 1981; Stacey *et al.*, 1977; Martin *et al.*, 1997). Las medidas de Km de las GSIs para los distintos sustratos varían entre 20 y 170 μM para el amonio, 0,35 y 5 mM para el glutamato y 0,3 y 0,7 mM para el ATP (Florencio y Reyes, 2002).

Enzima	Gen	Subunidades	Masa Molecular (kDa)		Km NH_4^+ (mM)
			Subunidad	Nativa	
GSI (1)	<i>glnA</i>	12	53	636	0.05-0.2
GSII (2)	<i>glnII</i> (bacterias) <i>GS1</i> y <i>GS2</i> (plantas) <i>gluL</i> (mamíferos)	10	40	398	0.2
GSIII (3)	<i>glnN</i>	12	80	860	0.2

Tabla 1. Características de los tres tipos de glutamina sintetasas.

Adaptado de Florencio y Reyes, 2002. (1) Procariotas, (2) Eucariotas, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Streptomyces*, Frankia, (3) Cianobacterias, Bacteroidaceae, Clostridiaceae, Diatomeas.

La GS de tipo II (GSII), típicamente eucariótica, está codificada por el gen *glnII* en bacterias, *GS1* y *GS2* en plantas, las cuales presentan dos isoformas dependiendo de la localización celular de la enzima, o bien *gluL* en mamíferos. Se compone de 10 subunidades de aproximadamente 40 kDa organizadas en dos anillos pentaméricos superpuestos. La GSII comparte el mismo mecanismo enzimático que la GSI, comprobado mediante estudios estructurales de la proteína en presencia de sustratos (Unno *et al.*, 2006; Krajewski *et al.*, 2008).

La GS de tipo III (GSIII), codificada por el gen *glnN* y compuesta por 12 subunidades de aproximadamente 75 kDa, fue identificada por primera vez en bacterias anaeróbicas estrictas como *Bacteroides fragilis* y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Goodman y Woods, 1993; Southern *et al.*, 1986; Van Rooyen *et al.*, 2006). En cianobacterias se ha caracterizado la GSIII en *Synechocystis*, *Pseudoanabaena* sp. PCC 6903 y *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Reyes y Florencio, 1994; Crespo *et al.*, 1998; Sauer *et al.*, 2000).

Las cianobacterias pueden presentar la GSI, la GSIII o ambas. Como ejemplo de las que sólo poseen GSI podemos citar *A. variabilis* y otras estirpes fijadoras de dinitrógeno. Otras, como *Synechocystis* o *Synechococcus* sp. PCC 7942, presentan las dos glutamina sintetasas. Sólo una cianobacteria conocida presenta como única GS, la de tipo III, y es el caso particular de *Pseudoanabaena* sp. PCC 6903. Ambas GS son notablemente diferentes, con una identidad inferior al 20 %, aunque comparten dominios homólogos involucrados en su actividad o en la unión a los cationes divalentes (Reyes y Florencio, 1994; Eisenberg *et al.*, 2000).

La GSI de *Synechocystis* es responsable del 97 % de la actividad GS total de las células cultivadas en un medio con nitrato, mientras que la actividad de la GSIII sólo representa el 3 %. Sin embargo, tras la privación de nitrógeno durante 24 horas, la actividad GSIII aumenta hasta alcanzar un 20 % de la actividad GS total del cultivo. Esto sugiere que la GSIII puede conferir una ventaja adaptativa frente a situaciones de estrés por limitación de nitrógeno (García-Domínguez *et al.*, 1997; Reyes y Florencio, 1994; Sauer *et al.*, 1999).

La GSI es responsable de la síntesis de glutamina *in vivo* mediante una reacción conocida como reacción biosintética (Figura 3), descrita como un mecanismo en dos pasos. El primer paso es la formación de un intermediario activado denominado γ -glutamil fosfato. En un segundo paso, este intermediario es atacado por la molécula de amonio, liberando fosfato y generando glutamina (Krishnaswamy *et al.*, 1960) (Ver apartado 3.1).

Además de la reacción biosintética, la GSI es capaz de llevar a cabo una reacción enzimática no fisiológica gracias a su actividad transferasa. En esta reacción, glutamina, Mn^{2+} e hidroxilamina, en presencia de ADP y arseniato, dan lugar a γ -glutamil hidroxamato liberando amonio. El arseniato se une a la GSI en el sitio de unión a fosfato y se especula que el oxígeno del arseniato ataca a la glutamina, dando lugar al intermediario activado (γ -glutamil arseniato). Posteriormente, la hidroxilamina

se une a la GSI en el sitio de unión a amonio y ataca el intermediario liberando amonio y generando γ -glutamil hidroxamato. Este producto es estable y puede medirse espectrofotométricamente (Woolfolk *et al.*, 1966).

La glutamato sintasa o GOGAT (glutamina oxoglutarato amidotransferasa) cataliza la transferencia del grupo amido de la glutamina al 2-oxoglutarato generando dos moléculas de glutamato, en una reacción que requiere dos electrones (Figura 3). Se han descrito tres tipos de GOGATs dependiendo del tipo de donador de electrones que utilicen. Los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica presentan dos tipos de GOGAT, un primer tipo usa la ferredoxina como donador de electrones y el segundo usa NADH. Las bacterias presentan un tercer tipo de GOGAT que utiliza el NADPH como reductor (Temple *et al.*, 1998). La NADPH-GOGAT (EC 1.4.1.13) está compuesta por dos subunidades diferentes: una subunidad grande de 150 kDa, que contiene FMN y un centro sulfoférrico [3Fe-4S], y una subunidad pequeña de 50 kDa que contiene FAD y dos centros sulfoférricos [4Fe-4S] (Van den Heuvel *et al.*, 2004). La Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1; codificada por el gen *gltS*) ha sido descrita en plantas superiores, algas verdes y cianobacterias. Esta enzima está compuesta por un monómero de 170 kDa que contiene FMN y un grupo sulfoférrico [3Fe-4S], similar a la subunidad grande de la NADPH-GOGAT. La NADH-GOGAT (EC 1.4.1.14) de plantas está formada por un monómero de 200 kDa mientras que la NADH-GOGAT de cianobacterias presenta una subunidad grande de 160 kDa homóloga a la Fd-GOGAT (codificada por el gen *gltB*) y una subunidad pequeña homóloga a la subunidad pequeña de la NADPH-GOGAT (codificada por el gen *gltD*) (Muro-Pastor *et al.*, 2005; Vanoni y Curti, 2008).

El amonio es incorporado al metabolismo utilizando como esqueleto carbonado el 2-oxoglutarato (Muro-Pastor *et al.*, 2005). Este metabolito se genera gracias a la acción de la isocitrato deshidrogenasa (IDH), que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato junto con la reducción de un piridín nucleótido (Figura 3). Se han identificado dos tipos de IDHs, las dependientes de NAD o de NADP (NAD-IDH o NADP-IDH, respectivamente). Aunque ambos tipos de IDH han sido descritos en procariotas, la mayoría de las bacterias presentan sólo NADP-IDH. La IDH cianobacteriana es estrictamente dependiente de NADP y ha sido purificada de *Synechocystis*, entre otros (Muro-Pastor y Florencio, 1992). La enzima está compuesta por dos subunidades idénticas de 55 kDa cada una. Los genes *icd*, que codifican para las distintas IDH, de *Synechocystis* y *Anabaena* sp. PCC 7120 han sido clonados y secuenciados, mostrando una expresión dependiente de las condiciones nitrogenadas. De este modo, el transcrito de *icd* aumenta de 3 a 5 veces en condiciones de limitación

de nitrógeno. No se ha podido obtener una estirpe mutante de *Synechocystis* o *Anabaena* carente de IDH, indicando que el gen *icd* es esencial en cianobacterias (Muro-Pastor y Florencio, 1994; Muro-Pastor *et al.*, 1996).

Para la adaptación rápida a los cambios medioambientales, los microorganismos poseen sistemas muy eficientes de percepción y transducción de señales. En concreto, el estado nitrogenado del medio es percibido en función de la concentración intracelular de metabolitos provenientes de la asimilación del nitrógeno y del carbono. La enterobacteria *Salmonella typhimurium* percibe el estado nitrogenado celular en función de la concentración de glutamina y 2-oxoglutarato (Ikeda *et al.*, 1996). En cianobacterias se ha descrito que aquellos mutantes de *Synechocystis* que presentan una alteración en los niveles de actividad de la GS muestran cambios en la regulación de la expresión de genes dependientes de NtcA (ver apartado 2.3.1). Analizando la concentración intracelular de 2-oxoglutarato y 19 aminoácidos diferentes, en mutantes de *Synechocystis* que carecen de GS ($\Delta glnA$) o de factores inactivantes ($\Delta gifA\Delta gifB$), afectados en los niveles de actividad GS, se demostró que el estado nitrogenado es percibido a través de los cambios intracelulares de 2-oxoglutarato (Muro-Pastor *et al.*, 2001). Puesto que las cianobacterias carecen del complejo 2-oxoglutarato dehidrogenasa, mostrando un ciclo de Krebs incompleto (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), el 2-oxoglutarato sintetizado por la IDH es metabolizado exclusivamente por el ciclo GS-GOGAT. En este punto, el metabolismo del nitrógeno y el metabolismo del carbono confluyen. Posiblemente esta sea la razón por la que estos organismos utilizan el 2-oxoglutarato para percibir el balance carbono/nitrógeno intracelular.

2.3 Regulación del metabolismo del nitrógeno

2.3.1 Regulación del metabolismo del nitrógeno en bacterias

Las bacterias pueden utilizar un amplio rango de compuestos nitrogenados que son transportados y metabolizados utilizando una extensa red de proteínas. Dichas proteínas se encuentran reguladas a nivel de síntesis y actividad en función de la disponibilidad de los distintos compuestos nitrogenados. La regulación de la GS tanto a nivel transcripcional como postraducciona es uno de los mecanismos de regulación mejor estudiados dentro del metabolismo del nitrógeno. La regulación postraducciona de la GS en bacterias implica mecanismos de inhibición por retroalimentación por productos finales del metabolismo de la glutamina y por ADP, AMP y otros nucleótidos

(Liaw *et al.*, 1993), y/o modificación covalente de la enzima, bien mediante adenilación llevada a cabo por la adenilil transferasa (AT) o bien mediante regulación por oxidación o nitración potenciado por peroxinitrito (Berlett *et al.*, 1998).

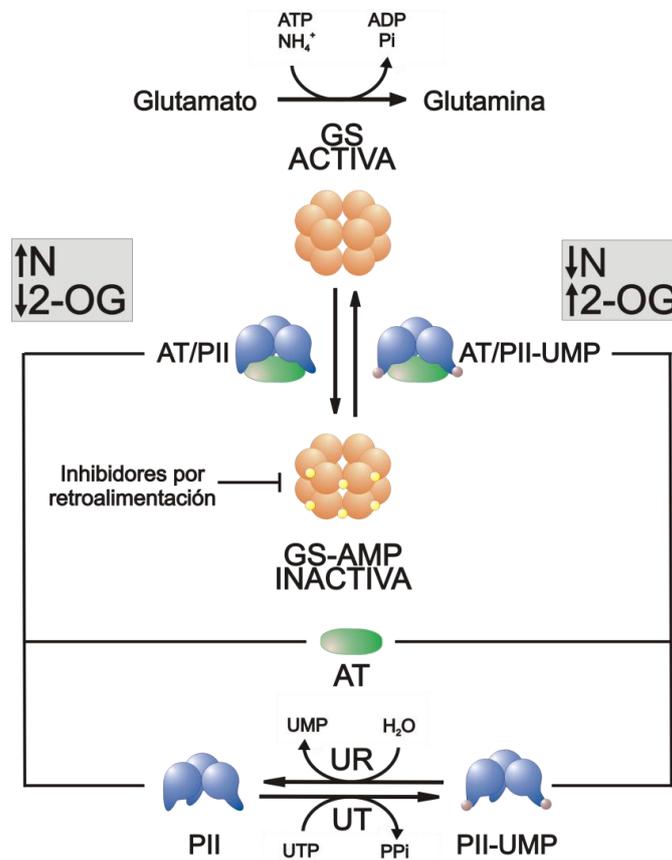


Figura 4. Regulación de la glutamina sintetasa en bacterias.

El estado nitrogenado se indica como ↑ N para una situación de exceso de nitrógeno y ↓ N para una situación de carencia de este elemento. La concentración celular de 2-oxoglutarato en las diferentes situaciones se indica como ↑ 2-OG cuando la concentración celular es elevada o ↓ 2-OG cuando la concentración es baja. GS, glutamina sintetasa; AT, adenililtransferasa; UT/UR, uridililtransferasa

En cuanto a la inhibición por retroalimentación se refiere, estudios cinéticos de la reacción biosintética de la GS de *E. coli* han mostrado que la actividad enzimática se ve inhibida por nueve productos finales del metabolismo de la glutamina: serina, alanina, glicina, AMP, CTP, triptófano, histidina, carbamil-fosfato y glucosamina-6-fosfato. Se ha descrito que cada uno de estos inhibidores disminuye la actividad GS parcialmente, de forma que deben unirse a ésta por lugares distintos, y diferentes además al sitio activo. Utilizando todos estos inhibidores al mismo tiempo se llega a

alcanzar una actividad mínima, casi nula. Este comportamiento es conocido como 'inhibición por retroalimentación acumulativa' (Woolfolk y Stadtman, 1967). Sin embargo, gracias a estudios cristalográficos, ha sido posible determinar que ciertos inhibidores, concretamente alanina, serina y glicina, se unen a la GS en el mismo sitio al que se une el sustrato glutamato, mostrando un comportamiento competitivo por el sitio de unión (Liaw *et al.*, 1993). En cuanto a los nucleótidos, éstos se unen por un mismo lugar, el sitio de unión del cofactor ATP de la GS en estado deadenililado y unida a Mn^{2+} (Liaw *et al.*, 1994).

La modificación covalente por adenililación es realizada por la adenilil transferasa (AT) (codificada por el gen *glnE*) y provoca una mayor susceptibilidad de la GS a la inhibición por retroalimentación. La AT de *E. coli* cataliza tanto la adenililación de la GS como la deadenililación (Caban y Ginsburg, 1976). Por otro lado, pueden existir varios grados de adenililación de la GS, puesto que cada subunidad puede ser adenililada en su residuo Tyr-397, y como consecuencia, la GS puede mostrar diferentes grados de actividad (Chung y Rhee, 1984). La AT está compuesta por una única cadena polipeptídica de 115 kDa y es activada por ATP, L-glutamina y la proteína PII, mientras que es inhibida por 2-oxoglutarato (Caban y Ginsburg, 1976). La proteína PII, presente en bacterias, plantas y Archaea, ocupa un papel central en la coordinación de la regulación de la GS. Está codificada por el gen *glnB* en *E. coli* y es susceptible de ser modificada por uridililación/deuridililación mediada por la uridililtransferasa (UT/UR) o por unión de distintos compuestos (glutamina, ATP y 2-oxoglutarato) (Jiang *et al.*, 1998; Stadtman, 2001). En condiciones de exceso de nitrógeno en el medio, la PII libre interacciona con la AT promoviendo la adenililación de la GS y dando lugar a la GS-AMP inactiva. En condiciones de limitación de nitrógeno, la UT/UR, codificada por el gen *glnD*, uridilila a la PII encontrándose ahora en la forma PII-UMP. Esta forma promueve la actividad deadenililasa de la AT, que conlleva la deadenililación de la GS-AMP, activándose (Figura 4).

A nivel transcripcional, el sistema de regulación global del nitrógeno denominado "ntr" está compuesto por un sistema de dos componentes formados por la histidina quinasa NtrB y el regulador de respuesta NtrC. El sensor NtrB fosforila al regulador de respuesta NtrC. NtrB tiene además actividad fosfatasa, responsable de la desfosforilación de NtrC (Keener y Kustu, 1988). La proteína NtrC fosforilada activa la transcripción de genes entre los que se encuentra el gen *glnA*. A este nivel, PII interviene en la formación de los dos estados de la histidina quinasa, de forma que la PII, desprovista del grupo uridilo, se asocia directamente con NtrB, estimula la

actividad fosfatasa (Keener y Kustu, 1988) e inhibe la actividad quinasa (Jiang y Ninfa, 1999). Sin embargo, PII-UMP no tiene ningún efecto sobre NtrB.

La proteína PII pertenece a una superfamilia formada a su vez por dos familias de proteínas. La primera, GlnB-K, formada por GlnB, GlnK o similares, se encuentra en la mayoría de las bacterias y presenta una estructura homotrimérica. La segunda, Nifl, formada por Nifl₁ y Nifl₂, se encuentra en Archaeas fijadoras de nitrógeno y algunas bacterias y presenta una estructura heteromultimérica. La familia más estudiada es GlnB-K, en la cual la interacción con las proteínas diana se lleva a cabo a través del lazo T de cada monómero. En este lazo también es donde tiene lugar la uridililación por la acción de la UT/UR (Jiang *et al.*, 1997).

2.3.1 Regulación de la GSI en cianobacterias

En cianobacterias, la regulación del metabolismo del nitrógeno se lleva a cabo a diferentes niveles. Por un lado, la entrada de compuestos nitrogenados al interior celular está finamente controlada en función de la disponibilidad de amonio en el medio. En presencia de amonio, los diferentes mecanismos de asimilación de otros compuestos nitrogenados son inhibidos. Este nivel de regulación requiere la metabolización del amonio a través del ciclo GS-GOGAT (Muro-Pastor *et al.*, 2001). Por otro lado, como ya se ha mencionado, este ciclo GS-GOGAT es el nexo de unión entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno por lo que requiere ser exhaustivamente regulado en función del balance C/N de la célula. La enzima GS es la diana de regulación del ciclo tanto a nivel transcripcional como postraducciona. La relación C/N no parece afectar a la actividad de la enzima GOGAT ni a la expresión de los genes que la codifican (Martín-Figueroa *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2001).

En cianobacterias, no existe un sistema de regulación transcripcional NtrBC como en otras bacterias. En este grupo, la expresión de la mayoría de los genes implicados en el metabolismo del nitrógeno está controlada por el factor transcripcional NtcA, descrito por primera vez en *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Vega-Palas *et al.*, 1990) y ampliamente distribuido en cianobacterias (Frías *et al.*, 1993; Herrero *et al.*, 2001). NtcA está codificada por el gen *ntcA* y pertenece a la familia de reguladores transcripcionales CRP (cAMP Receptor Protein). Es una proteína dimerica de 50 kDa, cuyo monómero está compuesto por 222-225 aminoácidos y contiene un dominio hélice-vuelta-hélice (HTH) de unión a ADN en el extremo carboxilo terminal que se encuentra altamente conservado (Herrero *et al.*, 2001). NtcA reconoce una secuencia

palindrómica de ADN constituida por GTAN₈TAC, en el que los dos nucleótidos extremos de cada triplete (subrayados) son los responsables del reconocimiento (Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002a). La presencia de modificaciones en la secuencia consenso implica un cambio en la afinidad de NtcA por el promotor. La localización del sitio de unión de NtcA en el promotor varía en función de si NtcA ejerce como activador o represor. Así, el sitio de unión centrado en la posición -41.5 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSP, *transcription start point*) provoca un aumento de la afinidad de la ARN polimerasa por el promotor y favorece la formación del complejo abierto. Cuando NtcA actúa como represor, como es el caso de los genes *gifA* y *gifB* de *Synechocystis* (García-Domínguez *et al.*, 2000) o *gor* y *rbcL* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Jiang *et al.*, 1995; Ramasubramanian *et al.*, 1994), el sitio de unión de NtcA se localiza entre las posiciones -40 y +20 bloqueando el acceso de la ARN polimerasa al promotor (García-Domínguez *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2001). NtcA regula la expresión de un gran número de genes en función de las condiciones nitrogenadas de la célula, que han sido estudiados principalmente en las cianobacterias *Anabaena* sp. PCC 7120, *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* (revisado en Flores y Herrero, 2010). Estos genes codifican proteínas que participan tanto en el transporte de compuestos nitrogenados al interior celular como en su metabolización.

El gen *glnA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta cuatro promotores diferentes (P₁, P₂, P₃ y P₄) que generan varios transcritos. La abundancia de cada uno de ellos viene determinada por la influencia de NtcA, y por tanto de las condiciones nitrogenadas del medio. La activación de P₁ es dependiente de la unión de NtcA a su secuencia. Esta unión interfiere en la transcripción del gen a partir de los promotores P₂, P₃ y P₄, indirectamente regulados por NtcA (Valladares *et al.*, 2004).

La regulación por nitrógeno también afecta a la expresión de los genes *glnA* y *glnN* (GSI y GSIII) en *Synechocystis*. En este organismo, se ha identificado un sitio de unión a NtcA en el promotor de *glnA*, cuya expresión se activa en ausencia de amonio en el medio (Reyes *et al.*, 1997) (Figura 6).

Como se ha mencionado anteriormente, los mecanismos de regulación de la GSI más estudiados a nivel postraducciona son la inhibición por retroalimentación negativa o la modificación covalente de la enzima mediante adenilación, presentes en bacterias (Leigh y Dodsworth, 2007; Reitzer, 2003). En cianobacterias se ha descrito un nuevo mecanismo de regulación postraducciona que implica la unión proteína-proteína de la GSI con dos péptidos de pequeño tamaño denominados factores inactivantes IF7 e IF17, en función de las condiciones nitrogenadas del medio (García-

Domínguez *et al.*, 1999) (Figura 5). En *Synechocystis*, la adición de amonio a un cultivo con nitrato como fuente de nitrógeno provoca una rápida disminución de la actividad GS (Mérida *et al.*, 1991b). Esta disminución de actividad no implica una reducción del nivel de proteína GSI y además revierte cuando se elimina el amonio del medio. Cuando las células crecen en un medio carente de nitrógeno combinado (-N), la velocidad de inactivación de la GS por amonio es menor. Esto se debe a que tras la adición de amonio es necesaria la disminución de la concentración celular de 2-oxoglutarato, molécula que percibe el estado nitrogenado de la célula (Muro-Pastor *et al.*, 2001), y a que la concentración de esta molécula es siete veces mayor en células sometidas a limitación de nitrógeno (Mérida *et al.*, 1991a).

Se ha demostrado *in vivo* que la GS no es regulada por mecanismos de inhibición por retroalimentación ni modificación covalente, y muestra la misma afinidad por cationes divalentes, amonio, ATP o glutamato (necesarios para la actividad biosintética) en su forma inactiva en relación con la forma activa de la enzima. Sin embargo, la forma inactiva muestra una velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) menor que la forma activa. Por otro lado, la forma inactiva de la GS puede ser reactivada *in vitro* por tratamientos con solventes orgánicos, por incremento de la concentración salina o por aumento del pH. Estos datos sugieren que el mecanismo de regulación por los factores inactivantes está basado en una interacción de tipo electrostático (Mérida *et al.*, 1991b).

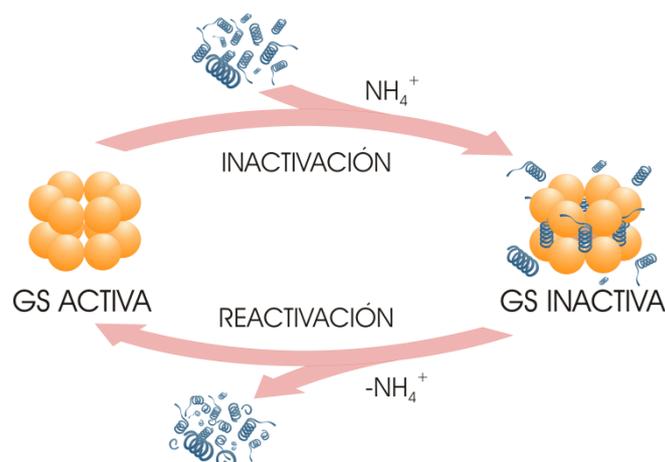


Figura 5. Representación esquemática del proceso de inactivación/reactivación de la GSI mediada por amonio.

Los factores inactivantes IFs (Inactivating Factors) IF7 e IF17 son polipéptidos de aproximadamente 7 y 17 kDa de masa molecular y están codificados por los genes *gifA* y *gifB*, respectivamente. Ensayos de actividad *in vitro* con proteínas purificadas han permitido demostrar que cada uno de los IFs es capaz de inactivar completamente a la GSI. A nivel estructural se ha descrito que IF7 pertenece a la categoría de proteínas intrínsecamente desplegadas en su conformación nativa *in vitro* (Muro-Pastor *et al.*, 2003).

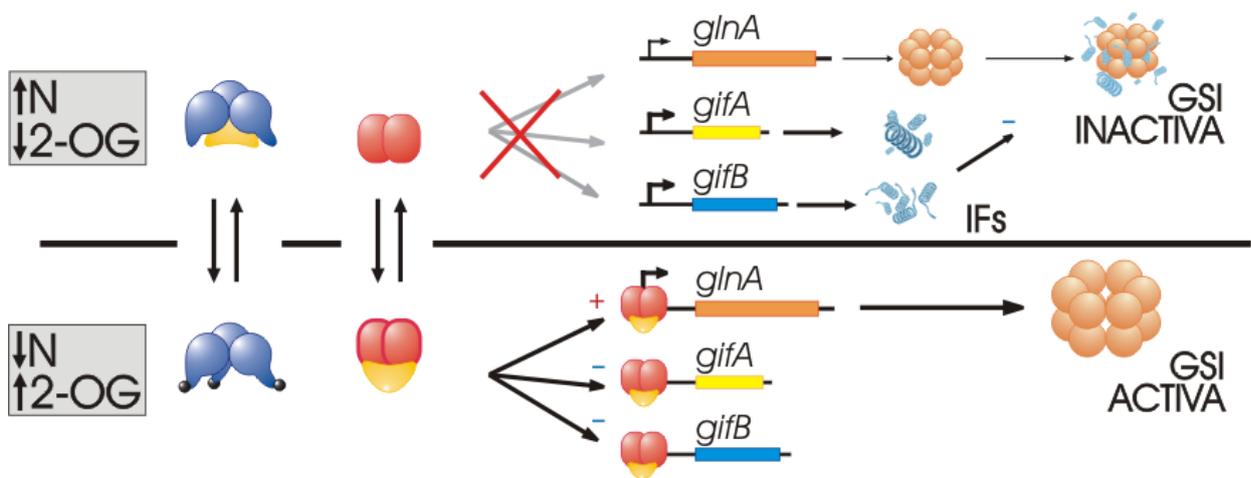


Figura 6. Modelo de regulación de la GSI en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

En condiciones de bajos niveles de 2-oxoglutarato (cuando existe un exceso de nitrógeno) NtcA (pareja de esferas rojas) está inactiva y PipX (medias lunas amarillas) está unida a la PII (gotas triméricas azules). NtcA inactiva es incapaz de unirse a los genes a los que regula de forma que la expresión de los genes *gif* deja de estar reprimida, los IFs se sintetizan y la GS está inactiva. En cultivos con limitación de nitrógeno, la PII está fosforilada (esferas negras) y los niveles elevados de 2-oxoglutarato incrementan la unión entre PipX y NtcA, la cual se encuentra ahora en su estado activo. Esto conlleva la represión de la expresión de los genes *gif* y la inducción de la expresión del gen *glnA*. Los elementos que actúan positivamente se indican como (+) y negativamente como (-). El estado nitrogenado se indica como ↑ N para una situación de exceso de nitrógeno y ↓ N para una situación de carencia de este elemento. La concentración celular de 2-oxoglutarato en las diferentes situaciones se indica como ↑ 2-OG cuando la concentración celular es elevada o ↓ 2-OG cuando la concentración es baja. Los tamaños de la GSI son relativos a la concentración celular de la misma.

Los genes *gif* son regulados a su vez en función de la disponibilidad de nitrógeno. Así, cuando añadimos amonio al medio, la expresión de estos genes incrementa de forma rápida y transitoria, lo que se traduce en la síntesis de los IFs, su

interacción con la GSI y la inactivación de la misma. La regulación transcripcional de los genes *gif* viene dada por la unión de NtcA en sitios consenso de unión localizados en las posiciones -30.5 para el gen *gifA* y -7.5 para el gen *gifB*. En deficiencia de nitrógeno, NtcA se encuentra activando la expresión del gen *glnA* y reprimiendo la expresión de los genes *gif*, lo que implica un aumento de GSI celular en su forma activa. En cambio, en presencia de amonio en el medio, NtcA es incapaz de unirse a los promotores a los que regula, provocando la pérdida de represión de los genes *gif* y la disminución de la expresión del gen *glnA*, situación que conlleva una disminución de la concentración celular de GSI, que además se encuentra en su forma inactiva (Figura 6).

La proteína PII presente en cianobacterias pertenece a la familia de las GlnB-K y se modifica por fosforilación de una serina (Ser-49) localizada en el T-loop (Forchhammer *et al.*, 1995). Su actividad, al igual que ocurre en la PII de enterobacterias, depende de la unión sinérgica de ATP y 2-oxoglutarato. En condiciones de exceso de nitrógeno, la PII desfosforilada interacciona con sus proteínas diana, entre las que se encuentra la proteína activadora de NtcA, PipX. PipX unida a la PII es incapaz de interactuar con NtcA, y como consecuencia, NtcA no puede actuar como regulador transcripcional. En la interacción entre PipX y PII no afecta el grado de fosforilación de la PII. Sin embargo, el incremento de concentración intracelular de 2-oxoglutarato y ATP dificulta la formación del complejo PII-PipX (Espinosa *et al.*, 2006). Por tanto, en condiciones de limitación de nitrógeno, la alta concentración de 2-oxoglutarato y ATP impide la interacción de la PII con PipX. Recientemente se ha demostrado que PII es esencial en las cianobacterias y que el gen *pipX* es diana de mutaciones supresoras en cultivos deficientes en PII (Espinosa *et al.*, 2009). Por otro lado, la interacción de PipX con NtcA es dependiente de 2-oxoglutarato (Espinosa *et al.*, 2006). NtcA unido a PipX se encuentra en su estado activo, pudiendo así modular la expresión de los genes a los que regula (Figura 6).

Se han identificado genes ortólogos a los genes *gif* en varios genomas de cianobacterias, lo que sugiere que el control de la actividad de la GSI mediante factores inactivantes descrito en *Synechocystis* puede extenderse a otros miembros del phylum. El análisis secuencial de estas ORFs permite establecer varios grupos de organismos en función del número o tipo de factor inactivante que presenten. Así, podemos observar que la mayoría de las cianobacterias estudiadas poseen un único factor inactivante, similar a IF7, como es el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120 o *A. variabilis*, en cuyos casos se ha denominado IF7A. Otras, en cambio, presentan como factor inactivante uno o varios IF17. Podemos destacar *Thermosynechococcus*

elongatus, que presenta dos ORFs que codifican dos proteínas tipo IF17. *Synechocystis* es la única cianobacteria donde se han encontrado ORFs para los dos tipos de factores inactivantes, IF7 e IF17 (Muro-Pastor *et al.*, 2005).

El mecanismo de reactivación de la GS de *Synechocystis* tras eliminar el amonio del medio ha sido estudiado tanto *in vitro* como *in vivo* (Galmozzi *et al.*, 2007). La adición de amonio en el medio implica un rápido incremento de los niveles de ARNm de los genes *gif*, que se traduce en la acumulación de las proteínas IF7 e IF17. En cambio, la acumulación de estos IFs es casi indetectable 30 minutos después de eliminar el amonio. Mediante el estudio de estirpes en las que la transcripción de los genes *gif* es independiente de la fuente de nitrógeno del medio se comprobó que la acumulación de IF17 es dependiente de las condiciones nitrogenadas, presentando una mayor estabilidad en presencia de amonio (Galmozzi *et al.*, 2007). La estabilidad de IF7, en cambio, no depende de la presencia de amonio o nitrato en el cultivo. Por otro lado, el uso de lincomicina, inhibidor de la síntesis de proteínas, en células cultivadas en diferentes fuentes de nitrógeno indica que el mecanismo que regula la estabilidad de los IFs es dependiente de amonio.

Para el análisis de la estabilidad de los factores inactivantes *in vitro*, se estudió la reactivación de la GS y la acumulación de los IFs en extractos crudos en diferentes condiciones. Los resultados permitieron determinar que la actividad proteolítica responsable de la degradación de IF7 es más efectiva a pH 8.5 mientras que IF17 no es degradada a pH 7.0 ó pH 8.5. A pesar de la presencia de proteína IF17 en el extracto crudo a pH 8.5, el complejo GS/IF17 es inestable y no detectable. Mientras que IF7 e IF17 son degradados rápidamente *in vivo* tras la eliminación de amonio en el medio, no se han podido reproducir *in vitro* las condiciones que provocan la degradación de IF17. Utilizando diferentes inhibidores de proteasas así como estirpes mutantes de *Synechocystis* carentes de algunas proteasas se determinó que IF7 es degradada por metalopeptidasas y que la proteasa Prp1/Prp2 participa en dicha degradación. Usando la estirpe mutante $\Delta glnA$ de *Synechocystis*, se describió que a pesar de la alta expresión de los genes *gif* en presencia de amonio, IF7 e IF17 son notablemente más inestables en ausencia de GSI. Esto indica que la presencia de la proteína diana GSI juega un papel crucial en la estabilidad de IF7 e IF17 (Galmozzi *et al.*, 2007).

3. ESTUDIOS ESTRUCTURALES DE LAS GLUTAMINA SINTETASAS

3.1 Glutamina sintetasa de tipo I

La glutamina sintetasa de tipo I es típicamente procariota y está formada por 12 subunidades de aproximadamente 53 kDa organizadas en dos anillos hexaméricos superpuestos con una masa molecular nativa de unos 636 kDa (Stadtman y Ginsburgs, 1974). La primera estructura resuelta mediante cristalografía y difracción de rayos X de la GSI fue obtenida a una resolución de 3.5 Å (Almassy *et al.*, 1986) y fue posteriormente mejorada mediante refinamiento y recolección de nuevos datos de difracción hasta 2.5 Å (Gill *et al.*, 2002) (Figura 7). Estos primeros estudios estructurales de la GS se realizaron a partir de una estirpe mutante de *Salmonella typhimurium*, incapaz de inactivar a la GS mediante adenililación, para evitar así la heterogeneidad de las diferentes formas modificadas de la enzima. Posteriormente, se usaron técnicas de expresión heteróloga en una estirpe de *E. coli* auxótrofa para glutamina, YMC21 (Chen *et al.*, 1982), que puede ser modificada para la expresión de GS completamente adenililada o completamente no-adenililada. El mismo sistema recombinante sirvió para la expresión de la GSI de *Mycobacterium tuberculosis*, que se usó para la obtención de cristales a partir de los cuales se obtuvo la estructura a una resolución de 2.4 Å (Gill *et al.*, 1999) (Figura 7).

Las glutamina sintetasas bacterianas, al igual que la GSI de cianobacterias, son dodecámeros formados por dos anillos hexaméricos superpuestos, con doce sitios activos formados entre monómeros de un mismo anillo (Almassy *et al.*, 1986). Cada sitio activo ha sido descrito como un *bifunnel* o doble embudo, en donde el ATP y el glutamato se unen por extremos opuestos (Figura 8). El ATP se une al sitio activo por la parte superior de un doble embudo, que corresponde al extremo abierto hacia la parte externa de la superficie de la GS. La parte central del doble embudo corresponde a sitios de unión de dos cationes divalentes, n1 y n2, separados por 6 Å, donde se unen el Manganeso o Magnesio para la catálisis. El ión n2 está involucrado en la transferencia del grupo fosforilo (Hunt *et al.*, 1975), mientras que el n1 estabiliza la GS en estado activo y participa en la unión al glutamato (Shapiro y Ginsburg, 1968). La afinidad de la GSI bacteriana por los cationes en n1 es 50 veces mayor que la del sitio n2 y esta diferencia se debe a la presencia a una fuerte carga negativa en las inmediaciones del sitio n1 en la parte superior del doble embudo (Gill *et al.*, 2002).

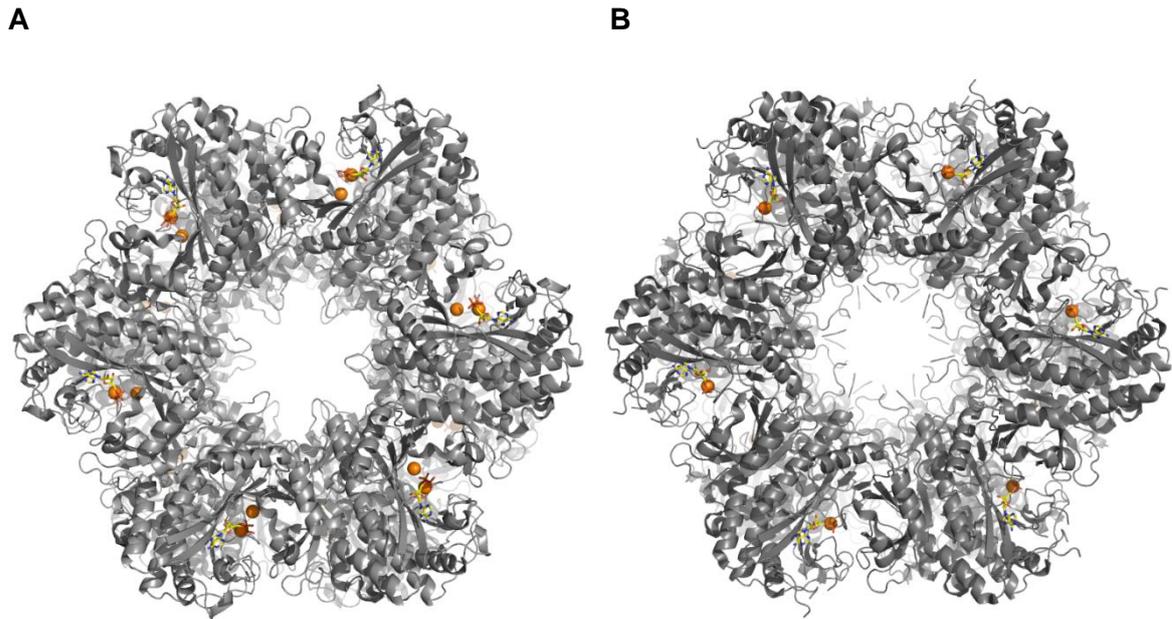


Figura 7. Estructuras de las glutamina sintetasas de *Salmonella typhimurium* (A) y *Mycobacterium tuberculosis* (B).

Vista superior del dodecámero. Los archivos PDB (1F52.pdb y 1HTO.pdb, respectivamente) que se han utilizado para esta figura han sido obtenidos de la Base de Datos de Proteínas (Protein Data Base). Estas estructuras han sido resueltas a 2.5 y 2.4 Å (Gill y Eisenberg, 2001; Gill *et al.*, 2002). Los iones de Manganeso están representados como esferas de color naranja. En el sitio activo de la GSI de *S. typhimurium* se encuentra unida una molécula de ADP. En el sitio activo de la GSI de *M. tuberculosis* se encuentra unida una molécula de AMP.

La unión entre los dos anillos hexaméricos de la GS se mantiene por fuerzas hidrofóbicas y por puentes de hidrógeno. La hélice presente en el extremo amino terminal se encuentra situada por encima del anillo y está expuesta al solvente, mientras que la hélice del extremo carboxilo terminal está inserta en un bolsillo hidrofóbico localizado en la subunidad adyacente del anillo opuesto. Por otro lado, el canal central del dodecámero está revestido por 6 cadenas β que entrelazan los dos anillos de la enzima. De esta forma, las 6 cadenas β y los extremos carboxilo terminal confieren adhesión al dodecámero (Eisenberg *et al.*, 2000).

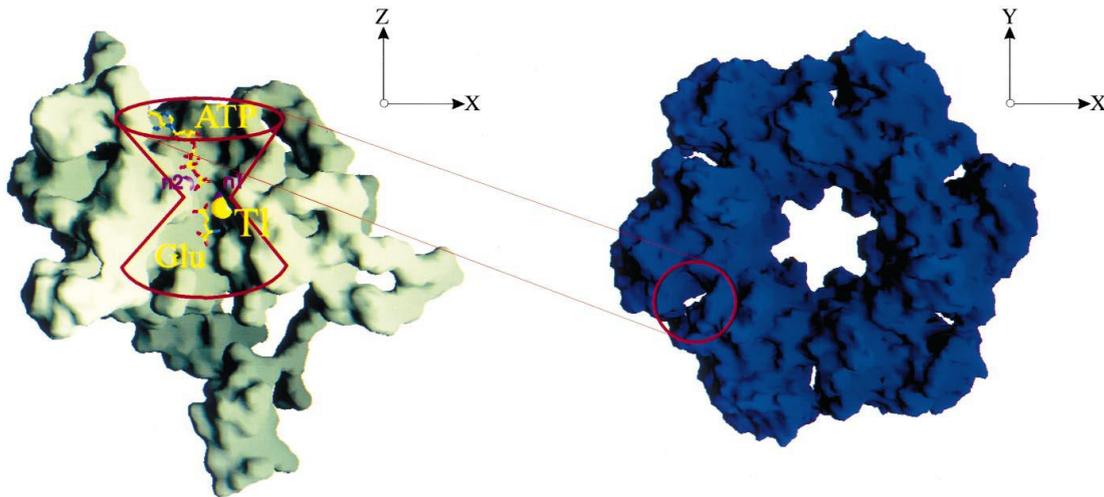


Figura 8. Sitio activo de la glutamina sintetasa bacteriana.

A la derecha se representa uno de los dos anillos que constituyen la GS bacteriana completa. A la izquierda se muestra una subunidad de la enzima. Para la mejor visualización del sitio de unión a glutamato, el lazo del Glu327 no se ha incluido en el esquema. El dodecámero posee 12 sitios activos localizados entre subunidades de un mismo anillo. Cada uno de ellos consiste en un doble embudo, con una entrada superior y otra inferior por donde tienen acceso el ATP y el glutamato, respectivamente. La zona protuberante inferior corresponde al extremo carboxilo terminal (residuos 401-468) de una subunidad. El doble embudo tiene unos 30 Å de ancho en las entradas, 15 Å de ancho en la zona central y 45 Å de largo. Los sitios de unión a cationes (n1 y n2) están separados por 6 Å de longitud, y se localizan entre los dos embudos. Para determinar el sitio de unión del amonio en el sitio activo se ha usado el análogo Talio⁺ (Tl⁺). La distancia entre n1 y el sitio de Tl⁺ es de 4 Å, mientras que entre n2 y Tl⁺ es de 7 Å. Imagen obtenida de Eisenberg *et al.*, 2000.

Tras conocer la estructura de la GS, se ha propuesto la participación de varios lazos en la reacción biosintética de esta enzima. El primero, formado por los residuos 156-173, sobresale en el canal central del dodecámero y es un sitio de proteólisis (Lei *et al.*, 1979) y ADP-ribosilación (Moss *et al.*, 1990). Otro lazo, denominado lazo de adenilación, contiene el residuo Tyr397, y es modificado covalentemente por adición de AMP (Shapiro y Stadtman, 1968). Este lazo se encuentra en la entrada inferior del *bifunnel*. Como último ejemplo podemos nombrar los lazos del Glu327 o el de la Asn264, localizados cerca del sitio por donde el glutamato entra al doble embudo. Estos lazos intervienen en la catálisis de la GS (Gill *et al.*, 2002) (ver apartado 3.1).

3.1.1 Relación entre la estructura y la función de la GSI

El estudio cristalográfico de la GS ha permitido identificar diferentes cambios estructurales que sufre la proteína a lo largo de su reacción enzimática. Concretamente, los residuos del sitio activo, ampliamente conservados en glutamina sintetasas eucariotas y procariotas, han sido estudiados a partir de GS cocrystalizada con ligandos (Liaw *et al.*, 1993; Gill *et al.*, 2002; Liaw y Eisenberg, 1994; Liaw *et al.*, 1994). Estos residuos juegan un papel fundamental en la catálisis o en la unión a sustrato u otros ligandos. En la tabla 2 se muestran todos los residuos del sitio activo, incluyendo su participación en la reacción biosintética de la GS bacteriana y el aminoácido homólogo presente en la GSI de *Synechocystis*.

Como se ha comentado anteriormente, la GS está sujeta a regulación mediante inhibición por retroalimentación por productos del metabolismo de la glutamina, que actúan de forma acumulativa o competitiva. La inhibición competitiva de ciertos inhibidores, concretamente alanina, serina y glicina, ha sido descrita gracias a estudios cristalográficos, en los que se demostró que dichos metabolitos se unen a la GS en el mismo sitio al que se une el glutamato. Para ello, se cocrystalizó la GS con los diferentes inhibidores, trabajo que se completó con ensayos de actividad GS *in vitro*, tanto transferasa como biosintética. Así, aunque no se descarte la posibilidad de la inhibición acumulativa, se ha comprobado que existe una inhibición competitiva por el sitio activo (Liaw *et al.*, 1993).

Los estudios cristalográficos han permitido describir en detalle la reacción biosintética de la GS bacteriana, que puede resumirse en una serie de movimientos de lazos o cadenas laterales, dando lugar a estados intermedios estructurales (Eisenberg *et al.*, 2000). La reacción enzimática consiste en:

- a. Una molécula de ATP se une al sitio activo entrando por la parte superior del doble embudo, quedando su grupo fosfato terminal unido al sitio n1 adyacente. La unión del ATP provoca el movimiento del lazo Asp50, haciendo que la cadena lateral del Asp50 se coloque en la posición donde se unirá posteriormente el ión amonio. El Asp359 se mueve también hacia la posición donde el grupo γ -carboxilato del glutamato se unirá inmediatamente después. Estos dos movimientos incrementan la afinidad en la unión con glutamato y el amonio.
- b. El glutamato entra en la cavidad desde la parte inferior del *bifunnel* quedándose por encima del lazo Glu327, también denominado 'tapa Glu327', y su grupo γ -

carboxilato se une al sitio n2 adyacente. Ahora el sitio activo está cerrado por la tapa Glu 327 y protegido de la entrada de agua.

- c. El γ -fosfato del ATP se transfiere al γ -carboxilato del glutamato formando una molécula intermediaria γ -glutamil fosfato. Las dos cargas positivas de los cationes divalentes junto con la Arg339 participan en la transferencia del grupo fosforilo gracias a la polarización del γ -fosfato del ATP.
- d. El ión amonio entra en el doble embudo y se une a un bolsillo cargado negativamente formado por Glu327, Asp50, Tyr179, Glu212 y Ser53.
- e. La cadena lateral del Asp50 desprotona al amonio formando amoniaco.
- f. El amoniaco ataca al carbono- δ del intermediario, liberando un grupo fosfato. Se forma así un puente salino entre el intermediario y el Glu327.
- g. El Glu327 acepta un protón desde el intermediario neutralizando el puente salino y formando glutamina.
- h. Y por último, la tapa Glu327 se abre y la glutamina es liberada.

Residuo (GSI de <i>Salmonella</i>)	Aportación en la reacción biosintética	Residuos (GSI de <i>Synechocystis</i>)
Asp50	Desprotona el amonio e incrementa la afinidad en la unión con éste.	Asp53
Ser53	Incrementa la estabilidad entre subunidades por interacción con Glu327.	Ser56
Asp64	Incrementa la estabilidad entre subunidades por interacción con Arg344.	Asp67
Glu129	Coordina el ión n2 y el puente de hidrógeno con His271.	Glu132
Glu131	Coordina el grupo amino del glutamato y el ión n1.	Glu134
Tyr179	Coordina el ión amonio.	Tyr182
Glu212	Coordina el ión amonio y el ión n1.	Glu215
Glu220	Coordina el ión n1.	Glu223
Asn264	Coordina el grupo amino del glutamato.	Asn267
Gly265	Coordina el grupo amino del glutamato.	Gly268
His269	Coordina el ión n2.	His272
His271	Coordina el grupo α -fosfato del ADP/AMPPMP y Glu129.	His274
Arg321	Coordina el grupo γ -carboxilato del glutamato.	Arg324
Glu327	Estabiliza el intermediario tetraédrico en el estado de transición. Acepta el protón desde éste para generar glutamina. Cierra el sitio activo y protege al intermediario de hidrólisis.	Glu330
Arg339	Induce estabilidad entre subunidades por interacción con Asp50.	Arg342
Arg344	Coordina el β -fosfato del ADP/AMPPMP	Arg347
Glu357	Coordina el ión n2 y la Arg344	Glu361
Arg359	Coordina el grupo γ -carboxilato del glutamato.	Arg363
Tyr397	Sitio de adenililación (no ocurre en cianobacterias).	Tyr401

Tabla 2. Residuos conservados que se encuentran en el sitio activo de la GS.

Se muestran los residuos del sitio activo presentes en la GS de *Salmonella typhimurium* y sus respectivos residuos homólogos en la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Adaptado de Eisenberg *et al.*, 2000.

3.2 Glutamina sintetasa de tipo II

La glutamina sintetasa de tipo II está presente en eucariotas y se compone de 10 subunidades de aproximadamente 40 kDa organizadas en dos anillos pentaméricos superpuestos (Unno *et al.*, 2006; Krajewski *et al.*, 2008).

3.2.1 Glutamina sintetasa de tipo II de plantas

Las plantas presentan dos tipos de GSII, la GS1 localizada en el citosol y la GS2 que se encuentra en cloroplastos. La GS1 está codificada por una familia multigénica pequeña, y los miembros de la familia GS1 han sido catalogados en función de su actividad en respuesta al estado nitrogenado externo, de propiedades enzimáticas así como de la estabilidad térmica. El maíz presenta 5 proteínas GS1a (GS1a-GS1e), de las cuales las más representativas y mejor caracterizadas son la GS1a y GS1d, que muestran una alta identidad de secuencia (86 %) a pesar de presentar diferencias en cuanto a estabilidad (Sakakibara *et al.*, 1996).

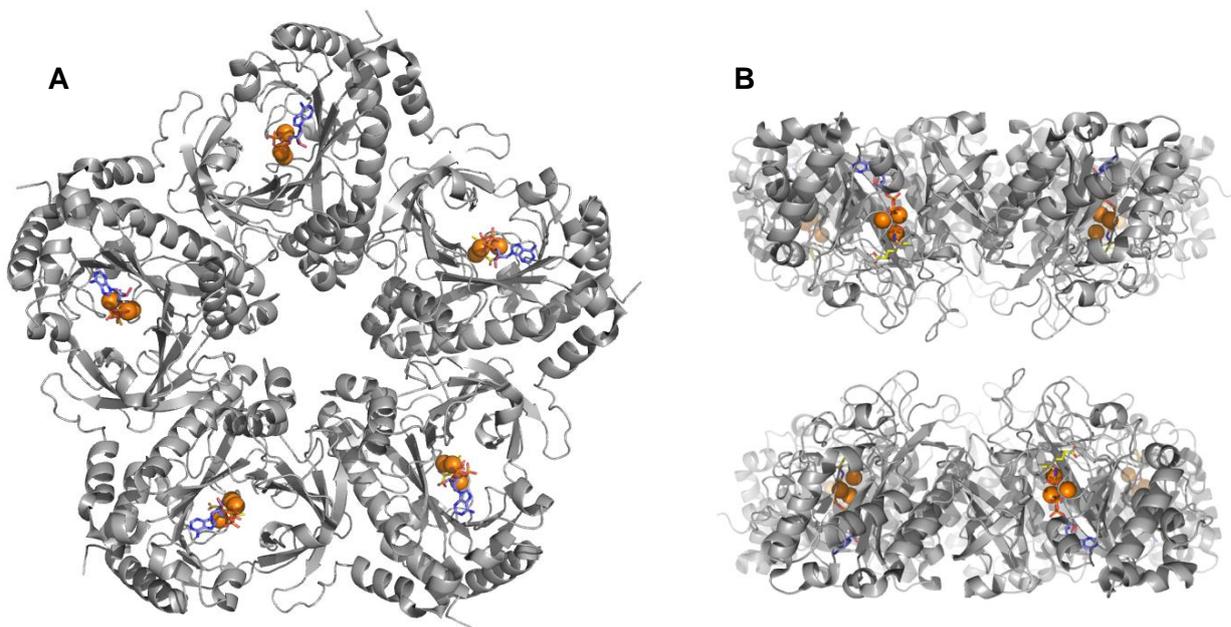


Figura 11. Estructura de la GS1a de *Zea Mays L.*

A. Vista superior del decámero. B. Vista lateral de los anillos de la enzima. El archivo PDB (2D3A.pdb) que se ha utilizado para esta figura ha sido obtenido de la Base de Datos de Proteínas (Protein Data Base). Esta estructura ha sido resuelta a 2.63 Å (Unno *et al.*, 2006). En el cristal utilizado se cocrystalizó la GS1a de maíz junto con ADP, Mn^{2+} y L-methionine-S-sulfoximine phosphate (MSX-P). Los iones de Manganeso están representados como esferas de color naranja. El ADP y MSX-P están representados como bastones en los que el carbono está coloreado en amarillo (MSX-P) o azul (ADP).

El estudio de la GS1a mediante microscopía electrónica parecía indicar que la GS eucariota estaba formada por dos anillos tetraméricos superpuestos (Tsuprun *et al.*, 1980). Sin embargo, el estudio cristalográfico de la GS1a de maíz en presencia de Mn^{2+} , ADP y glutamato ha permitido determinar que esta enzima está compuesta de

10 subunidades organizadas en dos anillos pentaméricos (archivo 2D3A.pdb) (Unno *et al.*, 2006) (Figura 10).

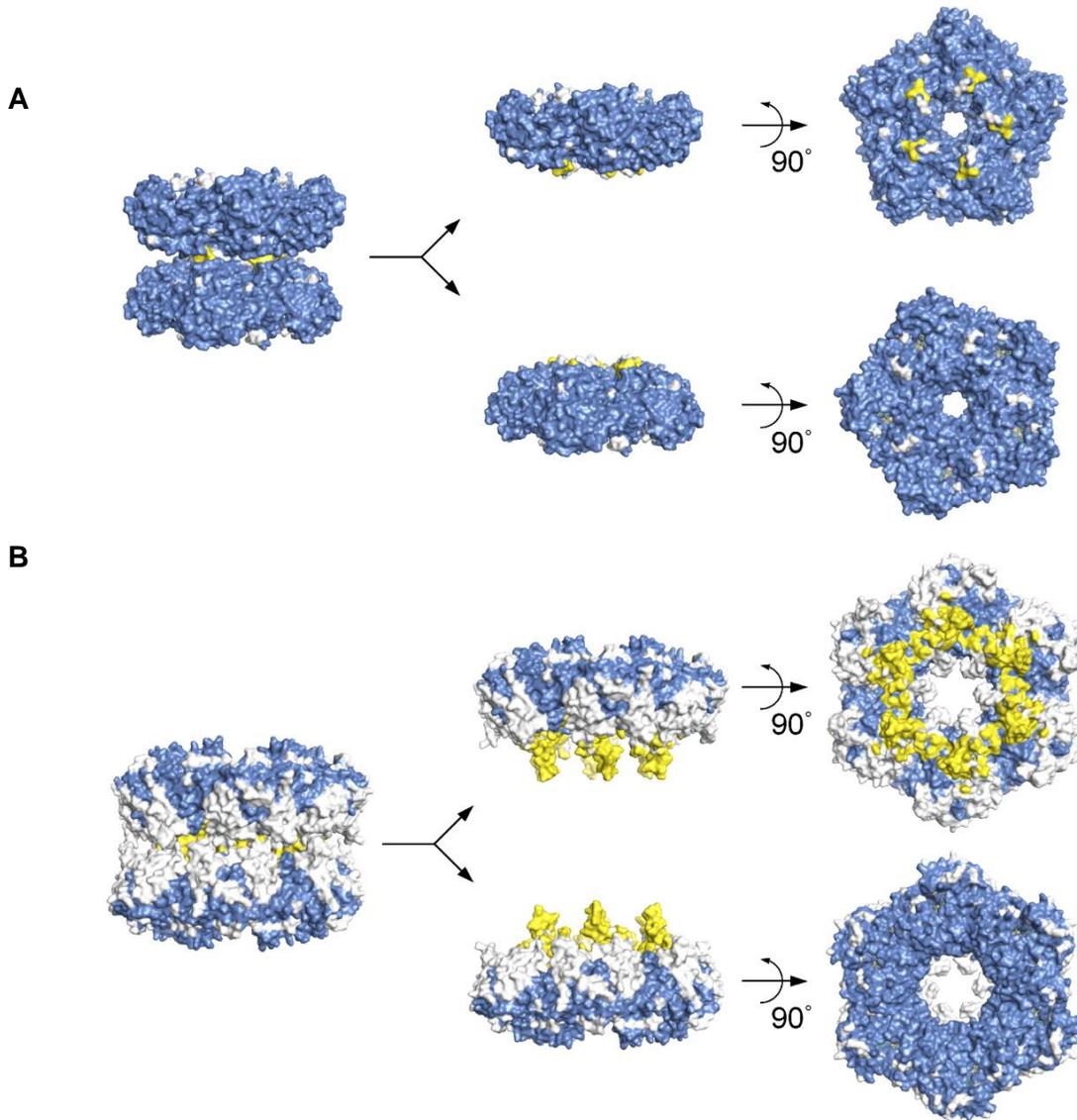


Figura 10. Comparación de las estructuras oligoméricas de las glutamina sintetasas de maíz (A) y de *Mycobacterium tuberculosis* (B).

La estructura original está separada gráficamente en dos anillos para mostrar una visión lateral de ambos. Cada anillo está rotado 90° para mostrar las superficies internas y externas. En comparación con las estructuras primarias de la GS1a de *Zea mays* L. y la GS de *Mycobacterium tuberculosis*, las regiones presentes en ambas enzimas están coloreadas en azul y las regiones de intersección únicas en cada GS están coloreadas en blanco. Los residuos localizados en el área de contacto entre los dos anillos están coloreados en amarillo. Imagen obtenida de Unno *et al.*, 2006.

La estructura de la subunidad de la GS1a de maíz difiere con respecto a la obtenida para la GS de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 10). En la primera, cada

subunidad consiste en un pequeño extremo amino terminal que abarca desde el residuo 1 hasta el 103, y un gran extremo carboxilo terminal, que comprende desde el residuo 104 hasta el 356. El extremo amino terminal de una subunidad y el dominio carboxilo terminal de la subunidad vecina forman el sitio activo. El extremo carboxilo de la subunidad de la GS bacteriana (residuos 393-478), que participa en el proceso de adenilación y contribuye a mantener las interacciones hidrofóbicas entre los dos anillos hexaméricos, no está presente en la GS1a. Por otro lado, los residuos 143-154 de la GS bacteriana que participan en la unión entre los anillos hexaméricos tampoco están presentes en la GS1a de maíz. A pesar de las diferencias encontradas entre ambas estructuras, los residuos que participan en la unión con el sustrato y con los cationes divalentes están conservados, permitiendo que el mecanismo enzimático sea similar al descrito en el apartado 3.1.1 para la GS bacteriana. En el sitio activo de la GS1a de plantas están presentes tres iones de manganeso, coordinados por los residuos Glu131, Glu192 y Glu199 para el caso del Mn-n1, los residuos Glu129, His249 y Glu330 para el Mn-n2, y los residuos Glu129 y Glu199 para el Mn-n3 (Unno *et al.*, 2006).

Una diferencia notable entre la GS bacteriana y la de plantas es la superficie de interacción entre los anillos superpuestos de ambas proteínas. Los anillos pentaméricos de la GS1a de maíz presentan una superficie de unión de 933 Å, 17 veces menor a la observada en la GS de bacterias (17238 Å). Además, la unión entre los anillos pentaméricos implica 4 interacciones hidrofóbicas y 2 puentes de hidrógeno, mientras que la GS bacteriana mantiene su estructura mediante 37 interacciones hidrofóbicas y 36 puentes de hidrógeno. Estas diferencias estructurales aparecen al comienzo de la historia evolutiva, lo que ha implicado un incremento en las diferencias fundamentales en la regulación de la actividad de la GS de tipo I y la de tipo II (Unno *et al.*, 2006).

3.2.2 Glutamina sintetasa de tipo II de mamíferos

La glutamina sintetasa de tipo II presente en mamíferos presenta diferentes funciones fisiológicas, dependiendo del tejido en el que se sintetice. La GS presente en el cerebro humano, por ejemplo, regula los niveles de toxicidad del amonio y convierte el neurotóxico glutamato en glutamina, inocua para la célula. La relación observada entre el nivel de esta enzima en cerebros de pacientes que padecen de Alzheimer y la gravedad de la enfermedad la hace una buena candidata para su estudio estructural y bioquímico (Gunnarsen y Haley, 1992).

Se ha determinado la estructura de la GS canina (*Canis familiaris*, nombrada de aquí en adelante CfGS) y humana (nombrada HsGS), en ausencia y presencia de varios metales, nucleótidos e inhibidores (Krajewski *et al.*, 2008) (Figura 11).

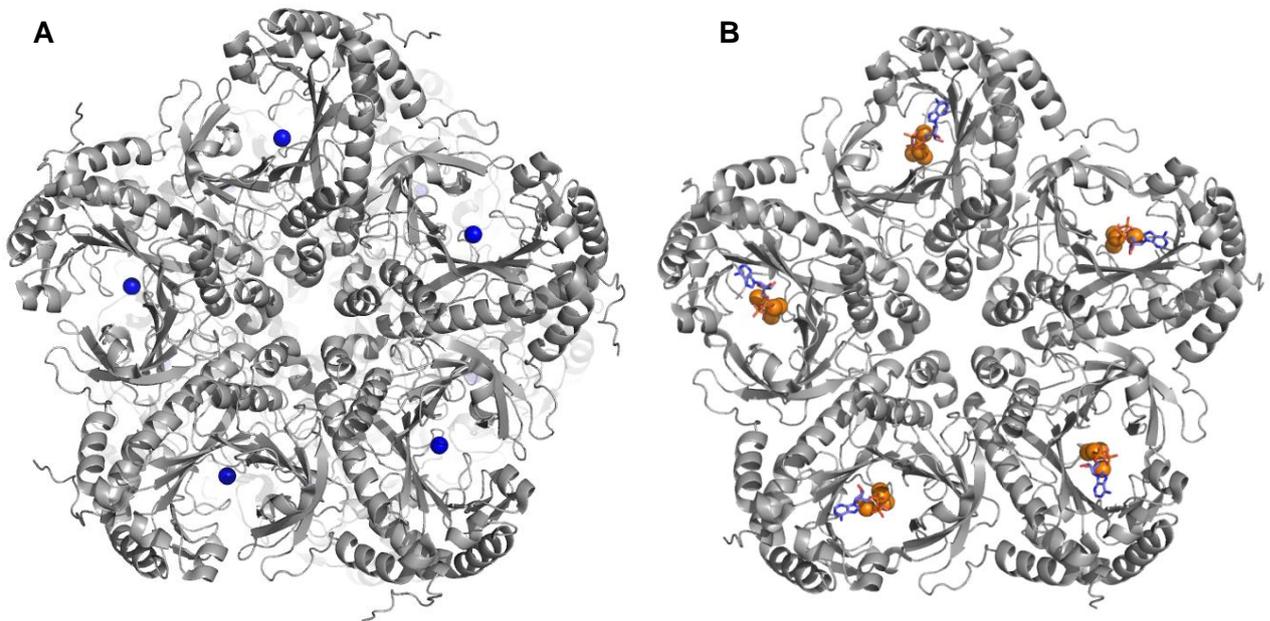


Figura 11. Estructura de la GS de tipo II de *Canis familiaris* (A) y *Homo sapiens* (B).

Los archivos PDB (2UU7.pdb y 2OJW.pdb, respectivamente) que se han utilizado para esta figura han sido obtenidos en la Base de Datos de Proteínas (Protein Data Base). Estas estructuras han sido resueltas a 3 Å y 2.05 Å, respectivamente (Krajewski *et al.*, 2008). En el caso de la GS de humanos, el cristal utilizado contenía ADP, Mn²⁺ y fosfato inorgánico (P_i). Los iones de Magnesio y Manganeso están representados como esferas de color azul y naranja, respectivamente. El ADP y P_i están representados como bastones en los que el carbono está coloreado en azul.

La estructura cristalográfica de la CfGS fue resuelta mediante reemplazamiento molecular usando la estructura ya resuelta de un pentámero de la GS de maíz, y fue refinada a una resolución de 3 Å (archivo 2UU7.pdb). La enzima está formada por dos anillos pentaméricos superpuestos; el sitio activo se encuentra entre dos subunidades de un mismo anillo. La estructura de cada subunidad consiste en un extremo amino terminal en forma serpenteada (residuos 3-24) junto con dos dominios compactos: la unidad amino terminal formada por los residuos 25-112, denominada dominio β-*grasp*, y el dominio catalítico localizado en el extremo carboxilo terminal (residuos 113-373). El extremo amino terminal contacta con la subunidad vecina en el núcleo del pentámero. Otras interacciones que ocurren entre el dominio β-*grasp* y el extremo carboxilo terminal estabilizan el pentámero. Por otro lado, los lazos compuestos por los

residuos 150-156 de cada unidad intervienen en las interacciones entre los dos anillos, que son de tipo van der Waals en su mayoría, con excepción de 10 puentes de hidrógeno. Cabe destacar que en la estructura de la CfGS sólo se ha encontrado densidad electrónica para un único ión Mg^{2+} en cada subunidad.

La estructura de HsGS se ha resuelto en presencia de Mn^{2+} , ADP y fosfato inorgánico (archivo 2OJW.pdb) y junto con L-metionina-S-sulfoximina fosfato (MSX-P), ADP y Mn^{2+} (archivo 2QC8.pdb) a una resolución de 2.05 Å y 2.6 Å, respectivamente. El compuesto MSX-P es un inhibidor de la GS que se une a ésta en el sitio de unión del glutamato e impide que se desarrolle la reacción enzimática. El dominio amino terminal de la HsGS interacciona con la hoja β del extremo carboxilo terminal de la subunidad adyacente, formando el doble embudo o *bifunnel* donde se encuentra el sitio activo (ver apartado 3.1.1). A diferencia de la GS canina, la HsGS se encuentra unida a tres cationes Mn^{2+} . Un ión Mn^{2+} adicional hace contacto con el Glu196 y el fosfato inorgánico.

La estructura de la HsGS presenta ciertas diferencias con respecto a la estructura de la GS de maíz. Ambas enzimas muestran una identidad de secuencia del 50 %. Además, el extremo N-terminal de la GS de mamíferos es ligeramente más largo que el correspondiente a la GS de maíz, lo que modifica la superficie de contacto entre subunidades. El área de contacto entre dos subunidades de la GS de mamíferos es 200 Å mayor a la equivalente en la GS de maíz. Esta diferencia conlleva un aumento en la estabilidad de la GS de mamíferos. Esta enzima además, presenta un dominio carboxilo terminal más largo, que se encuentra en la superficie de cada subunidad y está involucrado en la unión entre los pentámeros. A pesar de ello, no parece tener ningún efecto en la estabilidad y los contactos entre anillos de ambas GSs eucariotas son comparables. En cuanto a los sitios de unión a iones, la GS de maíz presenta tres iones Mn^{2+} en el sitio activo, cuya localización coincide con los sitios n1-n3 de la GS de mamíferos. Por otro lado, los residuos que constituyen el sitio activo están altamente conservados, incluyendo aquellos que interaccionan con el glutamato, con los cationes divalentes, con el ATP y con el amonio.

Tras comparar la estructura de la GS eucariota con la estructura de la GS bacteriana, ampliamente estudiada, apreciamos que la diferencia principal es el número de cadenas que forma cada anillo, siendo 5 en el caso de la GS de mamíferos y 6 en la GS bacteriana. Aunque ambas enzimas comparten un escaso 20 % de identidad de secuencia, sus sitios activos están fuertemente conservados. Los residuos que participan en la coordinación del MSX-P y los cationes divalentes están

conservados en ambas, incluyendo las posiciones relativas de los tres iones n1-n3. Sin embargo, no comparten la localización del sitio de unión al nucleótido. La diferencia fundamental entre la GS de eucariotas y la GS bacteriana es la superficie de contacto entre los anillos. Este hecho se debe a que la GS bacteriana presenta un dominio carboxilo terminal mayor, que se introduce en el interior de la subunidad del anillo adyacente, lo que hace que la unión entre anillos sea 10 veces más fuerte que en la GS eucariota. En cambio, el dominio N-terminal de la GS bacteriana es más corto que el presente en la GS eucariota, y además no interviene en la conexión entre subunidades del mismo anillo. Por último, la pérdida del sitio de adenilación en el extremo carboxilo terminal de la GS eucariota impide que se lleve a cabo un mecanismo de regulación comparable al de bacterias.

3.3 Glutamina sintetasa de tipo III

El estudio estructural de la glutamina sintetasa de tipo III, presente en cianobacterias, Bacteroidaceae, Clostridiaceae y Diatomeas, ha sido realizada mediante la técnica de tinción negativa en microscopía electrónica. La enzima utilizada fue la GSIII de *Bacteroides fragilis*, un patógeno anaeróbico oportunista de humanos. A pesar de las limitaciones que presenta el estudio estructural mediante microscopía, estos estudios permitieron describir la enzima como un dodecámero compuesto por subunidades de 82.7 kDa de masa molecular organizadas en dos anillos superpuestos (van Rooyen *et al.*, 2006) (Figura 12A).

La superfamilia de las GSs representa un grupo diverso de enzimas, con notables diferencias en cuanto a longitud de las subunidades de cada una de ellas. No obstante, todas ellas comparten 5 regiones homólogas que forman parte del sitio activo (Almassy *et al.*, 1986). Es por ello que el mecanismo catalítico es común para las enzimas de este grupo, comprobándose mediante análisis bioquímico. Particularmente, la GSIII requiere los mismos sustratos y cofactores, presenta los mismos perfiles cinéticos, y es inhibida por los mismos compuestos que la GSI y la GSII (Eisenberg *et al.*, 2000; García-Domínguez *et al.*, 1997).

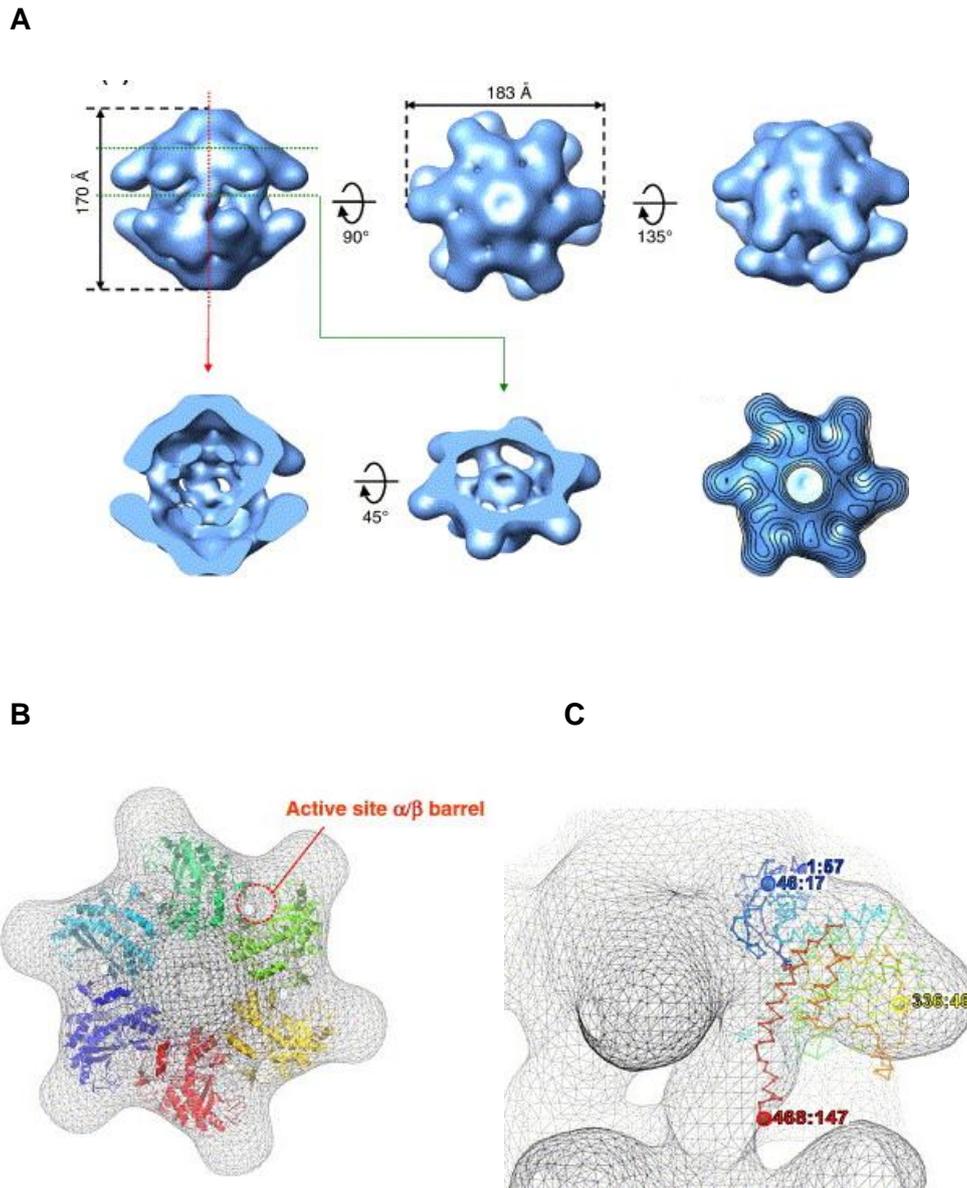


Figura 12. Estudio estructural de la GS de tipo III de *Bacteroides fragilis*.

Imágenes obtenidas de van Rooyen *et al.*, 2006. A. Reconstrucción de la GSIII mediante microscopía electrónica por tinción negativa. B y C. *Docking* de la estructura de la GSI de *E. coli* dentro del mapa de densidad de la GSIII de *B. fragilis* obtenido por microscopía electrónica. Los acoplamientos fueron realizados utilizando un anillo completo de la estructura de la GSI.

La comparación estructural entre la GSI y la GSIII se realizó mediante acoplamiento o *docking*, utilizando el mapa de densidad superficial de la GSIII obtenida por microscopía electrónica y un anillo hexamérico de la GSI de *E. coli* (van Rooyen *et al.*, 2006). Los extremos amino y carboxilo terminal de cada subunidad de la

GSI son notablemente más cortos que los de la subunidad de la GSIII. Esta diferencia se refleja en el *docking* de ambas enzimas, observándose grandes volúmenes de densidad que corresponden con los extremos de la GSIII de *B. fragilis* y que no se encuentran acoplados a la estructura de la GSI bacteriana (Figura 12B y C). El sitio activo de la GSIII, en cambio, se encuentra entre dos subunidades de un mismo anillo, compartiendo localización con el sitio activo de la GSI bacteriana.

Como se puede observar al comparar las secuencias aminoacídicas de las glutamina sintetasas de tipo I y III, la GSIII presenta una marcada divergencia evolutiva con respecto a la GSI bacteriana. Sin embargo, ha preservado la estructura dodecamérica de las GSIs así como la localización del sitio activo.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

A. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

1. Cianobacterias

1.1 Estirpes de cianobacterias

En este trabajo se han utilizado las cianobacterias siguientes:

- *Synechocystis* sp. PCC 6803, cianobacteria unicelular heterótrofa facultativa, no fijadora de dinitrógeno, perteneciente a la sección I de la clasificación taxonómica de las cianobacterias propuesta por Rippka *et al.* (1979). Las estirpes mutantes de *Synechocystis* se detallan en la tabla 3.
- *Anabaena variabilis* ATCC 29413, cianobacteria filamentosa fijadora de dinitrógeno, perteneciente a la sección IV de la clasificación taxonómica definida por Rippka.

1.2 Medios y condiciones de cultivo

El cultivo de las diferentes estirpes de cianobacterias se ha realizado en medio BG11 (Rippka *et al.*, 1979) compuesto por:

NaNO ₃	17.6 mM	Citrato férrico-amónico (17 % Fe)	6 mg/l
MgSO ₄	0.30 mM	MnCl ₂	9.1 µM
CaCl ₂	0.24 mM	Na ₂ -EDTA	2.4 µM
Na ₂ CO ₃	0.20 mM	Na ₂ MoO ₄	1.6 µM
K ₂ HPO ₄	0.20 mM	ZnSO ₄	0.8 µM
H ₃ BO ₃	46 µM	CuSO ₄	0.3 µM
Ácido cítrico	28.5 µM	CoCl ₂	0.2 µM

En este trabajo se ha utilizado BG11 suplementado con NaHCO₃ a una concentración de 12 mM al que se denomina BG11C. El medio BG11 se preparó a partir de una solución concentrada 100 veces, conteniendo todos los componentes excepto K₂HPO₄, NaHCO₃ y NaNO₃ que se añadieron al medio antes de ser esterilizado. La esterilización de los medios y de los materiales se llevó a cabo en autoclave a 120 °C de temperatura y 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 minutos.

Estirpe	Características	Referencia
SJCR3	<i>glnA::npt</i> , Km ^r	Reyes y Florencio, 1994
SIF	Δ <i>gifA::npt</i> , Km ^r	García-Domínguez <i>et al.</i> , 1999
LIF	Δ <i>gifB::cat</i> , Cm ^r	García-Domínguez <i>et al.</i> , 1999
SLIF	Δ <i>gifA::npt</i> , Δ <i>gifB::cat</i> , Km ^r , Cm ^r	García-Domínguez <i>et al.</i> , 1999
SWT7	<i>gifA::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Galmozzi, 2008
SK19E	<i>gifAK19E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Galmozzi, 2008
SR21E	<i>gifAR21E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Galmozzi, 2008
SK48E	<i>gifAK48E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Galmozzi, 2008
SR8E	<i>gifAR8E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SR28E	<i>gifAR28E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SWT17	<i>gifB::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SR90E	<i>gifBR90E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SK101A	<i>gifBK101A::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SR103A	<i>gifBR103A::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SR103E	<i>gifBR103E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SK102E	<i>gifBK102E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SQ105A	<i>gifBQ105A::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo
SR110E	<i>gifBR110E::aadA⁺</i> Sp ^r , St ^f	Este trabajo

Tabla 3. Estirpes mutantes de *Synechocystis* utilizadas en este trabajo.

Para las cinéticas de inactivación de la GSI *in vivo* por adición de amonio, células cultivadas en BG11C fueron tratadas con NH₄Cl, a una concentración final de 10 mM, equilibrando el pH del medio con tampón Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico (TES) pH 7 a una concentración final de 20 mM. Las soluciones de NH₄Cl y TES se esterilizaron previamente mediante filtración.

Los cultivos en medio líquido se incubaron en agitadores orbitales IKA Laborthechnik modelo KS501 digital a 30 °C con iluminación continua de luz blanca (25-30 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) y agitación constante de 100 rpm, o bien en condiciones de burbujeo, aplicando una mezcla aire-CO₂ en proporción 99:1 (v/v) a 30 °C con iluminación continua de luz blanca (50 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) suministrada por paneles de tubos fluorescentes (Sylvania daylight F20w/D).

Para el cultivo en medio sólido se añadió agar (Bacto™ Agar, Becton, Dickinson and Company, BD) al 1 % (p/v). El agar se esteriliza por separado y se mezcla con el resto de componentes del medio de cultivo antes de verterlo en las placas de Petri. Las cajas sembradas se incubaron en una cámara termostaticada a 30 °C en condiciones de iluminación continua (25 y 30 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

Los antibióticos necesarios se esterilizaron por filtración y se añadieron a los medios de cultivo, previamente autoclavados y enfriados en condiciones de asepsia. Las concentraciones finales empleadas de los distintos antibióticos fueron: cloramfenicol 20 $\mu\text{g/ml}$, kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, espectinomicina 2.5 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomomicina 2,5 $\mu\text{g/ml}$ o bien espectinomicina 5 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomomicina 5 $\mu\text{g/ml}$.

2. Escherichia coli

2.1 Estirpes de *E. coli*

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y los genotipos correspondientes se recogen en la tabla 4.

La estirpe DH5 α fue usada como herramienta para manipulación de ADN así como para la producción de proteínas derivadas de plásmidos de expresión constitutiva. La estirpe BL21 fue usada para la expresión de proteínas derivadas de los plásmidos de expresión inducida por Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 α	<i>F</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>mK</i> ⁺ , <i>rK</i>) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> Δ <i>lacU169</i> (\emptyset 80- <i>lacZ</i> Δ M15)	Hanahan, 1983
BL21(DE3)	<i>hsdS</i> <i>gal</i> (λ <i>clts857</i> <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lac</i> UV5-T7 <i>gene1</i>)	Studier y Moffatt, 1986
ET6017	<i>araD139</i> , Δ (<i>argF-lac</i>)205, <i>flbB5301</i> , <i>pstF25</i> , <i>relA1</i> , <i>rspL150</i> , Δ (<i>glnG-A</i> or, <i>glnL-A</i>)229, <i>rha-10</i> , <i>deoC1</i>	Genetic Stock Center, Yale University

Tabla 4. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

2.2 Medios y condiciones de cultivo

El medio habitual de crecimiento para los cultivos líquidos o sólidos de *E. coli* es el medio de Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente: NaCl 10 g/l, Bactotripton 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l.

Para preparar medio sólido se añadió agar hasta una concentración final de 15 g/l. La esterilización del medio completo y los materiales se llevó a cabo en las mismas condiciones que las descritas previamente para los medios utilizados en el crecimiento de cianobacterias.

Para el crecimiento de cultivos destinados a la preparación de células competentes se utilizó medio SOB (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente:

Bactotripton	20 g/l	MgCl ₂	10 mM
Extracto de levadura	5 g/l	MgSO ₄	10 mM
NaCl	10 mM	KCl	2.5 mM

Para los ensayos de complementación se empleó medio mínimo M9, descrito por Sambrook *et al.* (1989). Su composición es la siguiente:

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	13 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NaCl	0.5 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
CaCl ₂	0,1 mM
MgSO ₄	1 mM
Vitamina B ₁	1 mg/l

Los compuestos adicionales fueron esterilizados por filtración y se añadieron en caso necesario a las siguientes concentraciones: Ampicilina 100 µg/ml, Kanamicina 50 µg/ml, Cloramfenicol 25 µg/ml, Espectinomicina 100 µg/ml, IPTG 16 µM.

Los cultivos líquidos fueron incubados a 37 °C en un agitador orbital Innova®43 (New Brunswick Scientific) a 200 rpm. Los cultivos en medio sólido en placas de Petri se incubaron a 37 °C.

3. Métodos de recogida de células

Las células de cianobacterias y de *E. coli* se recogieron por centrifugación, utilizando una microcentrífuga Eppendorf (13000 rpm, 3 minutos) o bien una centrífuga refrigerada Beckman modelo Avanti J-25 (9000 rpm, 10 min) según el volumen de cultivo. La recogida de células se realizó a temperatura ambiente o a 4 °C, según las condiciones requeridas.

B. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN

1. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

1.1 Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo

Los plásmidos utilizados no construidos en este trabajo así como algunas de sus características más notables se detallan en la tabla 5.

Plásmido	Descripción	Referencia	Resistencia
pBS-SK+	Vector de clonación. Contiene el fragmento α de la β -galactosidasa que permite la selección de los clones que llevan inserto.	Stratagene	Ap
pET24a	Plásmido de expresión controlada bajo un promotor del fago T7. Contiene dianas para añadir una secuencia adicional de histidinas en el extremo carboxilo de la proteína de interés.	Novagen	Km
pET28a	Plásmido de expresión controlada bajo un promotor del fago T7. Contiene dianas para añadir una secuencia adicional de histidinas en ambos extremos de la proteína de interés.	Novagen	Km
pGEM-T	Plásmido utilizado para clonar fragmentos de PCR. Contiene el fragmento α de la β -galactosidasa que permite la selección de los clones que llevan inserto.	Promega	Ap
pLET2	Fragmento de PCR de 637 pb conteniendo el gen <i>gjfB</i> clonado en pET-3a digerido con <i>NdeI-BamHI</i> .	García-Domínguez <i>et al.</i> , 1999	Ap

pSIF2	Fragmento de PCR de 1964 pb conteniendo el gen <i>gifA</i> , y sus zonas adyacentes clonado en pGEM-T. Tiene eliminadas las dianas <i>Accl</i> , <i>Sall</i> y <i>HincII</i> .	García-Domínguez <i>et al.</i> , 1999	Ap
pAV1100	Plásmido que contiene el componente ARN de la ARNasa P de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	Vioque, 1992	Ap
pAN7	Fragmento de 263 pb conteniendo el gen <i>gifA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120, clonado en el plásmido pET28a digerido <i>Ndel-BamHI</i> .	Galmozzi, 2008	Km
p7WT	Fragmento <i>Ndel-BamHI</i> conteniendo el gen <i>gifA</i> , clonado en el plásmido pET28a digerido <i>Ndel-BamHI</i> .	Galmozzi, 2008	Km
pK19B	Fragmento <i>Ndel-BamHI</i> de 434 pb conteniendo una versión del gen <i>gifA</i> que codifica la proteína mutante IF7K19E, clonada en el plásmido pET28a digerido <i>Ndel-BamHI</i> .	Galmozzi, 2008	Km
pR21B	Fragmento <i>Ndel-BamHI</i> de 434 pb conteniendo una versión del gen <i>gifA</i> que codifica la proteína mutante IF7R21E, clonada en el plásmido pET28a digerido <i>Ndel-BamHI</i> .	Galmozzi, 2008	Km
pK48B	Fragmento <i>Ndel-BamHI</i> de 434 pb conteniendo una versión del gen <i>gifA</i> que codifica la proteína mutante IF7K48E, clonado en el plásmido pET28a digerido <i>Ndel-BamHI</i> .	Galmozzi, 2008	Km
p17WT	Fragmento <i>Ndel-BamHI</i> de 637 pb que contiene el gen <i>gifB</i> clonado en el plásmido pET28a digerido <i>Ndel-BamHI</i> .	Galmozzi, 2008	Km
pHISGS	Fragmento <i>Sall</i> de 1600 pb conteniendo el gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> con un fragmento adicional de histidinas insertadas después del codón de iniciación. Clonado en el plásmido pBS digerido con <i>Sall</i> .	Galmozzi, 2008	Ap
pQUIM	Fragmento de 456 pb conteniendo los primeros 248 pb del gen <i>gifB</i> y el gen <i>gifA</i> completo formando una proteína quimérica con el extremo amino de IF17 fusionado a IF7. Clonado en pET24a digerido <i>Ndel-XhoI</i> .	Galmozzi, 2008	Km

Tabla 5. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo

1.2 Plásmidos utilizados construidos en este trabajo

Los plásmidos construidos en este trabajo con ADN procedente de *Synechocystis* o de *A. variabilis* y sus características más relevantes se describen en la tabla 6.

Plásmido	Descripción	Resistencia
p7-R8E	Derivado de p7WT con una versión modificada del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante IF7-R8E.	Km
p7-R28E	Derivado de p7WT con una versión modificada del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante IF7-R28E.	Km
p17-R90A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-R90A.	Km
p17-R90E	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-R90E.	Km
p17-K101A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-K101A.	Km
p17-K101E	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-K101E.	Km
p17-K102E	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-K102E.	Km
p17-R103A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-R103A.	Km
p17-R103E	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-R103E.	Km
p17-R103K	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-R103K.	Km
p17-Q105A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-Q105A.	Km
p17-L108A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-L108A.	Km

p17-R110A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-R110A.	Km
p17-R110E	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-R110E.	Km
p17-G116A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-G116A.	Km
p17-K132A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-K132A.	Km
p17-K132E	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-K132E.	Km
p17-Y141A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-Y141A.	Km
p17-S149A	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-S149A.	Km
p17-AAA1	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-AAA1 con la mutación YRG(5-7)AAA.	Km
p17-AAA2	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-AAA2 con la mutación YRG(28-30)AAA.	Km
p17-AAA3	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-AAA3 con la mutación YRG(52-54)AAA.	Km
p17-AB	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-AB con las mutaciones YRG(5-7)AAA e YRG(28-30)AAA.	Km
p17-BC	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-BC con las mutaciones YRG(28-130)AAA e YRG(52-54)AAA.	Km
p17-ABC	Derivado de p17WT con una versión modificada del gen <i>gifB</i> que codifica la proteína mutante IF17-BC con las mutaciones YRG(5-7)AAA, YRG(28-130)AAA e YRG(52-54)AAA.	Km
p7-R8E1	Fragmento Accl-Accl del plásmido p7-R8E, clonado en el plásmido pSIF2 digerido con Accl.	SpSt
p7-R28E1	Fragmento Accl-Accl del plásmido p7-R28E, clonado en el plásmido pSIF2 digerido con Accl.	SpSt

p7-R8E2	Derivado de p7-R8E1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SaI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt
p7-R28E2	Derivado de p7-R28E1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SaI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt
pLIF10	Fragmento de 1995 pb que contiene el gen <i>gfb</i> con los fragmentos flanqueantes, clonado en pGEM-T.	Ap
pLIF10-SpeI	Derivado de pLIF10 donde se ha eliminado la diana <i>SpeI</i> del polilinker.	Ap
p17-R90E1	Fragmento <i>NheI-BstEII</i> del plásmido p17-R90E, clonado en el plásmido pLIF10-SpeI digerido con <i>NheI-BstEII</i> .	SpSt
p17-K101A1	Fragmento <i>NheI-BstEII</i> del plásmido p17-K101A, clonado en el plásmido pLIF10-SpeI digerido con <i>NheI-BstEII</i> .	SpSt
p17-K102E1	Fragmento <i>NheI-BstEII</i> del Plásmido p17-K102E, clonado en el plásmido pLIF10-SpeI digerido con <i>NheI-BstEII</i> .	SpSt
p17-R103A1	Fragmento <i>NheI-BstEII</i> del Plásmido p17-K103A, clonado en el plásmido pLIF10-SpeI digerido con <i>NheI-BstEII</i> .	SpSt
p17-R103E1	Fragmento <i>NheI-BstEII</i> del Plásmido p17-R103E, clonado en el plásmido pLIF10-SpeI digerido con <i>NheI-BstEII</i> .	SpSt
p17-Q105A1	Fragmento <i>NheI-BstEII</i> del Plásmido p17-Q105A, clonado en el plásmido pLIF10-SpeI digerido con <i>NheI-BstEII</i> .	SpSt
p17-R110E1	Fragmento <i>NheI-BstEII</i> del Plásmido p17-R110E, clonado en el plásmido pLIF10-SpeI digerido con <i>NheI-BstEII</i> .	SpSt
p17-R90E2	Derivado de p17-R90E1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SpeI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt
p17- K101A2	Derivado de p17-K101A1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SpeI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt
p17- K102E2	Derivado de p17-K102E1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SpeI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt
p17- R103A2	Derivado de p17-R102A1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SpeI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt
p17- R103E2	Derivado de p17-R103E1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SpeI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt
p17- Q105A2	Derivado de p17-Q105A1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SpeI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt

p17- R110E2	Derivado de p17-R110E1 en el cual se ha clonado en el sitio <i>SpeI</i> el fragmento CS3 que confiere resistencia a Sp/St.	SpSt
pAvar	Fragmento <i>XbaI-SmaI</i> conteniendo el gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> clonado en pUC19.	Ap
pGS-var	Fragmento <i>Sall</i> de 1474 pb derivado del plásmido pAvar, conteniendo el gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> con un fragmento adicional de histidinas insertadas después del codón de iniciación. Clonado en el plásmido pBS digerido con <i>Sall</i> .	Ap
pGS-Q1	Fragmento <i>Sall</i> de 1527 pb conteniendo los primeros 803 pb del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> , los últimos 724 pb del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> y un fragmento adicional de histidinas insertadas después del codón de iniciación. Clonado en el plásmido pBS digerido con <i>Sall</i> . La proteína mutante resultante se denominó GS-Quimera1.	Ap
pGS-Q2	Fragmento <i>Sall</i> de 1527 pb conteniendo los primeros 1187 pb del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> , los últimos 340 pb del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> y un fragmento adicional de histidinas insertadas después del codón de iniciación. Clonado en el plásmido pBS digerido con <i>Sall</i> . La proteína mutante resultante se denominó GS-Quimera2.	Ap
pGS-Q3	Fragmento <i>Sall</i> de 1527 pb conteniendo los primeros 1325 pb del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> , los últimos 202 pb del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> y un fragmento adicional de histidinas insertadas después del codón de iniciación. Clonado en el plásmido pBS digerido con <i>Sall</i> . La proteína mutante resultante se denominó GS-Quimera3.	Ap
pGS-E430A	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E430A.	Ap
pGS-E444Q	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E444Q.	Ap
pGS-D452A	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-D452A.	Ap
pGS-AQA	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-AQA, que presenta las mutaciones E430A, E444Q y D452A.	Ap
pGS-E441A	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E441A.	Ap
pGS-E448A	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E448A.	Ap

pGS-E454A	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E454A.	Ap
pGS-E466A	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E466A.	Ap
pGS-E466Q	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E466Q.	Ap
pGS-E466K	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E466K.	Ap
pGS-E466D	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E466D.	Ap
pGS-E472A	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-E472A.	Ap
pGS-N456K	Derivado de pHIS-GS con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> que codifica la proteína mutante GS-N456K.	Ap
pGS-K457N	Derivado de pGS-var con una versión modificada del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> que codifica la proteína mutante GS-K457N.	Ap

Tabla 6. Plásmidos utilizados construidos en este trabajo.

1.3 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos sintéticos procedentes de Sigma Aldrich utilizados en este trabajo se detallan en la tabla 7.

Nombre	Secuencia	Función
SIF1	5'- GCAAACATCCGCCCATGGATCAAC- 3'	Fragmento localizado 818 pb aguas arriba del codón de iniciación del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> .
SIF3	5'- TACATATGTCTACTCAACAACAGG- 3'	Fragmento localizado en el codón de iniciación del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> conteniendo una diana <i>NdeI</i> .

Materiales y métodos

SIF4	5'- GTTAATGGGATCCTAGTTAATATC- 3'	Fragmento localizado 185 pb aguas abajo del codón STOP del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> conteniendo una diana <i>Bam</i> HI.
SIF5	5'- GCGCGAGCCTGTTGTTGAGTAGAC- 3'	Utilizado junto con SIF1 para amplificar un fragmento de 846 pb del locus donde se localiza el gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> usado como sonda para comprobar la segregación de las estirpes mutantes de IF7.
R8E 1F	5'- GCCATATGTCTACTCAACAACAGGCTGAAGC TCTC- 3'	Usado junto con SIF4 para generar la versión mutante R8E del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> .
R28E 1F	5'- CATGTTGTCCGAAGCTGCCGCTG- 3'	Usado junto con SIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante R28E del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> .
R28E 1R	5'- CAGCGGCAGCTTCGGACAACATG- 3'	Usado junto con SIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante R28E del gen <i>gifA</i> de <i>Synechocystis</i> .
LIF1	5'- TCCAGCACTGGCGCCAGCATTTC- 3'	Fragmento localizado 791 pb aguas arriba del codón de iniciación del gen <i>gifB</i> .
LIF2	5'- GATGGGCCAGCAGGGGCACAATAA- 3'	Fragmento localizado 757 pb aguas abajo del codón de STOP del gen <i>gifB</i> .
LIF3	5'- GCGCCATATGCAATTAAGTTACCG- 3'	Fragmento localizado en el codón de iniciación del gen <i>gifB</i> conteniendo una diana <i>Nde</i> I.
LIF3b	5'-GCGCCATATGCAATTAAGTTACCGTGGAGTC- 3'	Fragmento localizado en el codón de iniciación del gen <i>gifB</i> conteniendo una diana <i>Nde</i> I y la mutación YRG(5-7)AAA.
LIF4	5'- TTGGATCCTCCGTTATCTGAATAG- 3'	Fragmento localizado 159 pb aguas abajo del codón STOP del gen <i>gifB</i> conteniendo una diana <i>Bam</i> HI.
LIF5	5'- AACCCACGGTAGCTGCCCCGCTAGCC - 3'	Usado junto con LIF1 para amplificar un fragmento de 885 pb del locus donde se localiza el gen <i>gifB</i> usado como sonda para comprobar la segregación de las estirpes mutantes de IF17 de <i>Synechocystis</i> .
NdeR90A	5'- CAGGCGGGCCGCGACCCGGTC- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante R90A del gen <i>gifB</i> .
BamR90A	5'- GACCGGGTCGCGGCCCGCCTG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante R90A del gen <i>gifB</i> .

Materiales y métodos

NdeR90E	5'- CAGGCGGGCCTCGACCCGGTC- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante R90E del gen <i>gifB</i> .
BamR90E	5'- GACCGGGTCGAGGCCCGCCTG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante R90E del gen <i>gifB</i> .
NdeK101A	5'- GGATTGTTGGCGTTTTGCAATTGCCTGGG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante K101A del gen <i>gifB</i> .
BamK101A	5'- CCCAGGCAATTGCAAAACGCCAACAAATCC- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante K101A del gen <i>gifB</i> .
NdeK101E	5'- GGATTGTTGGCGTTTTTCAATTGCCTGGG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante K101E del gen <i>gifB</i> .
BamK101E	5'- CCCAGGCAATTGAAAAACGCCAACAAATCC- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante K101E del gen <i>gifB</i> .
NdeK102E	5'- GGATTGTTGGCGTCTTTAATTGCCTGGG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante K102E del gen <i>gifB</i> .
BamK102E	5'- CCCAGGCAATTAAGAACGCCAACAAATCC- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante K102E del gen <i>gifB</i> .
NdeR103A	5'- CAGGGATTGTTGGGCTTTTTTAATTGCCTG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante R103A del gen <i>gifB</i> .
BamR103A	5'- CAGGCAATTAATAAGCCCAACAATCCCTG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante R103A del gen <i>gifB</i> .
NdeR103E	5'- CAGGGATTGTTGTTCTTTTTAATTGCCTG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante R103E del gen <i>gifB</i> .
BamR103E	5'- CAGGCAATTAATAAGAACCAACAATCCCTG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante R103E del gen <i>gifB</i> .
NdeR103K	5'- GGGATTGTTGCTTTTTTTAATTGCC- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante R103K del gen <i>gifB</i> .
BamR103K	5'- GGCAATTAATAAGAACCAACAATCCC- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante R103K del gen <i>gifB</i> .
NdeQ105A	5'- CACTAACAGGGATGCTTGGCGTTTTTAATTGC- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante Q105A del gen <i>gifB</i> .
BamQ105A	5'- GCAATTAATAAGAACCAAGCATCCCTGTTAGTG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante Q105A del gen <i>gifB</i> .

Materiales y métodos

NdeL108A	5'- CAGCCAAACGCACTGCCAGGG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante L108A del gen <i>gifB</i> .
BamL108A	5'- CCCTGGCAGTGCGTTTGGCTG - 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante L108A del gen <i>gifB</i> .
NdeR110A	5'- CTTCAGCCAAAGCCACTAACAG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante R110A del gen <i>gifB</i> .
BamR110A	5'- CTGTTAGTGGCTTTGGCTGAAG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante R110A del gen <i>gifB</i> .
NdeR110E	5'- CTTCAGCCAACTCCACTAACAG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante R110E del gen <i>gifB</i> .
BamR110E	5'- CTGTTAGTGGAGTTGGCTGAAG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante R110E del gen <i>gifB</i> .
NdeG116A	5'- CACCACTTAAAGCAATTTCTTC- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante G116A del gen <i>gifB</i> .
BamG116A	5'- GAAGAAATTGCTTTAAGTGGTG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante G116A del gen <i>gifB</i> .
NdeK132A	5'- GCCAAAACGCGCCTTGGATG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante K132A del gen <i>gifB</i> .
BamK132A	5'- CATCCAAGGCGCAGTTTTGGC - 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante K132A del gen <i>gifB</i> .
NdeK132E	5'- GCCAAAACCTTCGCCTTGGATG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante K132E del gen <i>gifB</i> .
BamK132E	5'- CATCCAAGGCGAAGTTTTGGC - 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante K132E del gen <i>gifB</i> .
NdeY141A	5'- CTTGACTGGCAGCGTACGAAC- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante Y141A del gen <i>gifB</i> .
BamY141A	5'- GTTCTGACGCTGCCAGTCAAG - 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante Y141A del gen <i>gifB</i> .
NdeS149A	5'- CAAACTAGATTAGGCCATGGC- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' de la versión mutante S149A del gen <i>gifB</i> .
BamS149A	5'- GGCCATGGCCTAATCTAGTTTG - 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' de la versión mutante S149A del gen <i>gifB</i> .

AAA1	5'- GCGCCATATGCAATTAAGTGCCGCTGCAGTC AAGTACG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar la mutación YRG(5-7)AAA del gen <i>gifB</i> . Contiene el codón de iniciación.
NheAAA2	5'- GGGCTAGCGGGCAGCGCCGCTGCTTTGGACT ATCG- 3'	Usado junto con LIF4 para generar la mutación YRG(28-30)AAA del gen <i>gifB</i> . Contiene la diana <i>NheI</i> .
NdeAAA3	5'- GGAAACTGCCGCAGCAGTTAGATTG- 3'	Usado junto con LIF3 para generar el extremo 5' del gen <i>gifB</i> con la mutación YRG(52-54)AAA.
BamAAA3	5'- CAATCTAACTGCTGCGGCAGTTTCC - 3'	Usado junto con LIF4 para generar el extremo 3' del gen <i>gifB</i> con la mutación YRG(52-54)AAA.
GSvar 7F	5'-CAGTCGACAATGCACCACCACCACAC AACCTCACAAGAAGTCTTGAAGAGAATTC- 3'	Fragmento localizado en el codón de iniciación del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> , conteniendo una diana <i>SalI</i> y la secuencia codificante de 5 histidinas.
GSvar 1R	5'- GCTAGTCGACGCTAACAGGTG- 3'	Fragmento localizado 4 pb aguas abajo del codón de STOP del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> , conteniendo una diana <i>SalI</i> .
GSvar 2R	5'- GGAGTAAGCCAAGTAACTGG - 3'	Usado junto con GSvar 7F para generar el extremo 5' del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> . Contiene la diana <i>HpaI</i> .
GSvar 3F	5'- CCAGTAACTTGGCTTACTCC- 3'	Usado junto con GSvar 1R para generar el extremo 3' del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> . Contiene la diana <i>HpaI</i> .
GSSyn 1F	5'- GATGGATAGTCGACGCAGC- 3'	Fragmento localizado 42 pb aguas arriba del codón de iniciación del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> , conteniendo una diana <i>SalI</i> .
GSSyn 1R	5'- GTTTTTGATCACATACTTATAG- 3'	Usado junto con GSSyn 1F para generar el extremo 5' del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> para generar la proteína GS-Quimera1. Contiene la diana <i>BclI</i> .
GSSyn 2R	5'- CAAAGGCCAGATAGGGATTGGAGG- 3'	Usado junto con GSSyn 1F para generar el extremo 5' del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> para generar la proteína GS-Quimera2. Contiene la diana <i>XcmI</i> .
GSSyn 3R	5'- CTTCCAAGGCTAGCTCCAGGGAG- 3'	Usado junto con GSSyn 1F para generar el extremo 5' del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> para generar la proteína GS-Quimera3. Contiene la diana <i>NheI</i> .
GSvar 1F	5'- CTATGTGATCAAGAACGTTGCC- 3'	Usado junto con GSvar 1R para generar el extremo 3' del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> para generar la proteína GS-Quimera1. Contiene la diana <i>BclI</i> .

Materiales y métodos

GSvar 4F	5'- CTACCTCCAATCCCTATCTGGCATTG- 3'	Usado junto con GSvar 1R para generar el extremo 3' del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> para generar la proteína GS-Quimera2. Contiene la diana <i>NheI</i> .
GSvar 6F	5'- GGTTCTTTAGAGCTAGCATTG- 3'	Usado junto con GSvar 1R para generar el extremo 3' del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> para generar la proteína GS-Quimera3. Contiene la diana <i>XcmI</i> .
glnABcl	5'- CTATAAGTATGTGATCAAAAACGTGG- 3'	Fragmento localizado 716 pb aguas arriba del codón de iniciación del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> , conteniendo una diana <i>BclI</i> .
glnAXba	5'- GTTATTTCTAGACCAACTTAGTC- 3'	Fragmento localizado 82 pb aguas abajo del codón de STOP del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> , conteniendo una diana <i>XbaI</i> .
glnAE430A	5'- GGAAAAAGACCATGCCTTCCTCACCG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 259 pb de la versión mutante E430A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
glnAE430A R	5'- CGGTGAGGAAGGCATGGTCTTTTTCC- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 583 pb de la versión mutante E430A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
glnAE444A	5'- CCTGACTTTGTGCAAAGTTGGATTGAG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 216 pb de la versión mutante E444A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
glnAE444A R	5'- CTCAATCCAACTTGCACAAAGTCAGG- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 627 pb de la versión mutante E444A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
glnAD452A	5'- GGATTGAGTACAACTGGCCAACGAAGTTAAC C- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 197 pb de la versión mutante D452A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
glnAD452A R	5'- GGTTAACTTCGTTGGCCAGTTTGTACTCAATC C- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 652 pb de la versión mutante D452A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Bcl D441A	5'- CCACAAAGGCAGGGGAAAATAC- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 611 pb de la versión mutante D441A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Xba D441A	5'- GTATTTTCCCCTGCCTTTGTGG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 223 pb de la versión mutante D441A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .

Materiales y métodos

Bcl E448A	5'- CAGTTTGTACGCAATCCAAC- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 634 pb de la versión mutante E448A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Xba E448A	5'- GTTGGATTGCGTACAAACTG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 198 pb de la versión mutante E448A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Bcl E454A	5'- GGGGTAACTGCGTTGTCCAG- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 655 pb de la versión mutante E454A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Xba E454A	5'- CTGGACAACGCAGTTAACCCC- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 181 pb de la versión mutante E454A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Bcl E466A	5'- CAAGGAGAATGCGTAGGGGTG- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 688 pb de la versión mutante E466A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Xba E466A	5'- CACCCCTACGCATTCTCCTTG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 147 pb de la versión mutante E466A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Bcl E466Q	5'- CAAGGAGAATTGGTAGGGGTG- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 688 pb de la versión mutante E466Q del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Xba E466Q	5'- CACCCCTACCAATTCTCCTTG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 147 pb de la versión mutante E466Q del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Bcl E466D	5'- CAAGGAGAAGTCGTAGGGGTG- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 688 pb de la versión mutante E466D del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Xba E466D	5'- CACCCCTACGACTTCTCCTTG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 147 pb de la versión mutante E466D del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Bcl E466K	5'- CAAGGAGAATTTGTAGGGGTG- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 688 pb de la versión mutante E466K del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Xba E466K	5'- CACCCCTACAAATTCTCCTTG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 147 pb de la versión mutante E466K del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .

Bcl D472A	5'- GGTTTAGCAGGCGTAGTACAAG- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 706 pb de la versión mutante D472A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
Xba D472A	5'- CTTGTACTACGCCTGCTAAACC- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 128 pb de la versión mutante D472A del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
N456K 1F	5'- CAACGAAGTTAAACCCATGCGTC- 3'	Usado junto con glnA Bcl para generar un fragmento de 659 pb de la versión mutante N456K del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
N456K 1R	5'- GACGCATGGGTTTAACTTCGTTG- 3'	Usado junto con glnA Xba para generar un fragmento de 176 pb de la versión mutante N456K del gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> .
T7	5'- GTAATACGACTCACTATAGGGCG- 3'	Oligonucleótido comercial
T3	5'- CAATTAACCCTCACTAAAGGG- 3'	Oligonucleótido comercial
K456N 1F	5'- CTCGCTAACGAAGTTAACCCAGATGCAACTGCG TC- 3'	Usado junto con el oligonucleótido comercial T7 para generar un fragmento de 151 pb de la versión mutante K457N del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> .
K456N 1R	5'- GACGCAGTTGCATCTGGTAACTTCGTTAGCG AG- 3'	Usado junto con el oligonucleótido comercial T3 para generar un fragmento de 1502 pb de la versión mutante K457N del gen <i>glnA</i> de <i>A. variabilis</i> .

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

2. Aislamiento de ADN

2.1 Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala se empleó el método basado en la lisis alcalina descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979). El procedimiento realizado es el indicado por Sambrook *et al.* (1989), consistente en la lisis de las células en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) y NaOH, seguida de la eliminación del ADN cromosómico y de las proteínas mediante precipitación con acetato potásico y centrifugación. Opcionalmente, las preparaciones pueden someterse a extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) para reducir el contenido de proteínas de las mismas. El ADN se precipitó usando etanol absoluto frío y acetato potásico, y se resuspendió en agua bidestilada o en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8.0. Finalmente, el ARN se eliminó mediante un tratamiento con RNasa A de páncreas

bovino (Sigma) durante una hora a 37 °C. Para obtener ADN plasmídico de alta calidad se utilizó el sistema comercial 'GFX PCR and Gel Band purification Kit' (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ADN fue utilizado para su secuenciación, para la transformación de células de *E. coli* BL21 o para su introducción en *Synechocystis*.

2.2 Aislamiento de ADN genómico de *Synechocystis*

El aislamiento de ADN total de células de *Synechocystis* se llevó a cabo mediante el método de rotura por perlas de vidrio descrito por Cai y Wolk (1990). Se recogieron por centrifugación células procedentes de 35 ml de cultivo y se resuspendieron en 400 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM). A la suspensión celular se le añadieron 150 µl de perlas de vidrio (0.25-0.30 mm de diámetro, Sigma Aldrich) previamente tratadas con agua regia y horneadas, 20 µl de SDS 10 % (p/v) y 400 µl de una mezcla fenol:cloroformo 1:1 (v/v). Esta suspensión se sometió a 10 ciclos de 1 minuto de agitación vigorosa alternándolo con periodos de 1 minuto en hielo. A continuación, se centrifugó (12.000 rpm, 15 min, 4 °C) para eliminar los restos de células no rotas y las perlas de vidrio utilizadas. El sobrenadante fue sometido a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). Finalmente, el ADN se precipitó con etanol absoluto frío y acetato sódico mediante centrifugación. El precipitado se secó al vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón TE. El ARN presente en la solución se eliminó mediante el mismo tratamiento que en el apartado anterior.

3. Análisis de ADN

3.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 0.7-1.5 % (p/v) preparados en tampón TBE 0.5x (Tris borato 45 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM) y con bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/ml. Las electroforesis se realizaron utilizando aparatos Sub-cell GT wide MINI (Bio-Rad). A cada muestra se añadía 1/10 del volumen de tampón de carga (azul de bromofenol al 0.25 % (p/v), xileno-cianol FF al 0.5 % (p/v) y glicerol al 50 % (v/v) en agua).

Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se empleó el marcador '1 kb ladder plus' (Invitrogen). Tras la electroforesis, el ADN se visualizó por iluminación con luz UV de 302 nm, utilizándose para ello un transiluminador Universal Hood II y el sistema *Gel Doc*TM XR (BioRad) y se fotografiaron con un equipo Digital Graphic Printer UP D-897 (Sony).

3.2 Cuantificación de ADN

La concentración de ADN de las muestras preparadas se determinó por su absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm, en una cubeta donde el paso de luz es de 1 cm, equivale a 50 µg/ml de ADN.

3.3 Purificación de fragmentos de ADN

Para la purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa o desde solución se utilizó el sistema comercial 'GFX PCR and Gel Band purification Kit' (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4 Manipulación enzimática de ADN

Las manipulaciones enzimáticas de ADN se llevaron a cabo según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Las digestiones de ADN se realizaron usando endonucleasas de restricción suministradas por los laboratorios Roche, GE Healthcare, Promega, Sigma, Takara y New England's BioLabs. La defosforilación de los extremos de vectores linearizados con enzimas de restricción se realizó mediante tratamientos con fosfatasa alcalina suministrada por Roche. Para obtener extremos romos a partir de fragmentos de ADN con extremos 5' protuberantes se utilizó el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* (Promega). Las ligaciones de fragmentos de ADN se realizaron usando ligasa de ADN del fago T4 (Promega). Todos los tratamientos se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5 Amplificación de fragmentos de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un aparato T-personal (Biometra). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen de 100 µl que contenía 2.5 U de EcoTAQ DNA Polymerase (Ecogen), tampón 1x (suministrado con la enzima), 1.5 mM MgCl₂, dNTPs a concentración final de 0.2 mM cada uno, 1.5 ng de ADN molde y 50 pmol de cada oligonucleótido. Los oligonucleótidos que se utilizaron se indican en la tabla 7.

Generalmente, el programa de amplificación consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de reacción y un ciclo final de polimerización a 72 °C durante 2 min. Cada ciclo de reacción constaba de una etapa de desnaturalización a 95 °C (30 seg), una etapa de renaturalización a 48-65 °C (30 seg) y una etapa de polimerización a 72 °C (1 min por cada kb a amplificar). Los fragmentos de ADN así amplificados se sometían a electroforesis en geles de agarosa y se purificaban de igual forma a la descrita en el apartado B 3.3.

Cuando se amplificaron secuencias de ADN para la construcción de plásmidos que serían utilizados para la expresión de proteínas, se utilizó el sistema comercial Expand High Fidelity PCR System Kit (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la construcción de los plásmidos portadores de algunas versiones mutantes de genes que se describen en este trabajo se utilizó un sistema de PCRs consecutivas que permitía la incorporación de las mutaciones diseñadas en los genes que se amplificaban (Figura 13). En primer lugar, se realizan dos PCRs paralelas cuyos extremos 3' de la primera PCR y 5' de la segunda PCR solapan entre sí y portan la mutación que deseamos introducir en el gen. Usando dichas PCRs como molde ponemos en marcha un programa donde se suceden 3 fases:

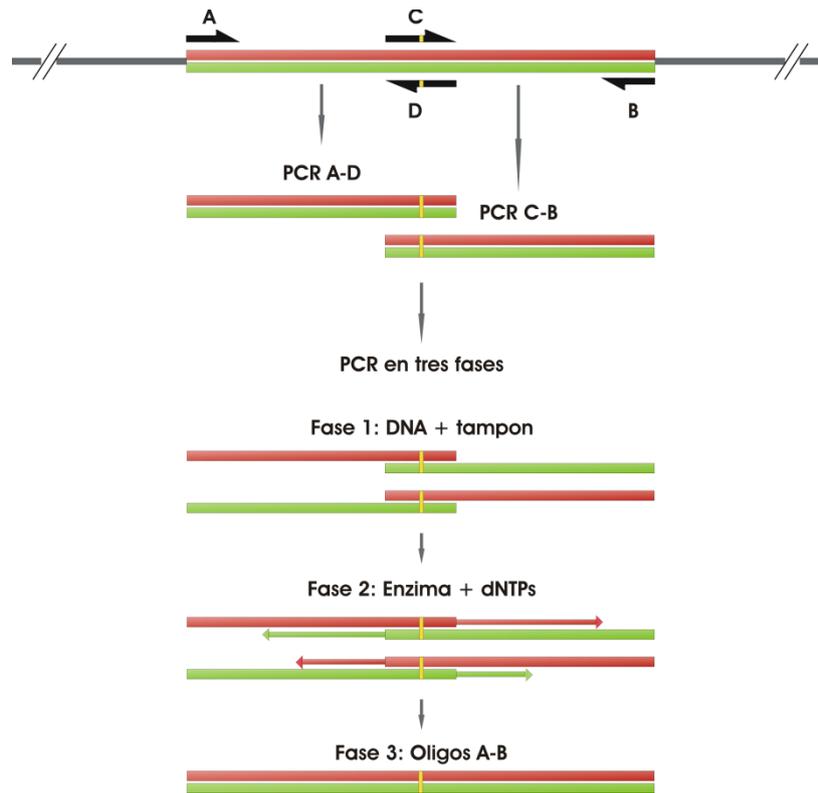


Figura 13. Esquema de la PCR en tres fases para generar mutaciones en el interior de un gen.

El proceso se detalla en el apartado 3.5. La mutación está simbolizada en amarillo. Las dos hebras de ADN se han coloreado con rojo y verde para facilitar la comprensión del proceso. Oligos, oligonucleótidos.

- **Fase 1:** Se mezclan 1.5 ng de ADN de los dos fragmentos de PCR obtenidas previamente junto con el tampón de polimerización. En esta fase se desnaturalizan las cadenas de los fragmentos de ADN a 95 °C durante 5 min. A continuación la temperatura desciende a una velocidad de 0.03 °C cada segundo hasta alcanzar los 37 °C. De esta forma, los extremos solapantes de los dos fragmentos de PCR podrán unirse entre sí.
- **Fase 2:** Se añaden dNTP a una concentración final de 0.2 mM junto con 2.5 U de Expand High Fidelity Enzyme Mix y se incuba a 72 °C durante 2 min. En esta fase, la polimerasa completará la doble cadena de los fragmentos formados en la fase 1.
- **Fase 3:** se añaden 50 pmoles de los oligonucleótidos extremos (A y B en el esquema de la Figura 7) y se realiza un programa de PCR estándar. En esta fase, se clonará la secuencia completa, formada por la unión de dos fragmentos independientes y portadora de la mutación deseada.

3.6 Secuenciación de ADN

La secuenciación de fragmentos obtenidos por PCR así como de ADN plasmídico se realizó usando los servicios comerciales de Eurofins MWG Biotech.

4. Introducción de ADN exógeno en organismos

4.1 Transformación de células de *E. coli*.

Las células competentes de las distintas estirpes de *E. coli* fueron suministradas por el Servicio Técnico de Cultivos Biológicos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, donde se prepararon siguiendo el procedimiento descrito por Hanahan (1983). Se ha usado la estirpe DH5 α para la transformación mediante choque térmico y la estirpe BL21 para la transformación por electroporación.

4.1.1 Transformación por choque térmico:

Para transformar las células competentes, el ADN transformante (hasta 50 ng en un volumen máximo de 20 μ l) se mezcló con una alícuota de células competentes (100 μ l) descongelada en hielo. Tras incubar 30 min en hielo, la mezcla se sometió a un choque térmico de 2 min a 42 °C seguidos de 2 min en hielo. Posteriormente se añadió 1 ml de medio LB y se incubó durante una hora a 37 °C. A continuación las células se sembraron en medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes o bien se utilizaron para inocular un cultivo líquido.

4.1.2 Transformación por electroporación:

Para la expresión de algunas de las proteínas purificadas en este trabajo fue necesaria la utilización del sistema de expresión heteróloga en *E. coli* bajo el control del promotor del fago T7. Los genes que codifican las proteínas de interés se clonaron en plásmidos de la serie pET (Novagen) adecuados para este sistema.

La electroporación se realizó en un electroporador Easyject Optima (Equibio), según las indicaciones del fabricante. Se mezclaron 100 μ l de células competentes con un máximo de 50 ng de ADN transformante y se incubó 3 min en hielo. La mezcla se introdujo en una cubeta de electroporación Gene Pulser® Cuvette (Bio-Rad) y se

sometió a una diferencia de potencial de 2500 V durante 1 s. Seguidamente se le añadió 1 ml de LB y se incubó durante 1 hora a 37 °C. A continuación las células se sembraron en medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes o bien se utilizaron para inocular un cultivo líquido.

4.2 Transformación de células de *Synechocystis*

Synechocystis posee un sistema natural por el cual es capaz de incorporar al interior celular moléculas de ADN que se encuentran en el medio de cultivo (Grigorieva y Shestakov, 1982). Si estas moléculas de ADN presentan similitud con alguna secuencia del genoma, este organismo es capaz de integrarlas mediante recombinación homóloga. Gracias a esta propiedad, se ha desarrollado un sistema eficaz para la mutación de genes y la introducción de fragmentos de ADN exógeno en *Synechocystis*.

El método de transformación de *Synechocystis* se basa en el descrito por Chauvat *et al.* (1988). Las células se cultivaron hasta alcanzar una densidad óptica (DO) aproximada de 1 a 580 nm. Un volumen de 50 ml de cultivo se recogió por centrifugación (4000 rpm, 20 min) y las células se lavaron 2 veces con medio BG11C fresco para eliminar posibles nucleasas extracelulares. Tras los lavados, las células se resuspendieron en 1 ml de medio fresco que se distribuyó en alícuotas de 200 µl en tubos de poliestireno-cristal de 10 ml (Soria Greiner S.A.). A estas alícuotas se les añadió aproximadamente 2 µg de ADN purificado y se incubaron durante 1 h en condiciones normales de iluminación. Tras este tiempo, las células se sembraron en placas frescas de medio BG11C sin antibióticos sobre filtros IMMOVILON-NC 85 mm (Millipore). Tras un período de 20 h en condiciones normales de cultivo que permite la expresión de los genes de resistencia portados por el ADN exógeno, los filtros se pasaron a placas con el antibiótico adecuado, usándose una concentración de 20 µg/ml de cloramfenicol, 50 µg/ml de kanamicina y/o 5 µg/ml de espectinomicina y estreptomycin. Las colonias resistentes a antibiótico aparecían a los 8-10 días de incubación procediéndose entonces a su análisis fenotípico y genotípico.

5. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida realizada para obtener los diferentes mutantes de los IFs y de la GSI se ha llevado a cabo mediante el sistema de PCR en tres fases o mediante un único evento de PCR. El sistema de PCR en tres fases se describe en el apartado B 3.5, y se basa en la utilización de oligonucleótidos homólogos a una secuencia interna del gen y portadores de la mutación a introducir. Para el diseño de mutantes mediante un único evento de PCR se han usado oligonucleótidos que contienen la mutación y portadores de alguna diana de restricción que posteriormente se usaría para su digestión y ligación con el vector de expresión correspondiente.

6. Detección de ADN mediante hibridación con sonda radiactiva (Southern Blot)

6.1 Marcaje radiactivo de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN utilizados como sondas en las hibridaciones se obtuvieron mediante restricción de los plásmidos requeridos en cada caso o por PCR usando los oligonucleótidos y el ADN molde apropiados. Estos fragmentos se purificaron a partir de geles de agarosa mediante el método descrito anteriormente.

Para el marcaje radiactivo se empleó el sistema Amersham™ Ready-To-Go™ DNA Labeling Beads (-dCTP) (GE Healthcare) de extensión de cebadores de secuencia aleatoria siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se han utilizado aproximadamente 100 ng de ADN desnaturalizado que se marcaron radiactivamente utilizando 20-30 μCi de $5'[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3.000 mCi/mmol) (GE Healthcare), en un volumen final de 50 μl . Tras una incubación de 1 hora a 37 °C, se eliminaron los nucleótidos no incorporados mediante filtración de las muestras en columnas Illustra™ Microspin™ S-200 HR Columns (GE Healthcare). La eficiencia del marcaje se estimó cuantificando la radiactividad incorporada en 1 μl de la muestra utilizando un contador de centelleo Beckman LS 2800.

6.2 Transferencia de ADN a filtros de nylon

Tras digerir la muestra de ADN con una enzima de restricción determinada, se realizó una electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 0.7 %. El gel se sumergió durante 15 minutos en una solución de HCl 0.25 N para depurinizar parcialmente el ADN, se lavó con agua destilada y se incubó durante 1 hora en una solución

desnaturalizante de NaOH 0.5 N y NaCl 1.5 M, todo ello en agitación suave. La transferencia del ADN a filtros de nylon Zeta-Probe® Blotting Membranes (BioRad) se realizó usando un aparato de transferencia por vacío Mini Horizontal Submarine Unit (Hoefer Scientific Instruments) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el ADN se fijó al filtro por incubación de éste durante 2 horas a 80 °C.

6.3 Hibridación de filtro con sonda radiactiva

Para la hibridación del filtro con la sonda marcada radiactivamente, éste se incubó durante 1 hora a 65 °C con una solución de hibridación (Tampón fosfato sódico 0.5 M pH 7.2, EDTA 10 mM, SDS 7 % (p/v)). Posteriormente se añadió la sonda de ADN marcada radiactivamente que previamente fue desnaturalizada a 100 °C durante 10 minutos. La hibridación se llevó a cabo durante aproximadamente 15 horas a 65 °C.

Posteriormente, el filtro se lavó con agitación moderada durante 30 minutos a temperatura ambiente y durante otros 30 min a 65 °C usando solución de lavado (tampón fosfato sódico 40 mM pH 7.2 y SDS 1 % (p/v)). Con esto se consiguió eliminar los restos de sonda unida inespecíficamente.

6.4 Detección de radiactividad en filtros

La detección de la señal radiactiva se realizó usando un aparato de autorradiografía Cyclone® Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer), con el que se cuantificaron las áreas radiactivas.

C. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ARN

1. Tratamiento del material

Para evitar la degradación de ARN por acción de RNasas, todas las soluciones utilizadas para la extracción y manipulación de ARN se prepararon con agua bidestilada en un aparato Q-POD™ Milli-Q (Milipore), tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) y posteriormente autoclavada para inactivar el DEPC. Todo el material utilizado se esterilizó mediante calentamiento en horno (Selecta) a 200 °C durante 2 horas o por tratamiento con H₂O₂ 33 % (v/v), a excepción del material de plástico, que se esterilizó mediante autoclavado. Adicionalmente, se utilizaron

productos comerciales libres de ARNasas. Todos los procesos se realizaron a 4 °C y en el menor tiempo posible.

2. Aislamiento de ARN total de *Synechocystis*

La extracción del ARN total de células de *Synechocystis* se realizó siguiendo el siguiente protocolo: se recogieron 30 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento por centrifugación (9000 rpm, 5 min, 4 °C). Las células fueron resuspendidas en 370 µl de STET (NaCl 0.1 M, Triton X-100 al 5 % (v/v), EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM pH 8.0) a los que se añadieron 70 µl de arcilla Bentone MA Rheological additive (Rheox) al 3 % (p/v) en T0.1E, 370 µl de fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y 150 µl de perlas de vidrio de 0.45-0.6 mm de diámetro (Sigma Aldrich) tratadas previamente con agua regia y horneadas. La mezcla se sometió a 10 ciclos de 1 min de agitación en vórtex alternándolos con periodos de 1 min de incubación en hielo. Seguidamente, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Las proteínas de la muestra se eliminaron mediante tres tratamientos con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y los ácidos nucleicos se precipitaron incubando durante 1 hora a -20 °C con LiCl y etanol. Una vez secos y para eliminar el contenido de ADN, los precipitados se resuspendieron en 50 µl de tampón T0.1E y 10 U de ADNasa I libre de ARNasa (Roche), y se incubaron durante 45 min a 30 °C. Para eliminar las ADNasas, las muestras se sometieron nuevamente a extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y a precipitación con acetato de sodio y etanol. Los precipitados de ARN se resuspendieron en 20-30 µl de H₂O tratada con DEPC.

3. Análisis y cuantificación del ARN

3.1 Cuantificación de ARN

La concentración de ARN de las muestras preparadas se determinó midiendo su absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia a 260 nm, en una cubeta con 1 cm de paso de luz, equivale a 40 µg/ml de ARN.

3.2 Electroforesis de ARN en geles de agarosa

Las muestras de ARN total se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) en condiciones desnaturizantes, usando tampón MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico 20mM pH 7.0, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM) en presencia de bromuro de etidio (1 µg/ml) y formaldehído 6.5 %. Las muestras contenían 15-20 µg de ARN, tampón MOPS 0.5x, formaldehído 6.5 % y formamida desionizada 50 %. Fueron incubadas durante 15 minutos a 65 °C para desnaturizar el ARN. Las electroforesis se realizaron en tampón MOPS 1x, usando los mismos aparatos a los descritos en el apartado B 3.1.

4. Detección de ARNm mediante hibridación ARN-ADN (Northern blot)

Para los ensayos de Northern blot se utilizaron las muestras de ARN total preparadas como se describe en el apartado anterior y se separaron en geles de agarosa desnaturizantes al 1 % (p/v) en tampón MOPS 1x. Tras la electroforesis, los geles se lavaron 3 veces durante 15 minutos en H₂O tratada con DEPC y 2 veces durante 20 minutos con SSPE 10X (NaCl 1.5 M, NaH₂PO₄ 0.1 M, EDTA 10 mM). Los geles se transfirieron a filtros IMMOBILON-NY+ (Millipore), utilizándose un aparato de transferencia por vacío Mini Horizontal Submarine Unit (Hoefer Scientific Instruments), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los procesos de prehibridación e hibridación con las distintas sondas y lavados se realizaron como en el apartado B 5.4. Para comprobar que todas las muestras contenían la misma cantidad de ARN, todos los filtros se hibridaron con el fragmento *HindIII-BamHI* de 580 pb del plásmido pAV1100 marcado radiactivamente, que codifica para la subunidad ARN de la ribonucleasa P de *Synechocystis* cuya expresión es constitutiva (Vioque, 1992). La detección de la radiactividad se llevó a cabo como en el apartado B 5.5.

D. SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

1. Expresión de proteínas en *E. coli*

La expresión de las proteínas recombinantes utilizadas en este trabajo se realizó clonando el gen que codifica la proteína de interés en un plásmido de expresión inducida (plásmidos de la serie pET (Novagen), inducibles por IPTG) o sin inducir

(plásmidos de la serie pBS). Se utilizó la estirpe BL21 de *E. coli*, para inducciones con IPTG, o bien la estirpe DH5 α para las no inducidas.

Para el caso de proteínas de expresión por inducción, las células se cultivaron a 37 °C en medio LB (apartado A 2.2) con el antibiótico apropiado, hasta alcanzar una D.O. de 0.5 a 600 nm. A continuación se indujo la expresión del gen por adición de IPTG 1 mM y se recogieron las células 3 horas más tarde mediante centrifugación.

Para el caso de proteínas de expresión no inducible, se cultivaron las células a 37 °C durante 10-12 horas y se recogieron mediante centrifugación.

2. Preparación de extractos celulares

2.1 Rotura con perlas de vidrio

La rotura de células mediante perlas de vidrio se realizó en caso de necesitar pequeñas cantidades de extracto. Para ello, se centrifugaron 1 ó 2 ml de cultivo en tubos eppendorf, y se resuspendió el precipitado en tampón Hepes 50 mM pH 7.0, KCl 50 mM. A esta suspensión se añadió una cantidad equivalente a 50 μ l de perlas de vidrio (0.25-0.30 mm de diámetro, Sigma Aldrich) por cada 100 μ l de tampón. La mezcla se sometió a 3 períodos de agitación vigorosa de 1 minuto, alternándolos con periodos de 1 minuto en hielo. Los restos celulares y las proteínas no solubles se separaron de la fracción soluble por centrifugación (13000 rpm, 15 minutos, 4 °C), constituyendo el sobrenadante el extracto crudo libre de células.

2.2 Rotura por ultrasonidos

Las células recogidas por centrifugación se resuspendieron en el tampón adecuado y se añadió fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM para inhibir proteasas de serina. Las suspensiones celulares mantenidas en hielo fueron sometidas a 10 pulsos de 30 segundos con ultrasonidos, alternándolos con periodos de 30 segundos en hielo. Los ultrasonidos fueron generados por un sonicador Branson (Reino Unido) modelo B12. La frecuencia utilizada fue de 20 kHz y la potencia de 40 W. Una vez concluido el tratamiento, la suspensión celular se sometió a centrifugación durante 30 minutos a 18000 rpm a 4 °C, constituyendo el sobrenadante el extracto crudo libre de células.

3. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas de los extractos crudos y de otras preparaciones libres de células se determinó según el método descrito por Bradford (Bradford, 1976) usando el reactivo para proteínas suministrado por BioRad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una recta patrón con concentraciones conocidas de la proteína comercial ovoalbúmina bovina (Sigma Aldrich).

Para las muestras de proteínas puras, se realizaron cuantificaciones mediante espectrofotometría a 595 nm en función del coeficiente de extinción molar de cada una de ellas.

Como método de validación de las medidas realizadas por ambos métodos, se realizaron estudios de densitometría de estas mismas muestras en geles SDS-PAGE teñidos con solución de tinción con Coomassie (ver apartado D 4.3) utilizando un scanner modelo de Bio-Rad 'GS-800 Calibrated-Densitometer'.

4. Electroforesis de proteínas

4.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

Las separaciones analíticas de proteínas en condiciones desnaturalizantes se realizaron en geles de poliacrilamida basados en el sistema de Laemmli (1970), como se describe en Sambrook *et al.* (1989), utilizando aparatos MiniPROTEAN® 3 CELL o Tetra CELL (BioRad), según las instrucciones del fabricante. El gel de separación, el de concentración y el tampón de electrodo contenían SDS (dodecil sulfato sódico) al 0.1 % (p/v). La concentración de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) en el gel de separación variaba entre el 12 y el 15 % (p/v) dependiendo de la masa molecular de las proteínas analizadas. El tampón usado para los geles de separación fue Tris-HCl 0.37 M pH 8.8. El gel de concentración contenía 4 % de acrilamida:bisacrilamida (29:1) usando tampón Tris-HCl 0.12 M pH 6.8. Las muestras se mezclaron con tampón de carga (Tampón Tris HCl 0.125 M pH 6.8, glicerol 20 % (v/v), SDS 4 % (p/v), β -mercaptoetanol 10 % (v/v), azul de bromofenol 0.0025 % (p/v)). La desnaturalización de las muestras se realizó calentando a 100 °C durante 5 minutos y la electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente aplicando un voltaje constante de 200 V durante 45-60 minutos.

Las separaciones de proteínas de baja masa molecular (<15 kDa) se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Schägger y von Jagow (1987), utilizando un gel de concentración que contenía poliacrilamida 6 % y un gel de separación que contenía poliacrilamida 15 % (acrilamida:bisacrilamida 48:1.5). Ambos geles contenían Tris-HCl 1 M pH 8.45, SDS 0.1 % (p/v). El gel de separación contenía además glicerol 16.7 %.

Se utilizaron los patrones de masa molecular del sistema comercial SDS-PAGE Standards Low Range® (BioRad), que presenta las siguientes proteínas: fosforilasa B de músculo de conejo (97.4 kDa), seroalbúmina bovina (66.2 kDa), ovoalbúmina de gallina (45.0 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31.0 kDa), inhibidor de tripsinógeno de semilla de soja (21.5 kDa) y lisozima de huevo de gallina (14.4 kDa).

4.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones nativas

La separación de proteínas en condiciones nativas se realizó de forma similar a la descrita en condiciones desnaturizantes. En este caso, se utilizó un gel de concentración que contenía poliacrilamida 1.5 % y un gel de separación que contenía poliacrilamida 6 % (acrilamida:bisacrilamida 48:1.5). No se añadió SDS en ninguna de las soluciones utilizadas para evitar la desnaturización de las muestras, de la misma forma que no se mezclaron las muestras con β -mercaptoetanol, ni se las sometió a incubación a 100 °C. La electroforesis se desarrolló aplicando un voltaje constante de 150 V durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente.

Para realizar ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes, las muestras que contenían GSI y factores inactivantes en tampón de interacción Hepes-NaOH 50 mM pH 7, KCl 50 mM se sometieron a electroforesis nativa. Las proteínas utilizadas fueron cuantificadas previamente mediante espectrofotometría, de forma que se utilizaron para el ensayo 1.5 μ g de GSI y cantidades variables de IFs.

4.3 Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas fueron visualizadas en los geles mediante su fijación y tinción usando Brilliant Blue R-250 (Sigma Aldrich) 0.1 % (p/v), ácido acético al 10 % (v/v) y metanol al 40 % (v/v) en agua (solución de tinción con Coomassie). Tras 15 minutos de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaron varias veces con una solución

de metanol al 40 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v), en agua. Una vez concluido este tratamiento, las proteínas aparecían como bandas de color azul.

5. Inmunodetección de proteínas en membrana (Western Blot)

Para la detección específica de proteínas mediante la inmunorreacción con anticuerpos policlonales, las muestras proteicas fueron sometidas a electroforesis como se indica en los dos apartados anteriores. Durante la electroforesis se usaron los patrones preteñidos de masa molecular conocida de la preparación comercial SeeBlue (Invitrogen). Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas Trans-Blot® Transfer Medium (Bio-Rad) de 0.45 µm de diámetro de poro, usando un sistema de transferencia TE 77 Semi-dry Transfer Unit (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se realizó a temperatura ambiente durante 60 min, a 2.5 mA por cm² de gel y a un máximo de 20 V, humedeciendo tanto el gel como la membrana de nitrocelulosa en tampón de transferencia (Tris-HCl 49.4 mM pH 8.3, glicina 39 mM, SDS 1.3 mM y metanol 20 % (v/v)). La eficiencia de la transferencia se comprobó por la desaparición de los patrones preteñidos del gel y por la tinción del gel con solución de Coomassie una vez transferido.

Tras la transferencia, la membrana se incubó durante al menos 1 hora con una solución bloqueante (Leche desnatada en polvo Central Lechera Asturiana 5 % (p/v), Tween 20 0.1 % y tampón PBS (NaCl 26 mM, KCl 0.54 mM, Na₂HPO₄ 0.8 mM, KH₂PO₄ 0.352 mM)). A continuación se incubó la membrana con antisuero -diluido en una concentración que dependía del anticuerpo usado- en solución bloqueante durante 15 horas a 4 °C, en agitación suave constante. Posteriormente, la membrana se lavó cuatro veces durante 15 minutos en solución de lavado (Tampón PBS, Tween 20 al 0.1 % (v/v)) tras lo cual se incubó en solución bloqueante con anticuerpos de cabra Anti-RabbitIgG (whole molecule)-Peroxidase (Sigma Aldrich), durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante. Seguidamente, se repitió el proceso de lavado descrito anteriormente.

La detección de la actividad peroxidasa se realizó utilizando el sistema comercial Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6. Purificación de proteínas

Las proteínas purificadas en este trabajo fueron etiquetadas con una secuencia adicional de histidinas y se purificaron a partir del extracto crudo en dos pasos cromatográficos.

6.1 Cromatografía de afinidad por níquel

La cromatografía de afinidad por níquel se llevó a cabo utilizando o bien una columna de plástico modelo Poly-Prep® Chromatography Columns (BioRad) de 0.8 x 4 cm, en la cual se empaquetó la resina Ni-NTA (Invitrogen) hasta 1 cm de altura, o bien empleando columnas HisTrap™ HP de 1ml (GE Healthcare) conectadas al sistema FPLC Äkta de GE Healthcare siguiendo instrucciones del fabricante. En ambos casos las columnas se lavaron con 5 volúmenes de columna de agua destilada, y se cargaron con una solución de NiSO₄ 50 mM, cuando fue necesario. En estas columnas de afinidad se utilizaron dos tipos de tampones: el tampón de equilibrado y lavado, que se utilizó para el equilibrado de la columna, para unir las proteínas a la matriz así como para lavarla posteriormente eliminando posibles interacciones inespecíficas, y el tampón de elución, usado para hacer eluir la proteína como consecuencia de la competencia del imidazol en la unión al níquel.

Las proteínas silvestre y mutantes de GSI (tanto de *Synechocystis* como de *A. variabilis*) fueron purificadas por cromatografía de afinidad usando los siguientes tampones:

- Tampón de equilibrado y lavado: Hepes-NaOH 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 20 mM.
- Tampón de elución: Hepes-NaOH 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 0.5 M, Imidazol 0.5 M.

Las proteínas silvestre y mutantes de IF7, IF17 e IF7A fueron purificadas por cromatografía de afinidad usando los siguientes tampones:

- Tampón de equilibrado y lavado: Tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.4, NaCl 0.5M, Urea 8M, Imidazol 5 mM.
- Tampón de elución: Tampón fosfato sódico 20 mM pH 7.4, NaCl 0.5M, Urea 8M, Imidazol 0.5 M.

6.2 Cromatografía de exclusión molecular

Una vez realizada la cromatografía de afinidad por níquel detallada en el apartado anterior, las fracciones enriquecidas en la proteína de interés fueron sometidas a cromatografía de exclusión molecular (también llamada filtración en gel), un segundo proceso de cromatografía en el que las moléculas en solución son separadas en función de su tamaño (más concretamente, de su volumen hidrodinámico que depende tanto del tamaño como de la forma de la molécula). Para ello, se utilizó una columna HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) para la purificación de los factores inactivantes o HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) para la purificación de las glutamina sintetasas, en un sistema FPLC Äkta de GE Healthcare según instrucciones del fabricante. El diámetro interno de cada columna era de 16 mm, y contenía perlas de agarosa porosa unidas covalentemente a dextranos, en la que se podían separar proteínas cuya masa molecular estuviese comprendida entre 3 y 70 kDa en el caso de la columna S75, o entre 10 y 600 kDa para la columna S200. La columna se equilibró con dos volúmenes del tampón adecuado para cada proteína, que previamente se filtró y se desgasificó por vacío para eliminar impurezas y gases. Se utilizó el mismo tampón para los procesos de lavado y elución.

Las proteínas silvestre y mutantes de GSI (tanto de *Synechocystis* como de *A. variabilis*) fueron purificadas por filtración en gel usando Hepes-NaOH 50 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM. Las proteínas silvestre y mutantes de IF7 fueron purificadas por filtración en gel usando Hepes-NaOH 25 mM pH 7.0, NaCl 150 mM. Las proteínas silvestre y mutantes de IF17 fueron purificadas por filtración en gel usando Hepes-NaOH 25 mM pH 7.0, NaCl 150 mM, Urea 2M.

Las proteínas purificadas en este trabajo se recogen en la Tabla 8.

Proteína	Descripción	Plásmido de expresión
IF7A	IF7A de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.	pAN7
IF7	IF7 de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	p7WT
IF7-R8E	IF7 con la mutación R8E.	pR8E
IF7-K19E	IF7 con la mutación K19E.	pK19B
IF7-R21E	IF7 con la mutación R21E.	pR21B
IF7-R28E	IF7 con la mutación R28E.	pR28E
IF7-K48E	IF7 con la mutación K48E.	pK48B
IF17	IF17 de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	p17WT
IF17-R90A	IF17 con la mutación R90A.	p17-R90A
IF17-R90E	IF17 con la mutación R90E.	p17-R90E
IF17-K101A	IF17 con la mutación K101A.	p17-K101A
IF17-K101E	IF17 con la mutación K101E.	p17-K101E
IF17-K102E	IF17 con la mutación K102E.	p17-K102E
IF17-R103A	IF17 con la mutación R103A.	p17-R103A
IF17-R103E	IF17 con la mutación R103E.	p17-R103E
IF17-R103K	IF17 con la mutación R103K.	p17-R103K
IF17-Q105A	IF17 con la mutación Q105A.	p17-Q105A
IF17-L108A	IF17 con la mutación L108A.	p17-L108A
IF17-R110A	IF17 con la mutación R110A.	p17-R110A
IF17-R110E	IF17 con la mutación R110E.	p17-R110E
IF17-G116A	IF17 con la mutación G116A.	p17-G116A
IF17-K132A	IF17 con la mutación K132A.	p17-K132A
IF17-K132E	IF17 con la mutación K132E.	p17-K132E
IF17-Y141A	IF17 con la mutación Y141A.	p17-Y141A

IF17-S149A	IF17 con la mutación S149A.	p17-S149A
IF17-AAA1	IF17 con la mutación YRG(5-7)AAA.	p17-AAA1
IF17-AAA2	IF17 con la mutación YRG(28-30)AAA.	p17-AAA2
IF17-AAA3	IF17 con la mutación YRG(52-54)AAA.	p17-AAA3
IF17-AB	IF17 con la mutación doble YRG(5-7)AAA y YRG(28-30)AAA.	p17-AB
IF17-BC	IF17 con la mutación doble YRG(28-30)AAA y YRG(52-54)AAA.	p17-BC
IF17-ABC	IF17 con la mutación triple YRG(5-7)AAA, YRG(28-30)AAA y YRG(52-54)AAA.	p17-ABC
GS-syn	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.	pHISGS
GS-var	GSI de <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413.	pGS-var
GS-Quimera 1	Proteína quimérica compuesta por 242 residuos del extremo amino terminal de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y 231 residuos del extremo carboxilo terminal de la GSI de <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413.	pGS-Q1
GS-Quimera 2	Proteína quimérica compuesta por 368 residuos del extremo amino terminal de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y 105 residuos del extremo carboxilo terminal de la GSI de <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413.	pGS-Q2
GS-Quimera 3	Proteína quimérica compuesta por 418 residuos del extremo amino terminal de la GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y 55 residuos del extremo carboxilo terminal de la GSI de <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	pGS-Q3
GS-E430A	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E430A.	pGS-E430A
GS-E444Q	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E444Q.	pGS-E444Q
GS-D452A	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación D452A.	pGS-D452A
GS-AQA	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con las mutaciones E430A, E444Q y D452A.	pGS-AQA
GS-E441A	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E441A.	pGS-E441A
GS-E448A	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E448A.	pGS-E448A
GS-E454A	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E454A.	pGS-E454A
GS-E466A	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E466A.	pGS-E466A

GS-E466Q	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E466Q.	pGS-E466Q
GS-E466K	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E466K.	pGS-E466K
GS-E466D	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E466D.	pGS-E466D
GS-E472A	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación E472A.	pGS-E472A
GS-N456K	GSI de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 con la mutación N456K.	pGS-N456K
GSvar-K457N	GSI de <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 con la mutación K457N.	pGS-K457N

Tabla 8. Proteínas purificadas durante la realización de este trabajo.

7. Concentración de preparaciones de proteína por ultrafiltración

La concentración de proteínas purificadas se realizó utilizando concentradores Amicon® Ultra (Millipore) de diferentes volúmenes (4 ml o 15 ml) y de diferentes tamaños de poro en función del tamaño molecular de la proteína (5, 10, 100 kDa). Estos concentradores fueron utilizados siguiendo las indicaciones del fabricante. Asimismo este sistema fue utilizado cuando era necesario cambiar la composición del tampón en uso.

E. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

1. Ensayo de actividad GS transferasa

1.1 Ensayo *in situ* de la GS

La actividad transferasa de la enzima glutamina sintetasa se estimó según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970). Para el ensayo *in situ*, un volumen de células equivalente a 5-10 µg de clorofila (para el uso de *Synechocystis*) o un volumen de 1 ml de un cultivo de una DO₆₀₀ aproximada de 1.2 (para el uso de *E. coli*), se recogieron por centrifugación a 12000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente, y se resuspendieron en 0.8 ml de mezcla de ensayo (Tampón HEPES-NaOH 66.7 mM pH 7.0, L-glutamina 40 mM, MnCl₂ 4 mM y ADP 0.5 mM). A esta suspensión se le añadieron 0.1 ml de una mezcla recién preparada de cloruro de hidroxilamina 1.2 M y NaOH 1.2 M en proporción 1:1 (v/v). Para permeabilizar las células se añadieron 20 µl de una solución de mezcla de bromuros de alquil-trimetilamonio (MTA) al 1.25 % (p/v) en agua y se agitaron vigorosamente durante 10 segundos. La reacción se inició por

adición de 50 μl de una solución de Na_2HAsO_4 0.4 M (arseniato). Como valores de referencia se realizaron ensayos en paralelo que contenían agua en lugar de arseniato. La mezcla de reacción se incubó durante 5 ó 10 minutos a 30 °C. La reacción se detuvo por adición de 2 ml de una solución de FeCl_3 en medio ácido (7.73 ml de HCl al 37 %, 12 g de ácido tricloroacético y 33.3 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en un volumen final de 1 litro con H_2O). Esta solución reacciona con el γ -glutamilhidroxamato producido en la reacción, formándose un producto coloreado cuya concentración se puede determinar espectrofotométricamente a 500 nm aplicando un coeficiente de extinción de $0.89 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Shapiro y Stadtman, 1970). Una unidad de actividad transferasa de GS se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un μmol de γ -glutamilhidroxamato por minuto en estas condiciones de ensayo.

1.2 Ensayo *in vitro* de la GS

Para la determinación de la actividad GS de extractos celulares o una determinada cantidad de GS purificada se realizó el mismo ensayo descrito en el apartado anterior exceptuando la adición de MTA.

1.3 Inactivación *in vitro* de la GS

En los ensayos de inactivación *in vitro* de la GS se utilizaron muestras de extractos crudos celulares o una cantidad constante de GSI purificada, incubadas con IFs purificados en cantidades crecientes. Las mezclas se realizaron usando tampón de interacción (Hepes 50mM, KCl 50 mM a pH 7.0 ó pH 8.5) en un volumen final de 20 μl . El ensayo de actividad GS se realizó como se describe en el apartado D 1.2.

F. ESTUDIO CRISTALOGRÁFICO DE LA GSI

1. Obtención de cristales de la GSI silvestre y del mutante GS-N456K de la GSI de *Synechocystis*.

Un cristal es una agrupación periódica y ordenada de objetos como átomos o moléculas. El paso limitante de la cristalografía es la obtención de cristales de un tamaño y consistencia adecuados para la difracción a alta resolución. El cristal debe ser lo suficientemente grande (mayor de 0.1 mm en las diferentes dimensiones), puro

en su composición y con una estructura regular, sin grietas u otras imperfecciones. Este tipo de cristal puede obtenerse de forma natural o mediante la adición de compuestos que estabilizan y/o precipitan la muestra. Los cristales proteicos son obtenidos, en su mayoría, a partir de solución, utilizando compuestos que disminuyen gradualmente la solubilidad de la molécula. De esta forma, el componente molecular pasa por dos estadios, la *nucleación* de cristales microscópicos formados por escasas moléculas, y el *crecimiento*, donde se alcanzan tamaños adecuados para la difracción (Chernov, 2003).

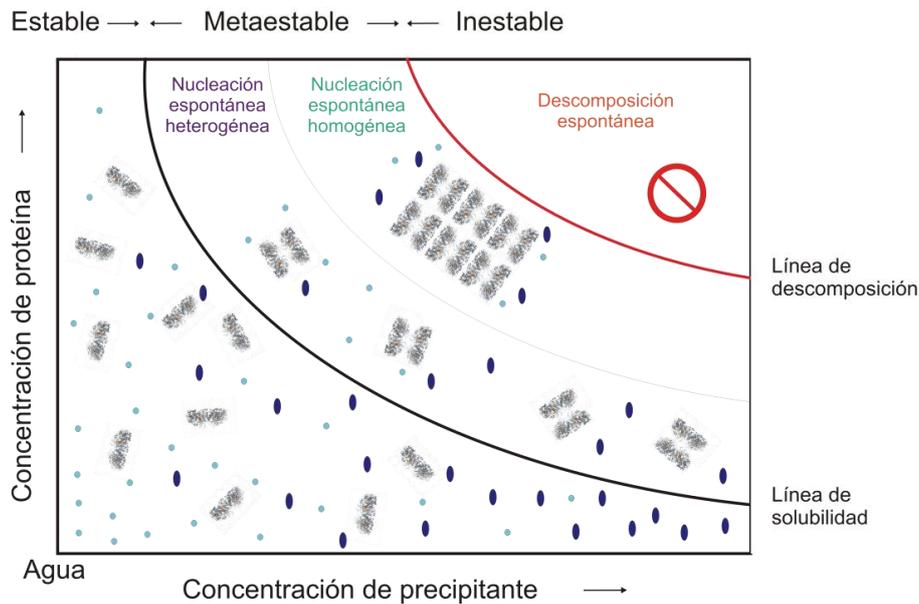


Figura 14. Diagrama de solubilidad de proteínas en la formación de cristales en presencia de precipitante.

En este diagrama se representa la localización de las zonas de nucleación en proceso de cristalización. Las moléculas de precipitante están coloreadas en azul oscuro y las moléculas de agua están coloreadas en azul claro. La supersaturación es necesaria para la formación espontánea de núcleos de cristalización estables (nucleación homogénea), pero requiere de la presencia de microcristales que se obtienen de una menor saturación (nucleación heterogénea).

En la Figura 14, se representa el cambio de solubilidad con el uso de precipitantes. La línea de solubilidad del diagrama de solubilidad separa la región donde la proteína se encuentra en “fase única” (proteínas en solución, sin organización inter-proteica), de la región de “fase doble” (proteínas en solución junto con solución saturada de proteínas en un equilibrio termodinámico). Sin embargo, es posible supersaturar la solución proteica. Esta supersaturación crea un estado metaestable,

donde el sistema no está en equilibrio, y puede ser inducida por adición de precipitantes a la solución de proteínas, por eliminación del agua de la solución proteína-precipitante mediante difusión de vapor, intercambio de solvente por diálisis, cambios de pH, etc. Como consecuencia, se forman núcleos de cristalización. La nucleación heterogénea viene dada por la formación de microcristales u otras redes de partículas, mientras que la nucleación homogénea se caracteriza por la formación de núcleos estables de cristalización, que podrían ser utilizados para la difracción posterior (Rupp, 2010).

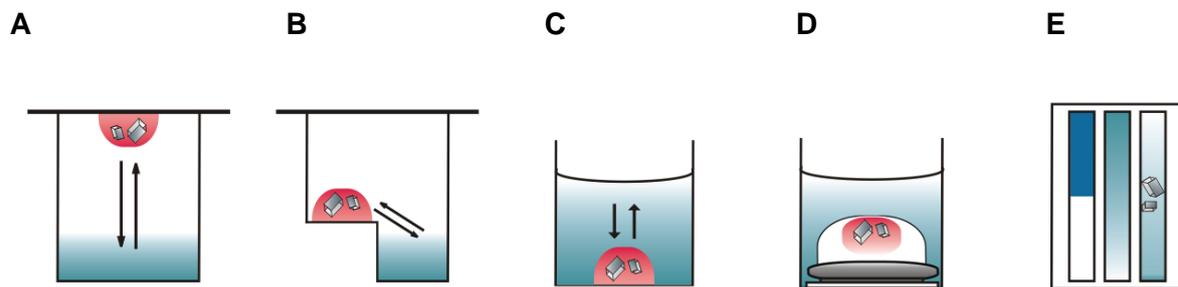


Figura 15. Técnicas para la obtención de cristales a partir de moléculas en solución.

A. Difusión de vapor en gota colgante. B. Difusión de vapor en gota sentada. C. Batch crystallization. D. Microdiálisis. E. Difusión de interfase libre. La solución del reservorio es la coloreada en azul. La solución de proteína coloreada en rojo contiene los mismos compuestos que el reservorio pero a concentraciones menores. La solución de proteína puede contener además trazas de metales o iones para aumentar el rendimiento de la cristalización.

Resulta tedioso identificar las condiciones que favorecen la nucleación y el crecimiento para la obtención de cristales óptimos. Es por ello que se recurre a métodos de criba, que consisten en la adición a la muestra de una gran batería de moléculas en solución testadas en estudios previos (Chayen, 2005). La disminución de la solubilidad de la muestra puede ser debida a uno o varios mecanismos físicos, como el cambio de pH o temperatura, la presencia de sales o compuestos químicos que disminuyen la constante dieléctrica de la solución, o el uso de polímeros como el polietilenglicol que expulsan la molécula de la solución por efectos entrópicos. Este método experimental requiere grandes cantidades de proteína, así como una alta concentración de la misma.

Se han realizado pruebas de cristalización con varias preparaciones proteicas de la GSI de *Synechocystis*, silvestre o mutantes. Se han obtenido cristales de las

preparaciones de GSI silvestre y del mutante N456K de la GSI. Ambas proteínas fueron purificadas siguiendo la metodología descrita en el apartado 6 a unas concentraciones de 11.25 y 10.64 mg/ml, respectivamente.

La obtención de cristales a partir de una molécula en solución puede llevarse a cabo mediante varias técnicas, cuyo objetivo, en definitiva, es aumentar la concentración molecular y facilitar el proceso de nucleación. Las más habituales se representan en la Figura 14. Existen diferentes categorías en el proceso de cristalización, la técnica de difusión de vapor (15A y B), la cristalización por lotes (*Batch crystallization*) (15C), la diálisis (15C), y la difusión de interfase libre (15E). Dos de los métodos más usados para la cristalización de proteínas se encuentran englobados en la primera categoría y se denominan gota colgante (o *hanging drop*) y gota sentada (o *sitting drop*) (Figura 15A y B). Ambos suponen la colocación de una gota que contiene proteína purificada, tampón y solución precipitante. El reservorio está ocupado por un tampón y precipitante similares a los que se encuentran en la gota pero a concentraciones más altas. De esta forma, en un primer lugar, la gota presenta una concentración de precipitante insuficiente para la nucleación, pero la vaporización de agua desde la gota y su transferencia hasta el reservorio provocan un aumento de la concentración de forma gradual hasta alcanzar niveles óptimos para la cristalización. Tanto la técnica de gota colgante como la de gota sentada requieren que el sistema esté cerrado herméticamente mediante resina. Como resultado, cada molécula individual de proteína se organiza en series repetitivas de una “celda unidad” adoptando una orientación determinada. La celda unidad se define como bloques repetitivos de un cristal que comprenden una matriz única acorde a la simetría o “grupo espacial” que presenta el cristal (Rupp, 2010). Esta matriz cristalina se mantiene mediante interacciones no covalentes (Rhodes, 1993).

Las proteínas purificadas fueron sometidas a un proceso de cristalización por el método de difusión de vapor por ‘hanging drop’ o gota colgante, utilizando para ello el sistema automático Mosquito^R (TTP LabTech). Para el primer análisis de cristalización se usaron kits comerciales (*screenings*) suministrados por Qiagen (The PACT Suite, The Protein Complex Suite, The AmSO₄ Suite, The ComPAS Suite, The JCSG+ Suite), Hampton Research (IndexTM, Crystal ScreenTM I y II, Crystal ScreenTM Cryo, SaltRxTM) y Emerald BioSystems (Wizard I y II random sparse matrix crystallization screen). Se obtuvieron cristales en las condiciones detalladas en la Tabla 9.

Proteína	Tampón de la muestra	Condición
GSI 11.25 mg/ml	Hepes 10 mM pH 8.0 MnCl ₂ 5 mM AMP-PNP 1 mM	Protein Complex Suite B2: Calcium acetone 0.1 M pH 4.5 Sodium acetate 0.1 M PEG 4000 10 % (p/v)
N456K 10.64 mg/ml	Tris-HCl 25 mM pH 8.0	Wizard I-II H7: Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 MnCl ₂ 0.2 M PEG 8000 10 % (p/v)
N456K 10.64 mg/ml	Tris-HCl 25 mM pH 8.0	Protein Complex Suite B2 : Calcium acetone 0.1 M pH 4.5 Sodium acetate 0.1 M PEG 4000 10 % (p/v)

Tabla 9. Condiciones de cristalización de las proteínas estudiadas.

Una vez obtenidos los cristales, éstos deben ser fijados a soportes adecuados para la difracción posterior. Para la conservación y la difracción de los cristales éstos son congelados de forma rápida en nitrógeno líquido, que reduce el daño por radiación. Para evitar la formación de hielo en el interior del cristal al congelarlo, es necesario el uso de crioprotectores, como el glicerol, el polietilenglicol o sales, que se mezclan con la solución en la que se encuentra el cristal antes de colocarlo en el soporte. Para el mantenimiento y crioprotección de los cristales obtenidos a partir de GS silvestre y mutante de *Synechocystis*, se empleó glicerol al 30 % (v/v). El soporte utilizado consiste en un capilar de cristal o un lazo hecho de nylon o plástico, que una vez que contiene el cristal, se coloca en el goniómetro. Este aparato es un sistema rotatorio que permite el posicionamiento correcto y centrado del cristal en el haz de rayos X, y está asociado a una bomba que aporta nitrógeno líquido al cristal de forma continua.

Sobre el cristal, colocado en el goniómetro, se hace incidir un haz de rayos X, generado por dos fuentes alternativas: difractor o sincrotrón. Los difractómetros son aparatos de un tamaño relativamente pequeño, que son utilizados frecuentemente en laboratorios para comprobar el estado y la calidad de los cristales. El sincrotrón es un tipo particular de acelerador de partículas cíclico en el que el campo magnético y el

eléctrico están sincronizados con el haz de partículas. Es el sistema más potente y más usado como fuente de rayos X ya que genera una gran cantidad de energía, permitiendo así obtener la mejor resolución.

Los mejores cristales obtenidos en este trabajo fueron difractados en un difractómetro de rayos X del Molecular Biology Institute en University of California Los Angeles (UCLA) en Los Angeles. Aquellos cristales que difractaron a una resolución menor a 4 Å, fueron analizados en el sincrotrón Advance Photon Source (APS) en Chicago, donde se colectaron los datos de difracción.

Cuando un cristal es expuesto a un intenso haz de rayos X, éste es reflejado formando una red de puntos o “reflexiones” que pueden ser observados y recogidos en una pantalla colocada tras el cristal. Las intensidades relativas de estas reflexiones así como su posición proporcionan la información necesaria para determinar la localización de los átomos que conforman las moléculas presentes en el cristal. Los datos recogidos a partir de las diferentes reflexiones tras rotar el cristal, son utilizados para la resolución posterior de la estructura.

Las reflexiones obtenidas al difractar un cristal a un ángulo determinado forman una red de puntos en dos dimensiones. Esta red debe ser convertida en un modelo de densidad electrónica en tres dimensiones utilizando los datos obtenidos en todos los ángulos difractados. Cada punto de la red corresponde a un tipo diferente de variación en la densidad electrónica. Mediante el “indexado”, se determina qué variación corresponde a qué reflexión. Además, permite identificar las dimensiones de la celda unidad, representadas como a , b y c , así como determinar la simetría que presenta el cristal, también denominada “grupo espacial”. Posteriormente es necesario calcular la intensidad relativa de cada reflexión mediante el “integrado” y el “escalado” y cómo las variaciones pueden ser organizadas para dar lugar a la densidad electrónica de la proteína estudiada mediante la búsqueda de fase. Para la construcción de la estructura de las diferentes proteínas se usaron los programas informáticos detallados en la Tabla 10.

Programa	Función	Referencia
Denzo/Scalepack	Procesamiento de los datos obtenidos a partir de la difracción de los cristales	Otwinowski y Minor, 1997
Phenix	Refinamiento del modelo de la estructura	Afonine <i>et al.</i> , 2005
Coot	Construcción del modelo de la estructura	Emsley y Cowtan, 2005
PyMol TM	Visualización de los modelos de la estructura	DeLano Scientific LLC

Tabla 10. Programas informáticos utilizados para la resolución de estructuras.

La búsqueda de la fase para la obtención de un mapa de densidad electrónica que corresponda a la estructura terciaria o cuaternaria de la proteína cristalizada se puede realizar mediante cuatro métodos: los métodos directos, el reemplazamiento molecular, la dispersión de rayos X anómala (*Anomalous X-ray scattering* o MAD) y la utilización de metales pesados. La fase de los datos recogidos de las GSs silvestre y mutante de *Synechocystis* fue resuelta mediante reemplazamiento molecular. Este método consiste en el uso de información estructural previa de una proteína similar a la estudiada, para orientar y posicionar las moléculas dentro de una celda unidad. El mapa de densidad electrónica de la GS-N456K correspondiente a los datos difractados a 3.69 Å, fue obtenido mediante reemplazamiento molecular usando una molécula de la GS de *Mycobacterium tuberculosis* (archivo 2BVC.pdb; Krajewski *et al.*, 2005). El mapa de densidad electrónica de la GS silvestre fue elaborado utilizando una molécula de la GS-N456K previamente determinada. La molécula de AMP-PNP que fue utilizada para la cristalización de la GS silvestre fue modelada mediante reemplazamiento molecular a partir del archivo PDB de una molécula de AMP-PNP refinada a 1.25 Å (archivo 2QOC.pdb; Davis *et al.*, 2008) (Figura 16). El mapa de densidad electrónica de la GS-N456K a una resolución de 3 Å fue construido mediante reemplazamiento molecular utilizando una molécula de GSI silvestre de *Synechocystis*.

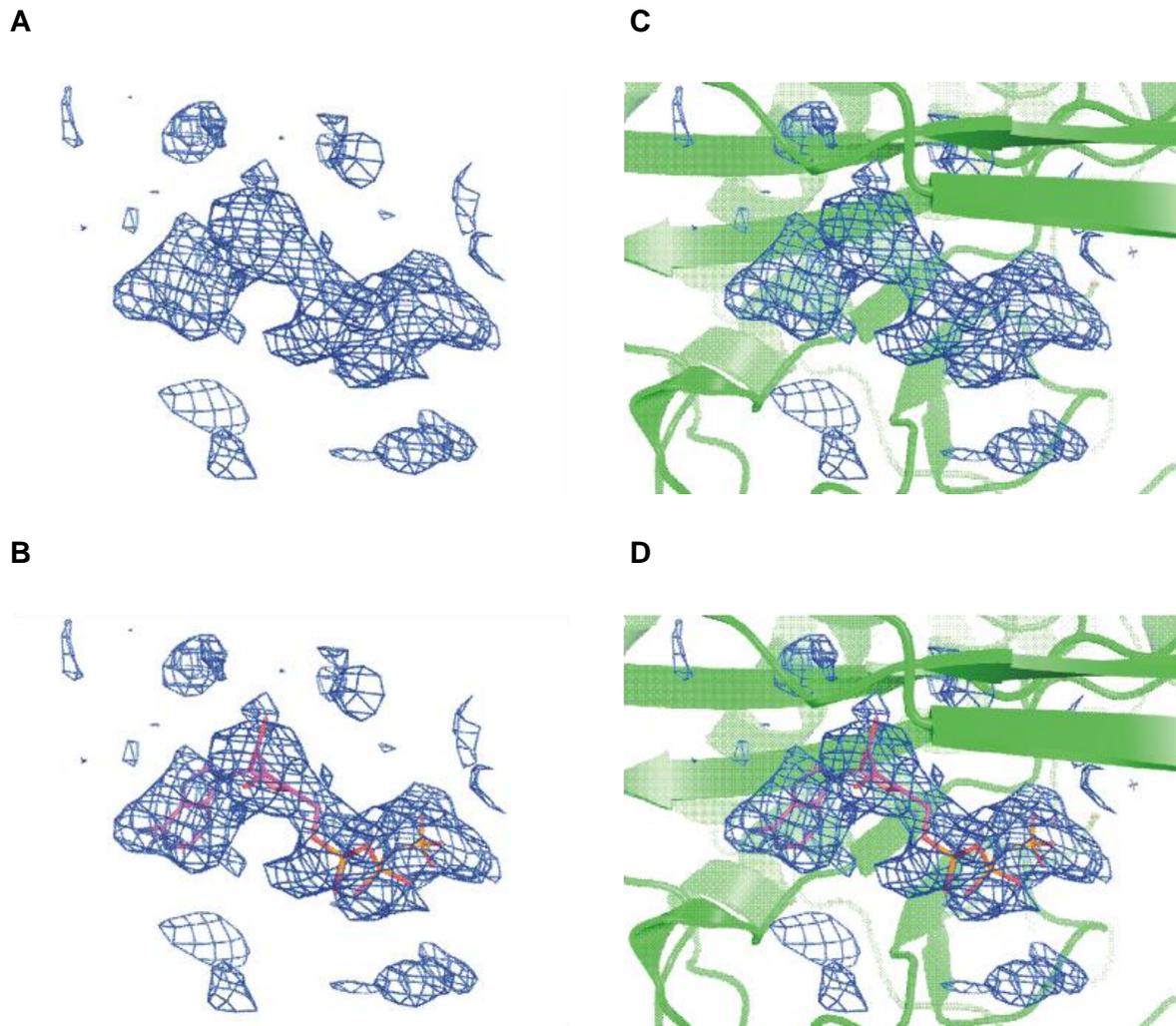


Figura 16. Refinamiento de la molécula de AMP-PNP localizada en el sitio activo de la GS silvestre.

A y B muestran el mapa de densidad electrónica F_o-F_c . C y D muestran el mapa de densidad electrónica en el sitio activo. La molécula de AMP-PNP está representada en forma de bastones.

La mejora de las fases mediante refinamiento va asociada a una disminución del valor R-factor, que mide la fiabilidad del modelo obtenido. Una medida de calidad similar al R-factor es el R-free, que es calculado a partir de un subconjunto de reflexiones obtenidas de la difracción del cristal (alrededor del 10 %) y que no están incluidas en el refinamiento de la estructura. Tanto el R-factor como el R-free dependen de la resolución de los datos. Sin embargo, ciertos problemas derivados de la calidad o la organización interna del cristal pueden afectar negativamente a estos valores.

G. OTROS MÉTODOS

1. Análisis de secuencias de ADN y proteínas

Para el análisis de las secuencias de los genes y de las proteínas de *Synechocystis* se utilizó la base de datos Cyanobase (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>) o en las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para la búsqueda de fases de lectura abierta, la localización de sitios de restricción y la traducción de secuencias de ADN a proteína, se empleó el programa DNA Strider, Versión 1.3, diseñado por Christian Mark (Service de Biochimie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, Francia). La búsqueda de similitud entre una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos y las secuencias existentes en las bases de datos se llevó a cabo mediante la aplicación BLAST en las direcciones de Internet

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> o <http://bacteria.kazusa.or.jp/cyano/cgi-bin/blast.cgi>.

Para el alineamiento de secuencias homólogas se empleó el programa Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).

Para el diseño de oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR se utilizó el programa informático Amplify 1.2 creado por B. Engels (Department of Genetics, University of Wisconsin, EE.UU.).

2. Determinación de la concentración 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 12000 rpm. El sedimento se resuspendió en 1 ml de metanol absoluto y tras mezclar la solución mediante agitación vigorosa durante 30 segundos, la preparación se centrifugó durante 2 minutos a 12000 rpm. Finalmente, se determinó la concentración de clorofila en el sobrenadante por su absorbancia a 665 nm, empleando un coeficiente de extinción de $74.46 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3. Medidas espectrofotométricas

Las medidas de absorbancia de luz visible o de luz ultravioleta se realizaron en un espectrofotómetro Biomate 5 (Thermo Electrón Corporation) o mediante Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

4. Medidas de pH

El pH de las disoluciones se determinó con un pH-metro, provisto de escala digital, modelo pH Meter Basic 20 (Crison).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LOS FACTORES INACTIVANTES

El mecanismo responsable de la regulación postraduccional de la glutamina sintetasa en cianobacterias implica la interacción reversible de esta enzima con dos proteínas inhibidoras denominadas factores inactivantes, IF7 e IF17 (Reyes y Florencio, 1995) (Figura 5, Introducción, apartado 2.3.1). Los factores inactivantes (IFs) fueron descubiertos en *Synechocystis* cuando la glutamina sintetasa de tipo I etiquetada con una cola de cinco histidinas fue copurificada en su estado inactivo junto con dos polipéptidos de 7 y 17 kDa (García-Domínguez *et al.*, 1999). Cada una de estas proteínas contribuye a la inactivación de la GSI *in vivo* e *in vitro*, aunque el máximo nivel de inactivación *in vivo* se obtiene en presencia de ambos factores. IF7 e IF17 son proteínas homólogas codificadas por dos genes diferentes, *gifA* y *gifB*, respectivamente. La expresión de los genes *gif* está regulada por la fuente de nitrógeno, siendo máxima en presencia de amonio. El promotor de los genes *gifA* y *gifB* presenta un sitio consenso de unión a NtcA (Introducción, apartado 2.3.1), situado a -7.5 y -30.5 pb aguas arriba del punto de inicio de la transcripción, respectivamente (García-Domínguez *et al.*, 2000). La proteína NtcA reprime la expresión de estos genes cuando las células crecen con una fuente limitada de nitrógeno combinado (García-Domínguez *et al.*, 2000).

Como hemos comentado en la Introducción, varios genomas cianobacterianos presentan ORFs homólogas a los genes *gif*, lo que nos sugiere que la regulación postraduccional de la GSI descubierta en *Synechocystis* puede extenderse a otras cianobacterias. Al analizar comparativamente las secuencias de aminoácidos derivadas de estas ORFs podemos distinguir dos grupos de IFs: aquéllos que son similares a IF7 (con 65-68 residuos) y los que son similares a IF17 (con aproximadamente 150 residuos) (Figura 17). La mayoría de las cianobacterias presentan el primer tipo, como por ejemplo es el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120 o *A. variabilis*, cuyos factores inactivantes se han denominado IF7A. Las secuencias de ambos tipos de proteínas presentan una región homóloga que corresponde a la parte carboxilo terminal de IF17 y la secuencia completa de IF7 de *Synechocystis*, lo que nos sugiere que, puesto que la función de ambos factores es la misma, esta región debe estar involucrada en la interacción con la GSI así como en la inactivación de dicha enzima.

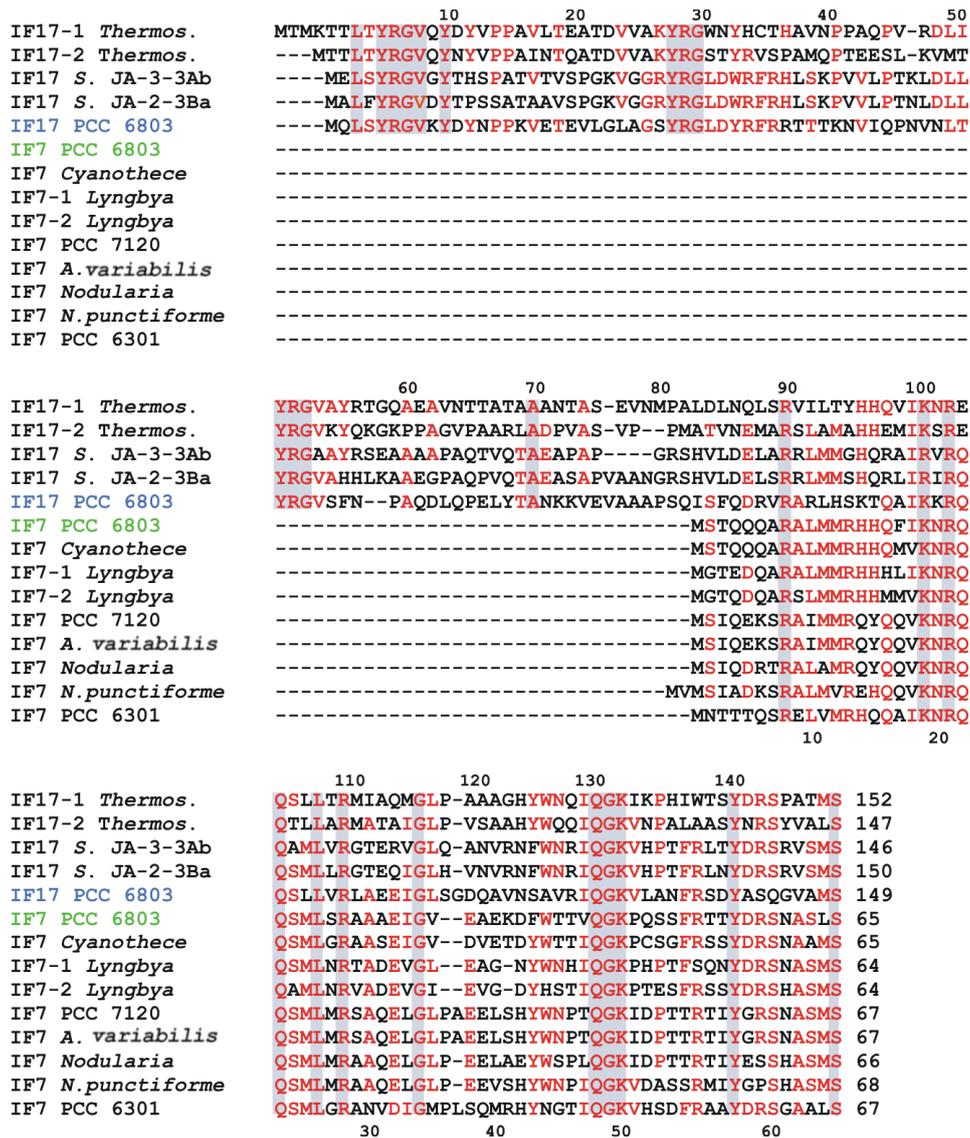


Figura 17. Alineamiento de proteínas homólogas a IF7 e IF17.

Los residuos conservados en 7 ó más secuencias homólogas a IF7 y a la zona carboxilo terminal de IF17, ambas de *Synechocystis* sp. PCC 6803, están marcados en rojo. Igualmente, los residuos conservados en 3 o más secuencias homólogas a la zona amino terminal de IF17 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 están marcados en rojo. Consideramos conservados los aminoácidos idénticos o los cambios isoleucina/leucina, glutamato/aspartato, arginina/lisina y serina/treonina. Los residuos idénticos en todas las secuencias están sombreados en gris. IF17: proteínas homólogas a IF17 de *Synechocystis*, denominada aquí como IF17 PCC 6803; IF7: proteínas homólogas a IF7 de *Synechocystis*, denominada aquí como IF7 PCC 6803; *Thermos.*, *Thermosynechococcus elongatus*; *S. JA-3-3Ab* y *JA-3-3Ba*, *Synechococcus JA-3-3Ab* y *JA-3-3Ba*, respectivamente; PCC 7120, *Anabaena* sp. PCC 7120; *N. punctiforme*, *Nostoc punctiforme*; PCC 6301, *Synechococcus elongatus* sp. PCC 6301. Para una mejor visualización de este alineamiento, se dispone en el anexo 1 de las secuencias alineadas en apaisado.

La inactivación dependiente de amonio de la GSI es un proceso reversible tanto *in vitro* como *in vivo* (Mérida *et al.*, 1991b). En un ensayo de inactivación *in vitro* podemos observar que al aumentar el pH o la fuerza iónica, el complejo GSI/IFs se desorganiza, reactivándose así la enzima, lo cual indica que la interacción entre la GSI y los factores inactivantes es de tipo electrostático (Mérida *et al.*, 1991b).

En ensayos de inactivación *in vivo*, la GSI se reactiva completamente entre 10 y 15 minutos después de eliminar el amonio del medio. Gracias a estudios *in vitro* con extractos crudos de diferentes estirpes de *Synechocystis*, se pudieron observar diferencias entre los IFs en cuanto a su estabilidad y se comprobó que IF7 es degradado *in vitro* por la acción de metaloproteasas. La implicación de estas proteínas en la degradación *in vivo* de IF7 fue demostrada usando mutantes que carecían de varias metalopeptidasas de *Synechocystis*. Por otro lado, la presencia de amonio en el medio incrementa la estabilidad de IF17, pero no de IF7 (Galmozzi *et al.*, 2007). Puesto que el extremo carboxilo terminal de IF17 es homólogo a IF7, se estableció como hipótesis que la región amino terminal del factor IF17 podría ser la responsable de las diferencias de estabilidad observadas.

En este trabajo hemos realizado un análisis de los factores inactivantes mediante mutagénesis dirigida con el objeto de identificar los residuos que intervienen en la interacción con la glutamina sintetasa o que afectan a la estabilidad de los IFs. Para facilitar la comprensión de este análisis hemos dividido esta sección en dos apartados. El primero está referido al análisis de la región homóloga entre IF17 e IF7, presumiblemente implicada en la interacción e inactivación de la GSI. El segundo se centra en el estudio de la región amino terminal de IF17, posiblemente responsable de las diferencias observadas en la estabilidad de ambos factores.

1.1 Estudio de la región homóloga entre IF7 e IF17

En la región homóloga entre IF7 e IF17 se encuentra un número destacado de residuos conservados (Figura 17) que han sido objeto de mutagénesis en este trabajo. El análisis de los mutantes obtenidos se ha realizado tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.1.1 Análisis *in vitro*

Para la obtención de las versiones mutantes de los genes *gif* de *Synechocystis* se realizaron PCR estándar y PCR en tres fases, detalladas en la sección de

Materiales y métodos (apartado B 3.5). Los fragmentos de ADN que contenían el gen *gif* portador de la correspondiente mutación fueron digeridos con *NdeI-BamHI* y clonados en un plásmido de expresión inducible por IPTG, digerido con las mismas enzimas. El plásmido utilizado fue pET28a, que incorpora una secuencia codificante de 6 Histidinas en el extremo 5' del inserto. La adición de 6 histidinas en el extremo amino terminal de la proteína de interés permitirá su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad por níquel. Cada una de las construcciones obtenidas (Tabla 6, Materiales y métodos, apartado B 1.1) fue utilizada para transformar la estirpe BL21 de *E. coli*, procediéndose a la expresión de las proteínas mediante inducción con IPTG y a la purificación de las mismas mediante cromatografía de afinidad por níquel, seguida de cromatografía de exclusión molecular (Materiales y métodos, apartado D 6). Las preparaciones de proteínas purificadas (Tabla 8, Materiales y métodos, apartado D 6.2) fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (Materiales y métodos, apartado D 3).

1.1.1.1 Análisis de la región carboxilo terminal de IF17

El estudio de la región carboxilo terminal de IF17 se basó en la sustitución de residuos conservados en las diferentes proteínas homólogas por un residuo de alanina, por un residuo de glutamato o por ambos. Se analizaron las proteínas mutantes y silvestre de IF17 mediante ensayos de inactivación *in vitro* de la GS (Materiales y métodos, apartado E 1.3). Para ello, se incubó una cantidad fija de GSI de *Synechocystis* con cantidades crecientes de los diferentes factores inactivantes purificados en tampón de interacción (Hepes-NaOH 50 mM pH 7, KCl 50 mM) en un volumen final de 20 μ l. Tras medir la actividad GS de estas preparaciones, se representó el % de actividad GS frente a la concentración de factores inactivantes de la muestra. Se considera que el 100 % de actividad GS corresponde a la absorbancia obtenida en el primer punto del ensayo, que contiene glutamina sintetasa en ausencia de factores inactivantes. Los resultados obtenidos usando las diferentes proteínas silvestre y mutantes de IF17 se muestran aquí en dos gráficas. En la Figura 18 se representan los resultados del ensayo *in vitro* de los mutantes que presentan una sustitución de algún residuo por alanina (Figura 18A) o por glutamato (Figura 18B).

La sustitución de tres residuos de arginina, presentes en la región carboxilo terminal de IF17, por glutamato, provoca una disminución notable en la capacidad de inactivación de la GS. Estos tres residuos de arginina son los localizados en las posiciones 90, 103 y 110 de IF17 de *Synechocystis*. Las proteínas mutantes IF17-

R90E, IF17-R103E e IF17-R110E a una concentración de 1.65 μM provocan una inactivación de la GS hasta alcanzar un 46 %, 29 % y 58 % de la actividad inicial, respectivamente, frente al 1.5 % que se observa cuando incubamos la GSI con la proteína silvestre IF17. La disminución de inactivación observada cuando cambiamos dichos residuos de arginina por una alanina es menor. Para determinar si la pérdida de funcionalidad es consecuencia del cambio de carga que implica la sustitución por glutamato o de la sustitución propiamente dicha, se diseñó, expresó y purificó una proteína derivada de IF17 con la mutación R103K, que mantiene la carga tras la sustitución. Esta proteína muestra una capacidad de inactivación de la GS similar a la proteína silvestre (Figura 18).

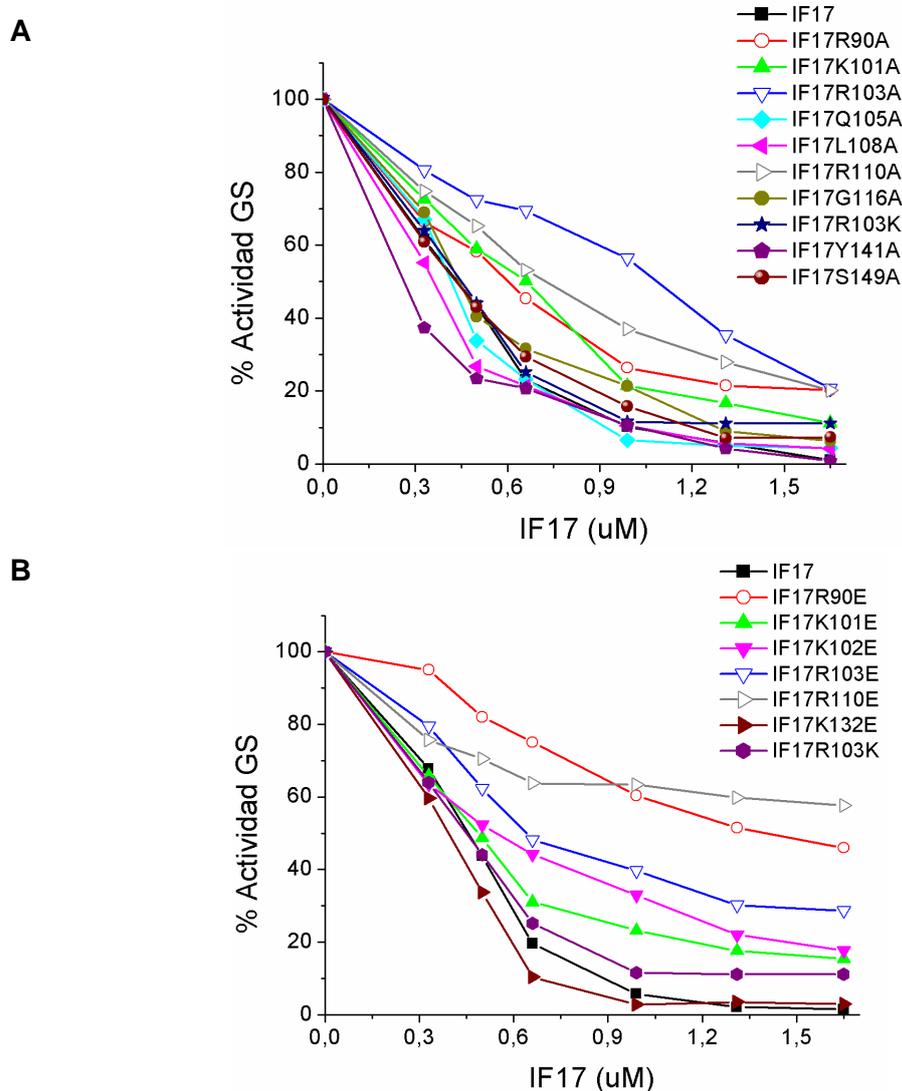


Figura 18. Inactivación *in vitro* de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con IF17 y sus versiones mutantes.

Las proteínas mutantes analizadas fueron obtenidas por sustitución de diferentes residuos por alanina (A) o glutamato (B). Se utilizaron cantidades crecientes de cada proteína para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura (1 μM).

Como hemos visto, al sustituir los residuos de Arg90, Arg103 y Arg110 por glutamato se ha reducido la capacidad inactivante de IF17. Para precisar si esta reducción es debida a una pérdida de interacción, se realizaron ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes (Materiales y métodos, apartado D 4.2) (Figura 19). Los ensayos de retardo en gel permiten observar de manera experimental la interacción entre proteínas, ácidos nucleicos o ambos. En un gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes, las proteínas se encuentran en su conformación nativa, ocupando una posición en el gel que depende de su tamaño y carga. Cuando dicha proteína forma un complejo con otra proteína, el tamaño y la carga varían y la posición relativa en el gel en condiciones no desnaturizantes se ve modificada. Así, en ausencia de factor inactivante, la GS aparece como una única banda, mientras que al añadir IF, el complejo GS-IF presenta una migración más lenta que depende de la relación GS:IF que presente (el retardo observado en el gel aumenta gradualmente conforme se incrementa la concentración de IF, hasta alcanzar un máximo).

En los ensayos de retardo en gel presentados en la Figura 19 podemos advertir que las proteínas mutantes IF17-R90E, IF17-R103E y IF17-R110E no alteran la movilidad electroforética de la GS. Dicha movilidad si se ve retrasada en presencia de IF17 ó IF17-R103K.

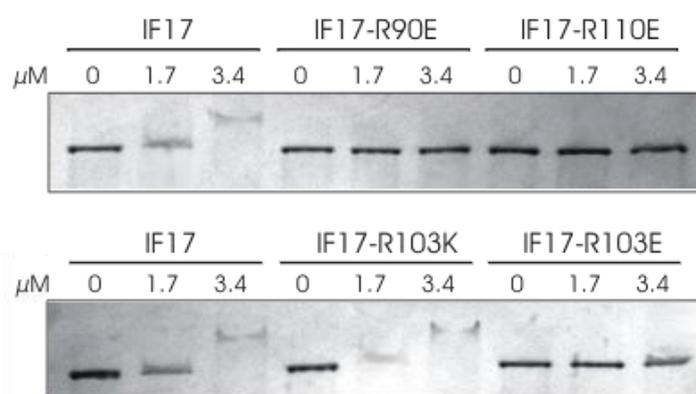


Figura 19. Ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 incubada con cantidades crecientes de IF17, IF17-R90E, IF17-R103E, IF17-R103K e IF17-R110E.

Se utilizó una cantidad fija de GSI (1.5 μ g) incubada con diferentes cantidades de factor inactivante.

Con los datos de los ensayos de inactivación *in vitro* y retardo en gel, podemos concluir que los residuos Arg90, Arg103 y Arg110 intervienen en la interacción de IF17 con la GSI de *Synechocystis* y su posterior inactivación *in vitro*.

1.1.1.2 Análisis de IF7

Gracias a estudios previos de IF7 de *Synechocystis* mediante mutagénesis dirigida, se determinó que los residuos K19 (homólogo al K101 de IF17) y R21 (homólogo al R110 presente en IF17) son críticos para la funcionalidad del factor inactivante tanto *in vitro* como *in vivo*. Una tercera proteína mutante analizada, IF7-K48E, mostró una capacidad inactivante similar a IF7 silvestre (Galmozzi, 2008). Tras haber probado que los residuos de arginina 90, 103 y 110 de IF17 intervienen en la interacción con la GSI y su inactivación *in vitro*, y teniendo en cuenta el análisis mutacional previo realizado en nuestro laboratorio, procedimos a completar el estudio de IF7 de *Synechocystis* mediante mutagénesis dirigida. Se decidió así diseñar, expresar y purificar las versiones mutantes de las dos argininas homólogas restantes (R8 y R28), obtenidas por sustitución por glutamato.

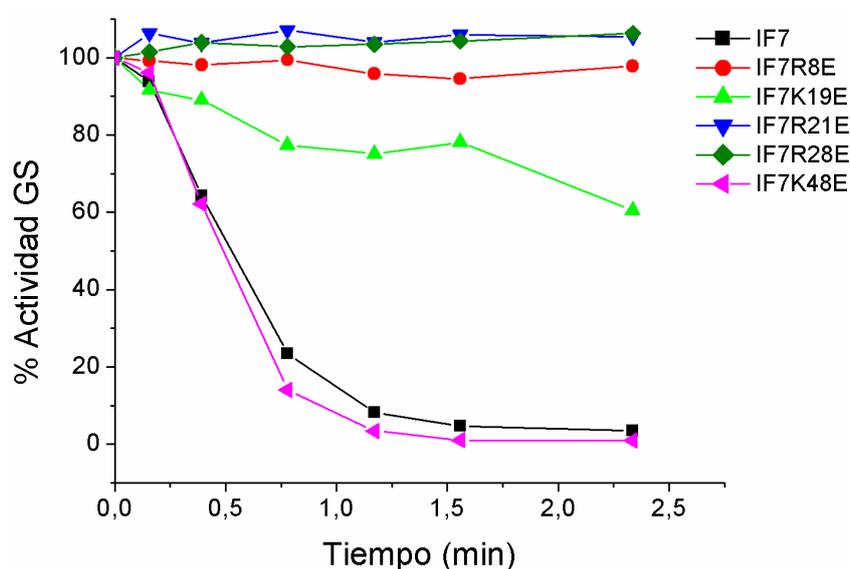


Figura 20. Inactivación *in vitro* de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con IF7 y sus versiones mutantes indicadas.

Se utilizaron cantidades crecientes de cada IF para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura (1 μ M).

Las proteínas mutantes purificadas fueron analizadas mediante ensayo de inactivación *in vitro* de GSI de manera similar al descrito para el estudio de IF17 (Figura 20). Como se puede observar en la gráfica, la pérdida de inactivación que se obtiene al sustituir los residuos de arginina 8, 21 y 28 de IF7 por glutamato es más drástica que la observada para las sustituciones homólogas en IF17. Las muestras que contienen las proteínas mutantes IF7-R8E, IF7-R21E o IF7-R28E, a una concentración de 2.3 μM , y la GSI de *Synechocystis* presentaron una actividad del 100 % frente al 3 % que mostraba la GSI en presencia de IF7 silvestre a la misma concentración. Estos resultados indican que las argininas 8, 21 y 28 de IF7 de *Synechocystis*, homólogas a las respectivas 90, 103 y 110 presentes en IF17, son críticas para la inactivación de la GSI de *Synechocystis*. La proteína IF7-K19E comparte el mismo comportamiento intermedio de inactivación de la GSI reflejado en el mutante homólogo IF17-K101E.

Siguiendo el mismo procedimiento que el realizado para IF17, se han llevado a cabo ensayos de retardo en gel para mostrar la capacidad de interacción de estas proteínas mutantes con la GSI de *Synechocystis* (Figura 21).

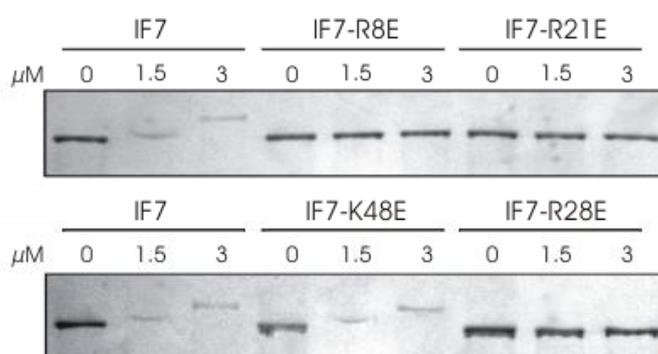


Figura 21. Ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 incubada con cantidades crecientes de IF7, IF7-R8E, IF7-R21E, IF7-R28E e IF7-K48E.

Se utilizó una cantidad fija de GSI (1.5 μg) incubada con diferentes cantidades de factor inactivante.

In vitro, las proteínas IF7-R8E, IF7-R21E e IF7-R28E no cambian la movilidad electroforética de la GS, al igual que ocurría con las proteínas IF17-R90E, IF17-R103E e IF17-R110E (Figura19).

Con los resultados de los ensayos *in vitro* de inactivación de la GS así como los retardos en gel podemos deducir que los residuos Arg8, Arg21 y Arg28 de IF7 son críticos para la interacción del factor inactivante con la GSI de *Synechocystis*, así como para la inactivación.

1.1.2 Análisis *in vivo*

Con objeto de estudiar el efecto *in vivo* de algunas de las mutaciones puntuales de los genes *gif* analizadas *in vitro*, se utilizaron las versiones mutantes de dichos genes para transformar la estirpe SLIF de *Synechocystis*, carente de ambos factores inactivantes debido al reemplazo de los genes *gif* por genes de resistencia a antibióticos (García-Domínguez *et al.*, 1999). Para generar estirpes mutantes de *Synechocystis* con sustituciones puntuales en el gen *gifA*, se utilizó el plásmido pSIF2, que contiene un fragmento de 1964 pb conteniendo dicho gen y sus regiones adyacentes. En este plásmido se sustituyó la versión silvestre del gen *gifA* por las diferentes versiones mutantes. En el caso de las estirpes mutantes de *Synechocystis* con sustituciones puntuales en el gen *gifB*, se utilizó el plásmido pLIF10-*SpeI*, que contiene un fragmento de 1995 pb conteniendo el gen *gifB* y sus regiones adyacentes. En este plásmido se sustituyó la versión silvestre del gen por las diferentes versiones mutantes. A los plásmidos así obtenidos se les insertó un cassette de resistencia a espectinomicina y estreptomomicina, que permite seleccionar las colonias transformantes. Los mutantes obtenidos fueron estudiados fenotípicamente y genotípicamente.

Se determinó la correcta integración del gen *gif* correspondiente en el genoma y el grado de segregación de las versiones mutantes mediante análisis por Southern blot (Materiales y métodos, apartado B 6), utilizando como sonda el fragmento genómico obtenido por PCR con los oligonucleótidos LIF1/LIF5, para los mutantes del gen *gifB*, o SIF1/SIF5, para los mutantes del gen *gifA*. Con objeto de comprobar que las mutaciones introducidas en los genes *gif* no afectan a su expresión, se cuantificó la acumulación de transcrito de estos genes en una cinética de inactivación por adición de amonio mediante Northern blot (Materiales y métodos, apartado C 4). Se utilizaron como sondas los mismos fragmentos anteriormente descritos.

La capacidad inactivante de las proteínas mutantes en las estirpes obtenidas se determinó en función de la actividad GS observada en una cinética de inactivación. Para ello, las células fueron cultivadas en medio BG11C, con nitrato como fuente de nitrógeno, y fueron tratadas con amonio durante 2 horas (para las estirpes con versiones mutantes de IF17) o 9 horas (para las estirpes con versiones mutantes de IF7). La adición de amonio a un cultivo con nitrato como fuente de nitrógeno provoca una disminución rápida de la actividad GS en la estirpe silvestre de *Synechocystis* (Mérida *et al.*, 1991b). Se recogieron alícuotas del cultivo durante toda la cinética para su posterior análisis mediante ensayo de actividad *in situ* de la GS (Materiales y

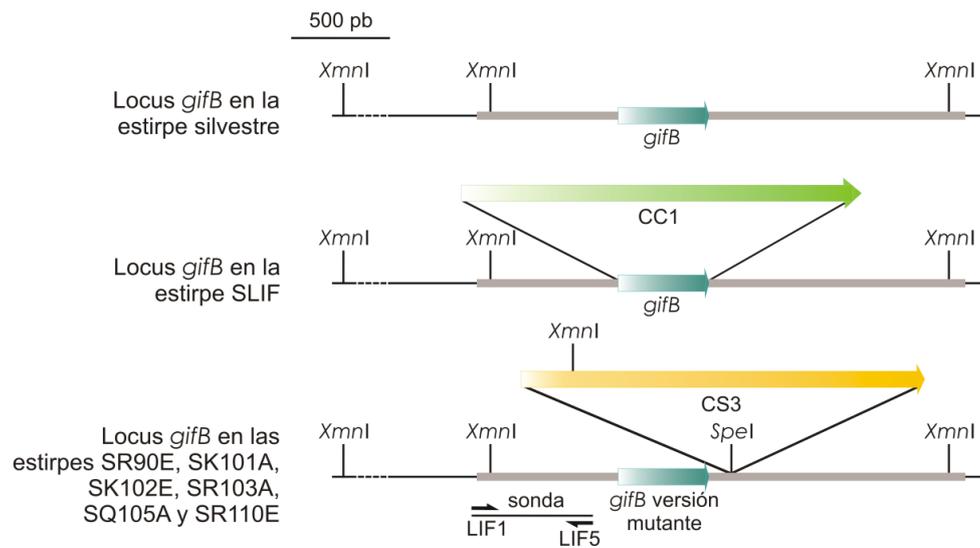
métodos, apartado E 1.1). La acumulación de los factores inactivantes en las diferentes estirpes analizadas durante la cinética de inactivación se confirmó mediante análisis de Western blot, usando para la detección anticuerpos policlonales específicos contra IF7 y/o IF17. Estudios previos han permitido constatar que, *in vivo*, la interacción con la GSI de *Synechocystis* es crítica para la estabilidad de los factores inactivantes (Galmozzi *et al.*, 2007). Este hecho nos sirve como herramienta para el estudio de la interacción *in vivo* de las versiones mutantes de los factores inactivantes con la GSI. Si una determinada proteína mutante no interacciona *in vivo* con la GS, dicha proteína no se acumula en la célula y no puede ser detectada mediante Western blot.

1.1.2.1 Generación y caracterización de estirpes de *Synechocystis* con mutaciones puntuales en el gen *gifB*

Para el estudio *in vivo* de las versiones mutantes de IF17 de *Synechocystis*, se obtuvieron las estirpes citadas en la tabla 3 (Materiales y métodos, apartado A 1.1). La descripción esquemática del locus del gen *gifB* en dichas estirpes, así como el resultado del análisis mediante Southern blot de los transformantes obtenidos se muestran en la Figura 22.

El ADN genómico de las diferentes muestras fue digerido con *XmnI*. Como sonda se utilizó un fragmento de 885 pb del gen *gifB* obtenido mediante PCR usando los oligonucleótidos LIF1 y LIF5. La estirpe silvestre muestra dos fragmentos que hibridaron con la sonda marcada radiactivamente, de tamaños 2.2 y 7 kb. Los tamaños de los fragmentos observados en la estirpe SLIF son de 3.8 y 7 kb, y las estirpes mutantes de IF17 presentan dos fragmentos, de 1.3 y 7 kb, confirmando la segregación completa de la versión mutante en las colonias analizadas. La correcta expresión del gen *gifB* en las estirpes mutantes fue verificada mediante Northern blot (Figura 23). Para ello, se recogieron muestras de las diferentes estirpes tras la adición de amonio al medio de cultivo. Todas las estirpes estudiadas muestran un patrón de inducción por amonio similar al observado en la estirpe silvestre, en la que la expresión del gen *gifB* alcanza un valor máximo a los 15 minutos de la adición de amonio.

A



B

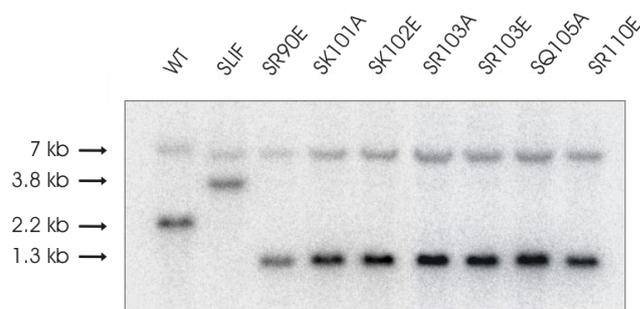


Figura 22. Obtención y comprobación de estirpes mutantes del gen *gifB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

A. Descripción esquemática del locus del gen *gifB* en las estirpes silvestre y mutantes. Las flechas en los genes indican la dirección de la transcripción. Se indican también los sitios de restricción utilizados para comprobar los mutantes mediante Southern blot. **B. Análisis mediante Southern blot de la organización genómica y del grado de segregación de las estirpes estudiadas.** Se utilizó el ADN genómico de la estirpe silvestre (WT) y las estirpes mutantes SR90E, SK101A, SK102E, SR103A, SR103E, SQ105A, SR110E, digerido con la enzima *XmnI*.

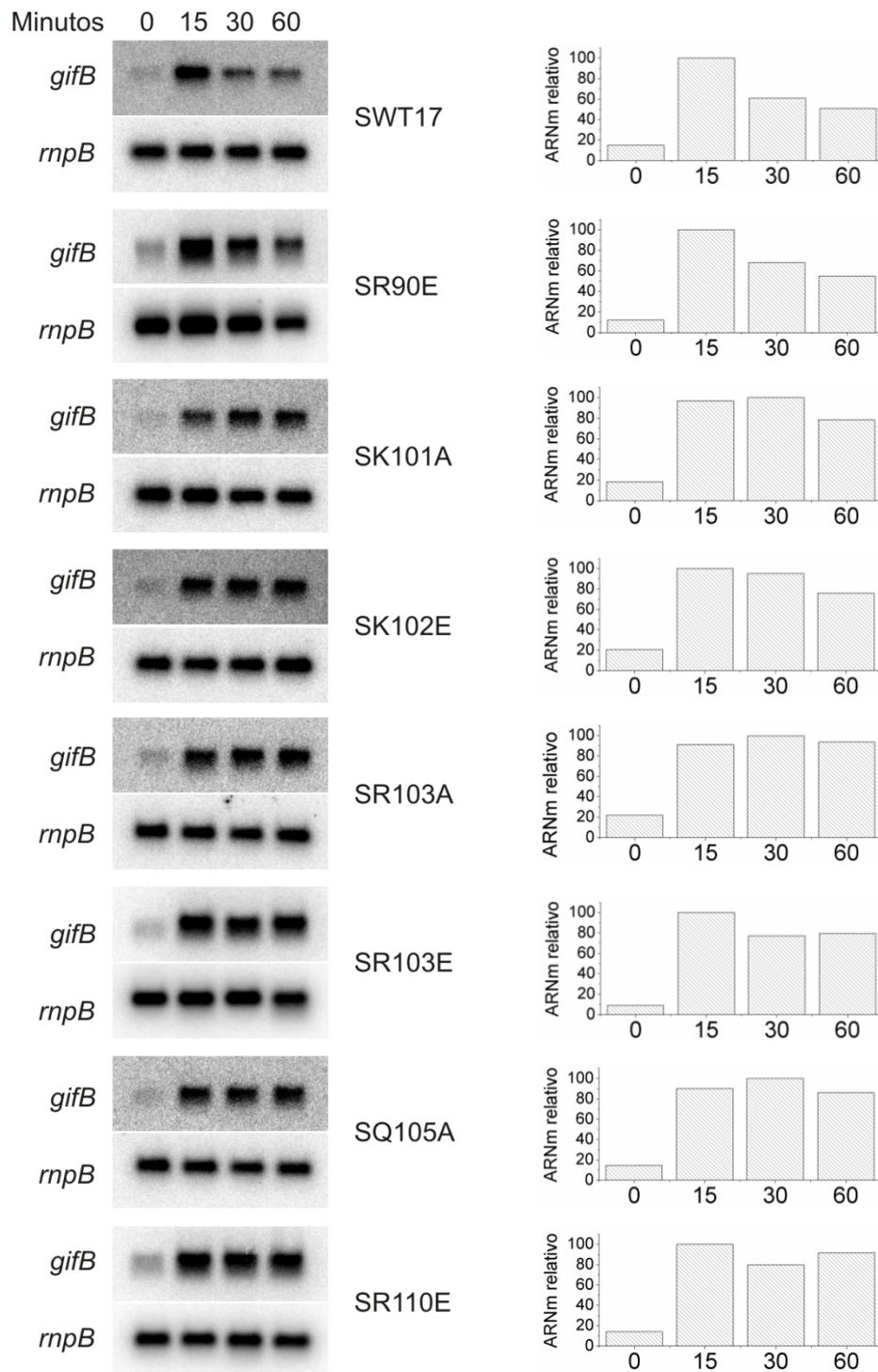


Figura 23. Expresión del gen *gifB* en las diferentes estirpes silvestre y mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se extrajo el ARN total de las muestras obtenidas en los tiempos indicados tras la adición de amonio al medio. Se cargaron 20 μ g de ARN de cada muestra y se hibridaron con una sonda de 885 pb del gen *gifB*. Como control de la cantidad de ARN de cada muestra y para analizar los niveles relativos de expresión, los filtros se hibridaron con una sonda del gen *rnpB*. El 100 % de ARN relativo corresponde a la máxima señal de hibridación con *gifB* en cada estirpe.

La capacidad de inactivación de las diferentes proteínas mutantes *in vivo* se cuantificó mediante ensayos *in situ* de la GS (Figura 24). Estos ensayos permitieron probar que los residuos de arginina 90, 103 y 110 son críticos para la inactivación *in vivo* de la GSI puesto que los cultivos de las estirpes SR90E, SR103E y SR110E mostraron una actividad del 100 % con respecto a la actividad inicial, tras dos horas en presencia de amonio, respectivamente, frente al 6 % de actividad obtenida en la estirpe silvestre (Figura 24). Al igual que se observó en los ensayos *in vitro* del complejo entre la GSI y las proteínas IF17-K101A o IF17-K102E, en los que se obtuvo una disminución parcial de inactivación de la GSI de *Synechocystis*, las estirpes mutantes SK101A y SK102E presentan una actividad del 44 y 53 % de la GSI, respectivamente (Figura 24).

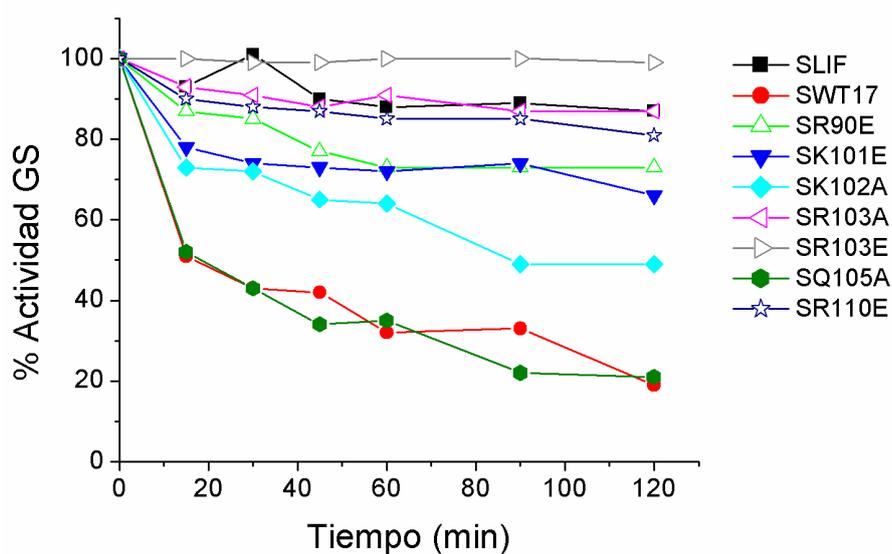


Figura 24. Análisis de la inactivación de la GS en estirpes mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresan diferentes versiones de la proteína IF17.

Las células de las estirpes indicadas se trataron con amonio durante 2 horas y se tomaron muestras para determinar la actividad GS a lo largo del tiempo. El 100 % corresponde con la actividad de cada cultivo en el momento de la adición de amonio

Como se ha comentado anteriormente, la acumulación en la célula de una determinada versión mutante de los IFs es un indicativo de la capacidad de interacción de ésta con la GS (Figura 25). Las muestras analizadas por Western blot corresponden a extractos crudos celulares que proceden de alícuotas obtenidas a diferentes tiempos tras la adición de amonio al medio. Examinando los resultados obtenidos, podemos constatar que en los mutantes SR90E y SR110E, el factor inactivante no se acumula, lo que correlaciona con la incapacidad de interacción del factor inactivante expresado en estas estirpes con la GSI. En la estirpe SR103A se observa una menor acumulación del factor inactivante con respecto a la estirpe silvestre y en la estirpe SR103E, la cantidad de factor inactivante detectada es mínima. Estos resultados correlacionan con los ensayos de inactivación *in situ* indicados anteriormente.

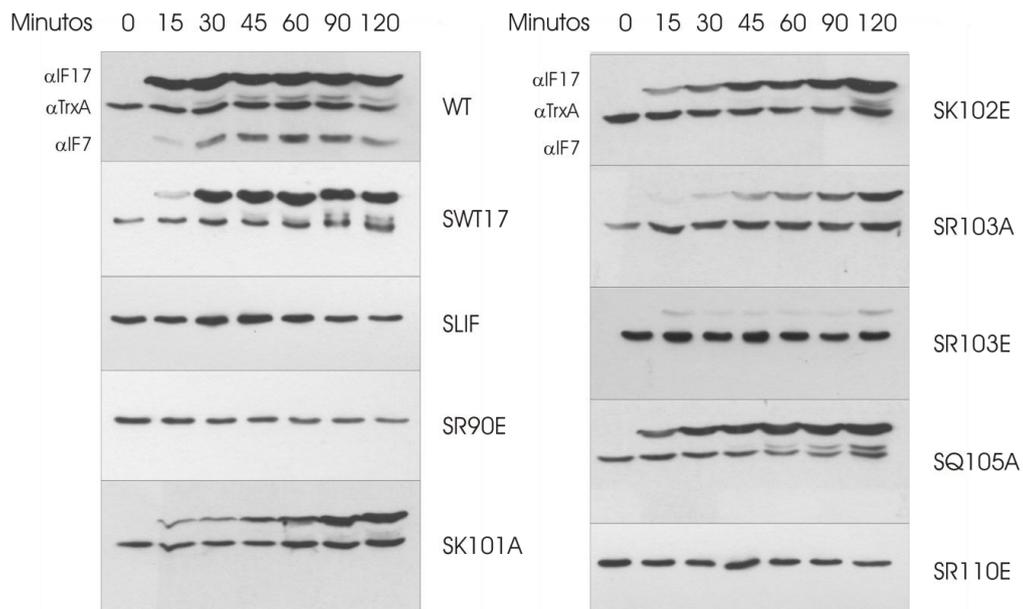


Figura 25. Acumulación de IF17 e IF7 en diferentes estirpes de *Synechocystis* sp PCC 6803 en una cinética de inactivación por amonio.

El tiempo representado corresponde a los minutos transcurridos tras la adición de amonio al medio de cultivo.

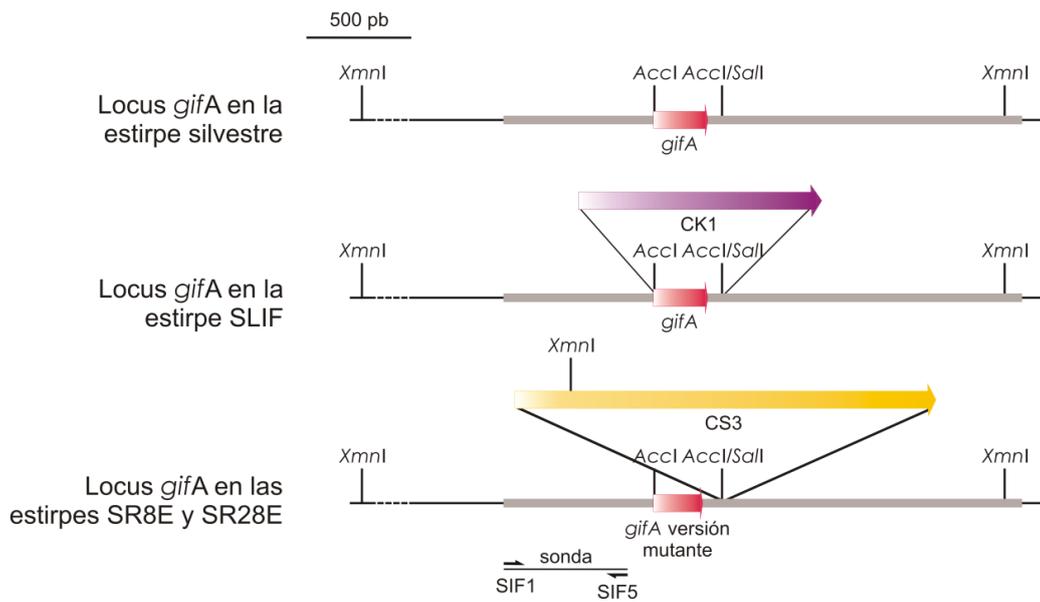
1.1.2.2 Generación y caracterización de estirpes de *Synechocystis* con mutaciones puntuales en el gen *gifA*

Las estirpes obtenidas para el estudio mutacional *in vivo* de IF7 de *Synechocystis* se relacionan en la tabla 3 (Materiales y métodos, apartado A 1.1). La descripción esquemática del *locus* del gen *gifA* en dichas estirpes y el resultado del análisis mediante Southern blot de las estirpes transformantes seleccionadas se muestran en la Figura 26. El ADN genómico de las diferentes estirpes fue digerido con *XmnI*. Como sonda se utilizó un fragmento de 846 pb del *locus* del gen *gifA* obtenido mediante PCR usando los oligonucleótidos SIF1 y SIF5. La estirpe silvestre presenta un fragmento de 4850 pb marcado radiactivamente mientras que la estirpe SLIF y las estirpes mutantes muestran fragmentos de 6100 pb y 1740 pb, respectivamente, confirmando la segregación completa de la versión mutante en las colonias analizadas.

Mediante un análisis de Northern blot se verificó que en las estirpes mutantes la expresión de transcrito del gen *gifA* tras añadir amonio al medio era similar al que presentaba la estirpe silvestre (Figura 27).

Siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las estirpes mutantes de IF17, se cuantificó la capacidad de inactivación *in vivo* de las diferentes proteínas mutantes mediante el estudio de la inactivación por amonio de la GS, en las estirpes obtenidas (Figura 28). Las estirpes mutantes obtenidas en este trabajo, SR8E y SR28E, se compararon con las obtenidas previamente, SK19E, S21E y SK48E, así como con SWT7, estirpe que presenta la versión silvestre del gen *gifA* en el mismo contexto génico. Las estirpes SR8E, SK19E, SR21E y SR28E presentan una pérdida absoluta de función del factor inactivante, mostrando una actividad GS constante a lo largo del tiempo. Esto implica que los residuos mutados son críticos para la funcionalidad de IF7 *in vivo*.

A



B

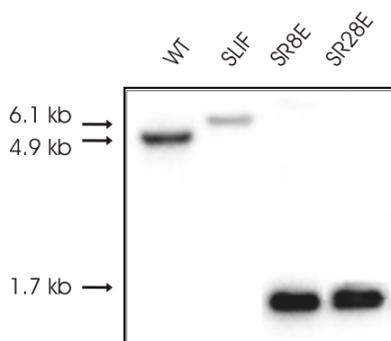


Figura 26. Obtención y comprobación de estirpes mutantes del gen *gifA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

A. Descripción esquemática del *locus* del gen *gifA* en las estirpes silvestre y mutantes. Las flechas en los genes indican la dirección de la transcripción. Se indican también los sitios de restricción utilizados para comprobar los mutantes mediante Southern blot. B. Análisis mediante Southern blot de la organización genómica y del grado de segregación de las estirpes estudiadas. Se utilizó el ADN genómico de la estirpe silvestre (WT), la estirpe con doble delección *gifA* y *gifB* (SLIF) y las estirpes mutantes SR8E y SR28E, digerido con la enzima *XmnI*.

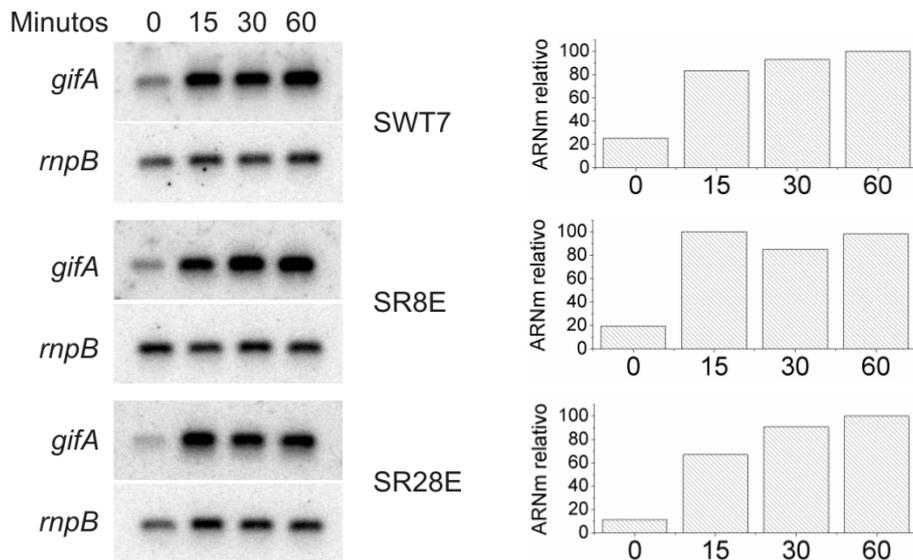


Figura 27. Expresión del gen *gifA* en las diferentes estirpes silvestre y mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se extrajo el ARN total de las muestras obtenidas en los tiempos indicados tras la adición de amonio al medio. Se cargaron 20 µg de ARN de cada muestra y se hibridaron con un fragmento que contiene el gen *gifA*. Como control de la cantidad de ARN de cada muestra y para analizar los niveles relativos de expresión, los filtros se hibridaron con un fragmento que contiene el gen *rnpB*. El 100 % de ARN relativo corresponde a la máxima señal de hibridación con *gifA* en cada estirpe.

Se analizó mediante Western blot la acumulación de IF7 y de sus diferentes versiones mutantes tras la adición de amonio (Figura 29). Mientras que la proteína IF7-K48E se acumuló en la célula a niveles similares a la proteína IF7, las proteínas IF7-R8E, IF7-K19E, IF7-R21E y IF7-R28E no se detectaron a lo largo de toda la cinética. Los resultados indican que los residuos R8, K19, R21 y R28 son críticos para la formación del complejo GS/IF7 *in vivo*.

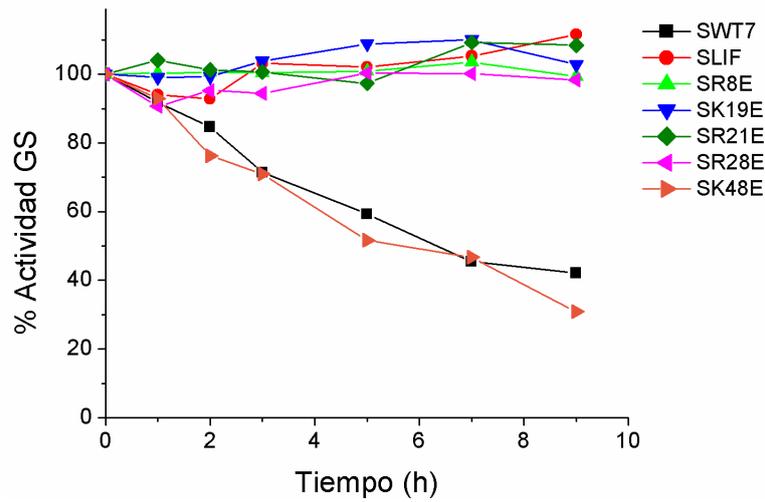


Figura 28. Análisis de la inactivación de la GSI en estirpes mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que expresan diferentes versiones de la proteína IF7.

Las células de las estirpes indicadas se trataron con amonio durante 9 horas y se tomaron muestras para determinar la actividad GS a lo largo del tiempo. El 100 % corresponde con la actividad de cada cultivo en el momento de la adición de amonio.

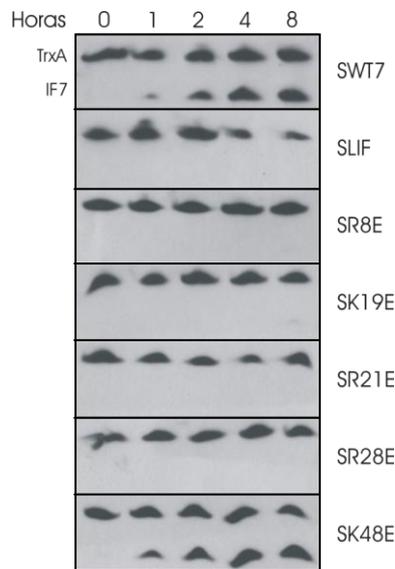


Figura 29. Acumulación de IF7 en diferentes estirpes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 durante una cinética de inactivación por amonio.

El tiempo representado corresponde a los minutos transcurridos tras la adición de amonio al medio de cultivo.

1.2 Estudio de la región amino terminal de IF17

Se han desarrollado en nuestro laboratorio estudios de estabilidad de los IFs, mediante la adición de éstos de forma exógena al extracto crudo de una estirpe mutante de los genes *gif* (SLIF), equilibrado a diferentes pHs (Galmozzi *et al.*, 2007). Un aumento de pH en un extracto de *Synechocystis* provoca la reactivación de la GS (Mérida *et al.*, 1991b), lo que indica que la formación del complejo GS/IF es de naturaleza electrostática. La adición de IF exógeno a un extracto de la estirpe SLIF a diferentes pHs permitió concluir que IF17 no es degradado *in vitro* por la maquinaria proteolítica presente en el extracto, a diferencia de lo que ocurre con IF7 (Galmozzi *et al.*, 2007). Con objeto de determinar si el extremo amino terminal de IF17, ausente en IF7, es el responsable del aumento de estabilidad observado, se analizó una proteína quimérica formada por el extremo amino terminal de IF17 y la proteína completa IF7. Esta proteína quimérica mostró un aumento en la estabilidad con respecto a IF7, similar al obtenido al analizar IF17 (Galmozzi, 2008).

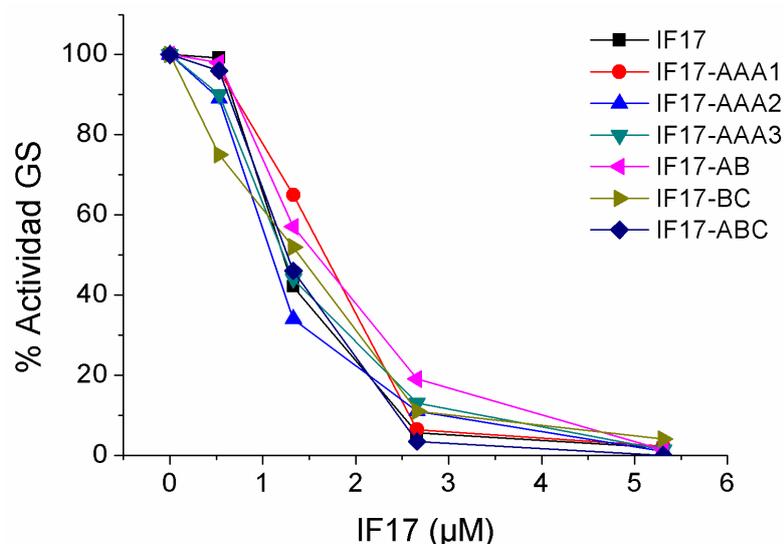


Figura 30. Inactivación *in vitro* de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con cantidades crecientes de IF17 silvestre y mutantes de la región amino terminal.

Se incubó una cantidad fija de GSI (1 μM) con las distintas versiones mutantes.

El análisis de la región amino terminal de IF17 de *Synechocystis* que se describe en esta sección, tiene como objetivo identificar los residuos de esta región involucrados en el aumento de estabilidad de IF17 con respecto a IF7, discutido por Galmozzi *et al.* (2007) y Galmozzi (2008). Al comparar las proteínas homólogas a IF17

con ésta, se observa que en la región amino terminal se suceden tres repeticiones de los residuos YRG (Figura 17). Con objeto de estudiar la función de estos residuos, se llevó a cabo la sustitución de los mismos por tres alaninas (AAA), mediante mutagénesis dirigida. Para la obtención de las versiones mutantes del gen *gifB* de *Synechocystis*, se utilizó PCR estándar y PCR en tres fases (Materiales y métodos, apartado B 1.5). Los fragmentos que contenían el gen *gifB* fueron clonados en el plásmido de expresión inducible por IPTG, pET28a, que incorpora la secuencia codificante de 6 histidinas en el extremo 5' del inserto. Tras la clonación y expresión de las diferentes versiones del gen *gifB* en la estirpe BL21 de *E. coli*, se purificaron las proteínas mediante cromatografía de afinidad por níquel y cromatografía de exclusión molecular (Materiales y métodos, apartado D 6). Las proteínas purificadas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (Ver Materiales y métodos, apartado D 3). Las proteínas obtenidas presentaban las tres repeticiones YRG sustituidas por AAA en varias combinaciones, con una o varias repeticiones mutadas (Tabla 8, Materiales y métodos, apartado D 6.2).

Para comprobar si las mutaciones afectaban a la capacidad inactivante de IF17, se llevaron a cabo ensayos de inactivación *in vitro* con las proteínas purificadas (Materiales y métodos, apartado E 1). Una cantidad fija de GSI purificada se incubó con cantidades crecientes de factor inactivante silvestre o mutante en tampón de interacción, HEPES-NaOH 50 mM pH 7, KCl 50 mM. Tras realizar el ensayo de actividad GS, se representó el % de actividad frente a la concentración de factor inactivante (Figura 30). Como en ocasiones anteriores, el 100% de actividad corresponde a la actividad observada en ausencia de factores inactivantes. De este estudio se deduce que la mutación de los residuos conservados YRG de la región amino terminal de IF17 de *Synechocystis* no afectan a la inactivación *in vitro* de la GSI.

Para los análisis posteriores utilizamos la proteína IF17-ABC, proteína mutante que presenta la triple mutación YRG(5-7)AAA, YRG(28-30)AAA e YRG(52-54)AAA. Con el propósito de comprobar que esta proteína mutante interacciona *in vitro* con la proteína GSI pura, se llevó a cabo un ensayo de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes (Figura 31B) (Materiales y métodos, apartado D 4.2). Se observa así que la GSI presenta un retraso en la migración electroforética en presencia de IF17 e IF17-ABC, lo que implica que la proteína mutante es capaz de interactuar con la GSI. Sin embargo, el retraso de la GSI es mayor en presencia de la proteína mutante. Puesto que los geles en condiciones no desnaturizantes separan a las proteínas nativas en función de la relación carga-masa, esto indica que esta relación se ve modificada en la GSI al incubarla con proteína mutante, con respecto a IF17 silvestre.

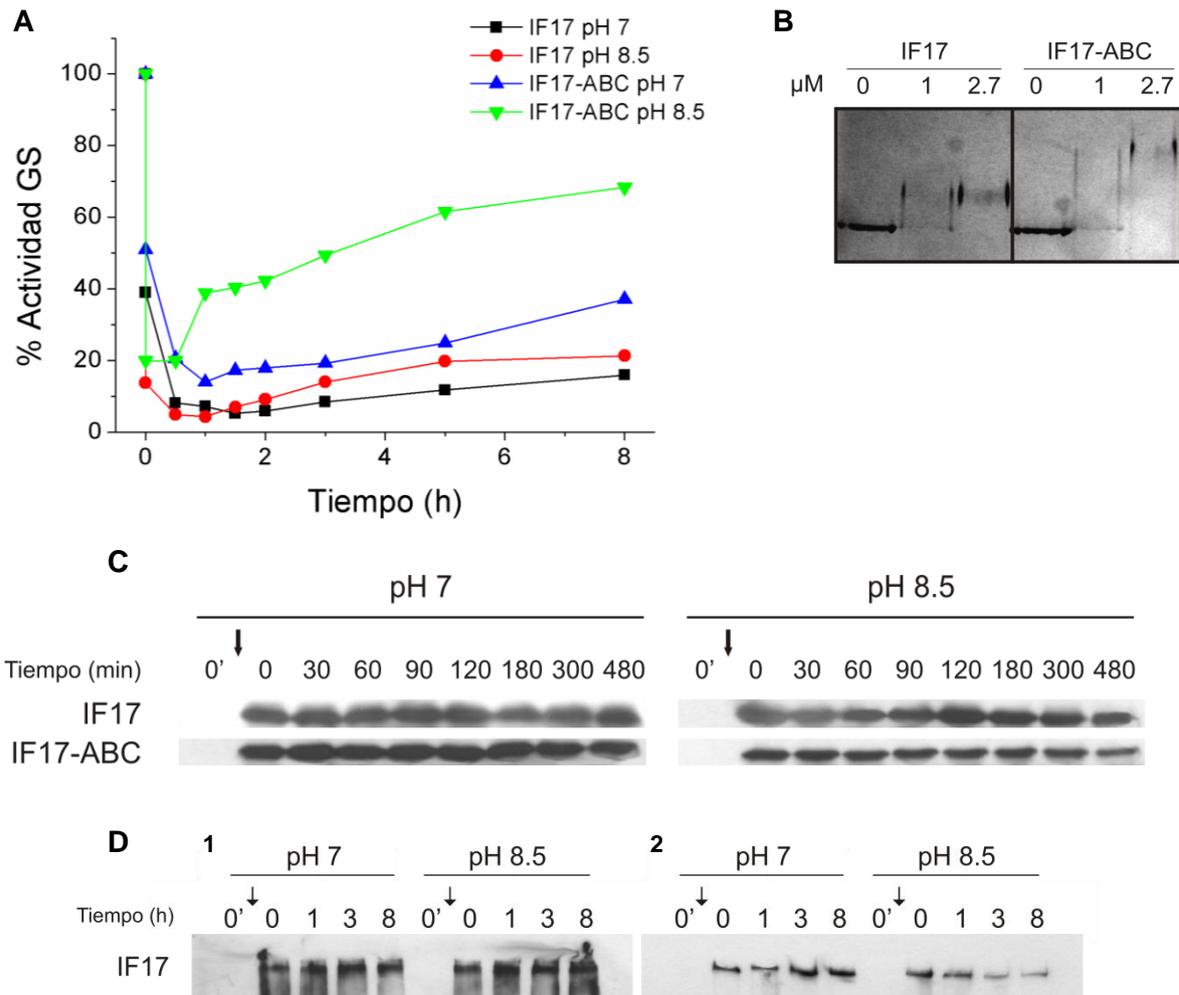


Figura 31. Estudio de la estabilidad de IF17 exógeno en extractos crudos de células de la estirpe SLIF ($\Delta gifA\Delta gifB$) en diferentes pH.

A. Inactivación y reactivación *in vitro* de la GS presente en extractos crudos de la estirpe SLIF de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con IF17 o IF17-ABC. B. Ensayo de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes de una cantidad fija (1.5 μ g) de GSI de *ynechocystis* en ausencia y presencia de IF17 o IF17-ABC. C. Western blot en condiciones desnaturizantes realizado a partir de muestras de extracto crudo de la estirpe SLIF de *Synechocystis* sp. PCC 6803 incubado con proteína pura IF17 o IF17-ABC a pH 7 o pH 8.5. D. Western blot en condiciones no desnaturizantes realizado a partir de extractos crudos de la estirpe SLIF de *Synechocystis* sp. PCC 6803 incubados con proteína pura IF17 (1) o IF17-ABC (2) a pH 7 o pH 8.5. Las flechas indican el momento de la adición de proteína pura.

Se ha estudiado el efecto de las mutaciones en el extremo amino terminal de IF17 en su estabilidad. Para ello, se llevó a cabo el siguiente experimento: en primer lugar se obtuvo el extracto crudo de la estirpe SLIF cultivada en medio BG11C en condiciones estándar en fase exponencial de crecimiento. Este extracto fue dividido en

dos alícuotas, una de ellas se mantuvo al pH original (pH 7) y la segunda se equilibró a pH 8.5. A cada una de las alícuotas se le añadió una cantidad fija de proteína pura IF17 ó IF17-ABC. La cantidad de proteína utilizada fue la necesaria para alcanzar el mismo grado de inactivación de la GSI con ambas versiones de IF17. Por último, las alícuotas se incubaron durante 8 horas a temperatura ambiente y se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar la actividad GS y analizar la acumulación de IF y la interacción de éste con la GSI mediante ensayos de Western blot (experimento esquematizado en el anexo 2). En la Figura 31A se muestra el análisis de la actividad GS detectada a partir de estas muestras, y observamos una reactivación gradual de la GS similar en todos los casos, excepto al añadir IF17-ABC a pH 8.5. En este último caso se observa una reactivación más rápida de la GS a partir de una hora de incubación.

Para determinar si IF17 e IF17-ABC muestran diferencias en su estabilidad, se realizaron Western blot en los que se analizaron las muestras recogidas en los diferentes tiempos en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes (Figura 31C y D). Se observa que la acumulación de la proteína silvestre y mutante es similar en los pHs utilizados, lo que indica que ambas proteínas no presentan diferencias de estabilidad *in vitro* en las condiciones analizadas y que la reactivación rápida de la GSI observada al incubar el extracto de SLIF con IF17-ABC a pH 8.5 no se debe a una mayor susceptibilidad a proteólisis.

Puesto que la proteína mutante IF17-ABC no es más susceptible a degradación que la proteína silvestre en el experimento realizado, la reactivación rápida observada puede deberse a una menor afinidad de esta proteína con la GSI a pH 8.5. De esta forma la proteína mutante estaría presente en las células pero no se encontraría unida a la GSI, mientras que la proteína silvestre IF17 estaría unida a la enzima provocando su inactivación. Para analizar esta hipótesis, se realizaron experimentos de Western blot de las mismas alícuotas en condiciones no desnaturizantes, utilizando como anticuerpos anti-IF17 y anti-GSI (Figura 31C). Dado que el punto isoeléctrico teórico calculado para IF17 es de 10.89, esta proteína no migra en su forma libre en un gel de electroforesis en condiciones nativas a pH 8.9 (Galmozzi, 2008). Por tanto, solo es posible su detección en este tipo de geles cuando se encuentra formando un complejo con la GS. Podemos observar cómo la acumulación de IF17 se mantiene constante a lo largo del experimento tanto a pH 7 como a pH 8.5, mientras que en el caso de la proteína IF17-ABC, se observa una disminución de señal a pH 8.5 a partir de las 3 horas del ensayo. Se observa por tanto una correlación entre la reactivación de la GS

y la interacción entre la GS y el factor inactivante, en la que a medida que la GS recupera la actividad, el factor inactivante IF17-ABC se separa de la GS a pH 8.5.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la triple mutación que porta la proteína IF17-ABC no afecta a la estabilidad del factor inactivante en extractos crudos de la estirpe SLIF, pero muestra una disminución de la afinidad con la GSI, lo que conlleva una reactivación más rápida de esta enzima a pH 8.5 que la obtenida con IF17 silvestre.

1.3 Caracterización de los mutantes SIF y LIF

Con objeto de analizar el efecto que provoca la ausencia de alguno de los factores inactivantes en la acumulación del otro factor inactivante, se analizó el proceso de inactivación/reactivación de la GS en las estirpes SIF y LIF, que presentan una delección en los genes *gifA* y *gifB*, respectivamente (Tabla 3, Materiales y métodos, apartado A 1.1).

Para este estudio se realizó un procedimiento de inactivación de la GS, diferente al descrito anteriormente. Las células silvestres y mutantes de *Synechocystis* fueron cultivadas en medio BG11C en condiciones estándar (Materiales y métodos, apartado A 1.2) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, momento en el que se añadió L-glutamina a una concentración de 1 mM. Tras 1 hora, los cultivos fueron sometidos a oscuridad durante 1 ó 6 horas (experimento esquematizado en el anexo 3). La adición de glutamina provoca un aumento de la actividad GOGAT, al ser uno de sus sustratos y esto incrementa el consumo de 2-oxoglutarato, el otro sustrato de esta enzima. Por otro lado, la oscuridad inhibe la fotosíntesis, lo que conlleva la disminución de la síntesis de 2-oxoglutarato. Como consecuencia, la concentración de 2-oxoglutarato celular es mínima, lo que supone una disminución de la expresión del gen *glnA* y una desrepresión de los genes *gif*. Tras el periodo de oscuridad de 1 ó 6 horas, los cultivos fueron iluminados de nuevo, lo que conlleva un aumento de la concentración de 2-oxoglutarato intracelular y por tanto, la activación de la expresión del gen *glnA* así como la represión de los genes *gif* (Muro-Pastor *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 1997; García-Domínguez *et al.*, 2000). Utilizamos este procedimiento para caracterizar la reactivación tras 1 hora de oscuridad (a partir de ahora la denominaremos reactivación rápida) y tras 6 horas de oscuridad (a partir de ahora la denominaremos reactivación lenta) en los mutantes SIF y LIF. Cuando analizamos de esta forma la estirpe silvestre de *Synechocystis* observamos un retraso en la

reactivación por luz tras 6 horas de oscuridad con respecto a la reactivación rápida tras 1 hora de oscuridad (Figura 32).

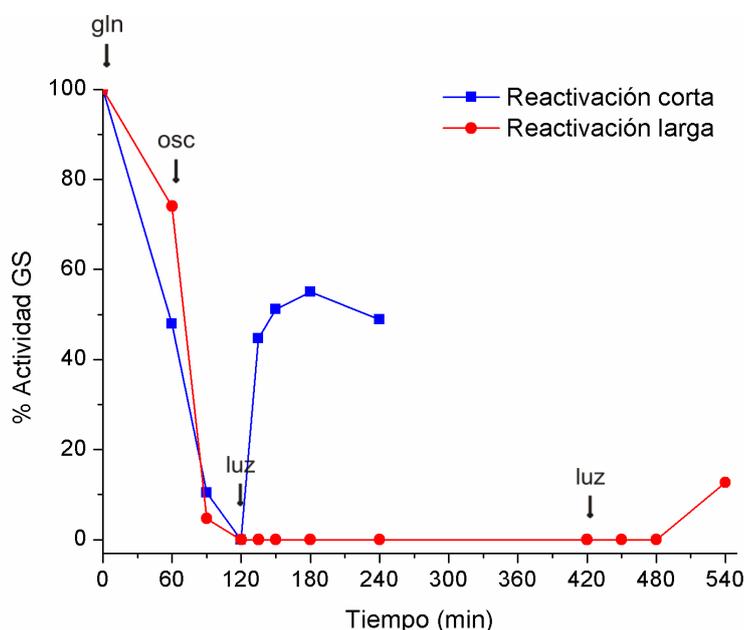


Figura 32. Efecto de la glutamina y la oscuridad en la actividad GS de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se cultivaron células de *Synechocystis* en un medio BG11C al que se le añadió L-glutamina hasta una concentración de 1 mM. Después de una hora, fueron sometidas a un periodo de oscuridad (1 hora en el caso de la reactivación rápida, coloreada en azul; o 6 horas en el caso de la reactivación lenta, coloreada en rojo). Tras este periodo, se volvieron a iluminar los cultivos. El tiempo representado corresponde a los minutos transcurridos tras la adición de glutamina al medio de cultivo. Se tomaron muestras a distintos tiempos a lo largo de toda la cinética, y se realizaron ensayos de actividad GS *in situ*. El 100 % corresponde a la actividad GS en el momento de la adición de la glutamina.

La capacidad de inactivación *in vivo* de las diferentes proteínas en ausencia o presencia del otro factor inactivante se cuantificó mediante ensayos de actividad GS de las estirpes SIF y LIF (Figura 33). Se observa que en ausencia de alguno de los factores inactivantes, la reactivación lenta de la GS ocurre más rápidamente que en la estirpe silvestre. Como es de esperar, además, las estirpes SIF y LIF presentan una menor inactivación de la GS, puesto que ambas carecen de uno de los factores inactivantes, siendo el caso más drástico el observado en el mutante LIF (que no presenta IF17), tanto para la cinética de reactivación lenta como rápida.

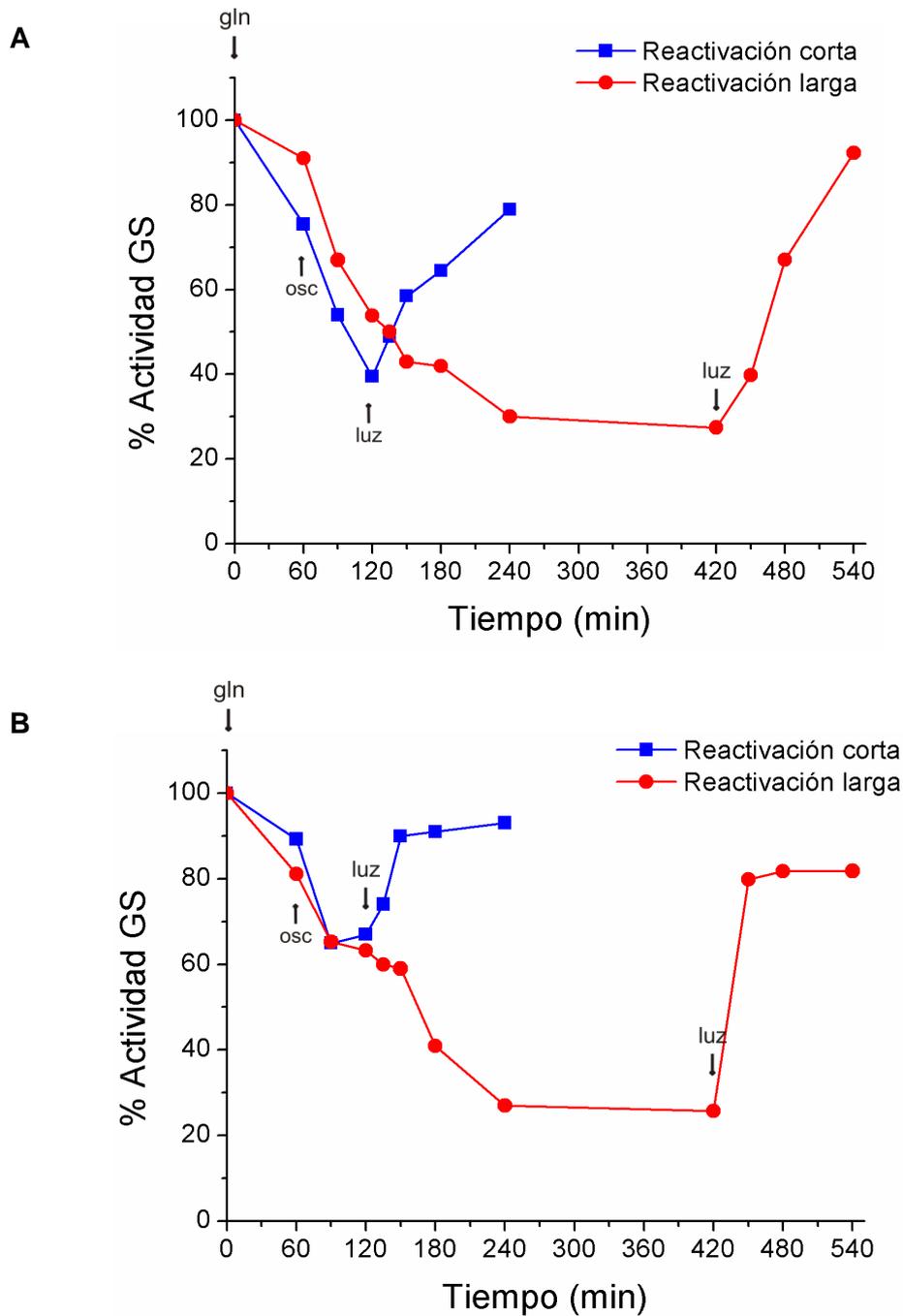


Figura 33. Análisis de la actividad GS de las estirpes mutantes SIF (A), carente de IF7, y LIF (B), carente de IF17, de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se cultivaron células de las estirpes mutantes SIF y LIF de *Synechocystis* en un medio BG11C al que se le añadió L-glutamina hasta una concentración de 1 mM. Después de una hora, fueron sometidas a un periodo de oscuridad (1 hora en el caso de la reactivación rápida, coloreada en azul; o 6 horas en el caso de la reactivación lenta, coloreada en rojo). Tras este periodo, se volvieron a iluminar los cultivos. El tiempo representado corresponde a los minutos transcurridos tras la adición de glutamina al medio de cultivo. Se tomaron muestras a distintos tiempos a lo largo de toda la cinética, y se realizaron ensayos de actividad GS *in situ*. El 100 % corresponde a la actividad GS en el momento de la adición de la glutamina.

Con objeto de analizar si estas observaciones son consecuencia de un cambio de expresión génica o si se deben a una regulación postraducciona, se analizó la expresión del gen *gifA* y *gifB* en las estirpes silvestre y mutantes mediante Northern blot (Figura 34). Para ello, se recogieron muestras de las diferentes estirpes a diferentes tiempos a lo largo de todo el experimento. Todas las estirpes estudiadas muestran un patrón de inducción de los genes *gif* similar al observado en la estirpe silvestre. Se concluye con ello que, durante la reactivación lenta del experimento, el retraso en la reactivación de la GS en la estirpe silvestre, así como la reactivación rápida observada en las estirpes SIF y LIF no son consecuencia de un cambio en el patrón de expresión de los genes *gif*.

Por último, se analizó mediante Western blot la acumulación de IF7 e IF17 en las estirpes silvestre y mutantes SIF y LIF durante el tratamiento con glutamina en cultivos en oscuridad y durante la reactivación por luz (Figura 35). En la estirpe silvestre de *Synechocystis*, se observa una degradación más lenta de los IFs en la reactivación lenta, con respecto a la reactivación rápida, lo que explica el retraso en la recuperación de la actividad GS en esas condiciones. Si comparamos la acumulación relativa de los IFs con la acumulación de la proteína control TrxA, podemos observar una mayor acumulación de los IFs en las estirpes SIF y LIF en la cinética larga, con respecto a la estirpe silvestre. Por otro lado, el factor inactivante IF7 se degrada rápidamente al iluminar el cultivo de la estirpe LIF, tanto en la reactivación lenta como en la rápida. Además, tras 6 horas de oscuridad, se observa una gran acumulación de IF7 en dicho mutante.

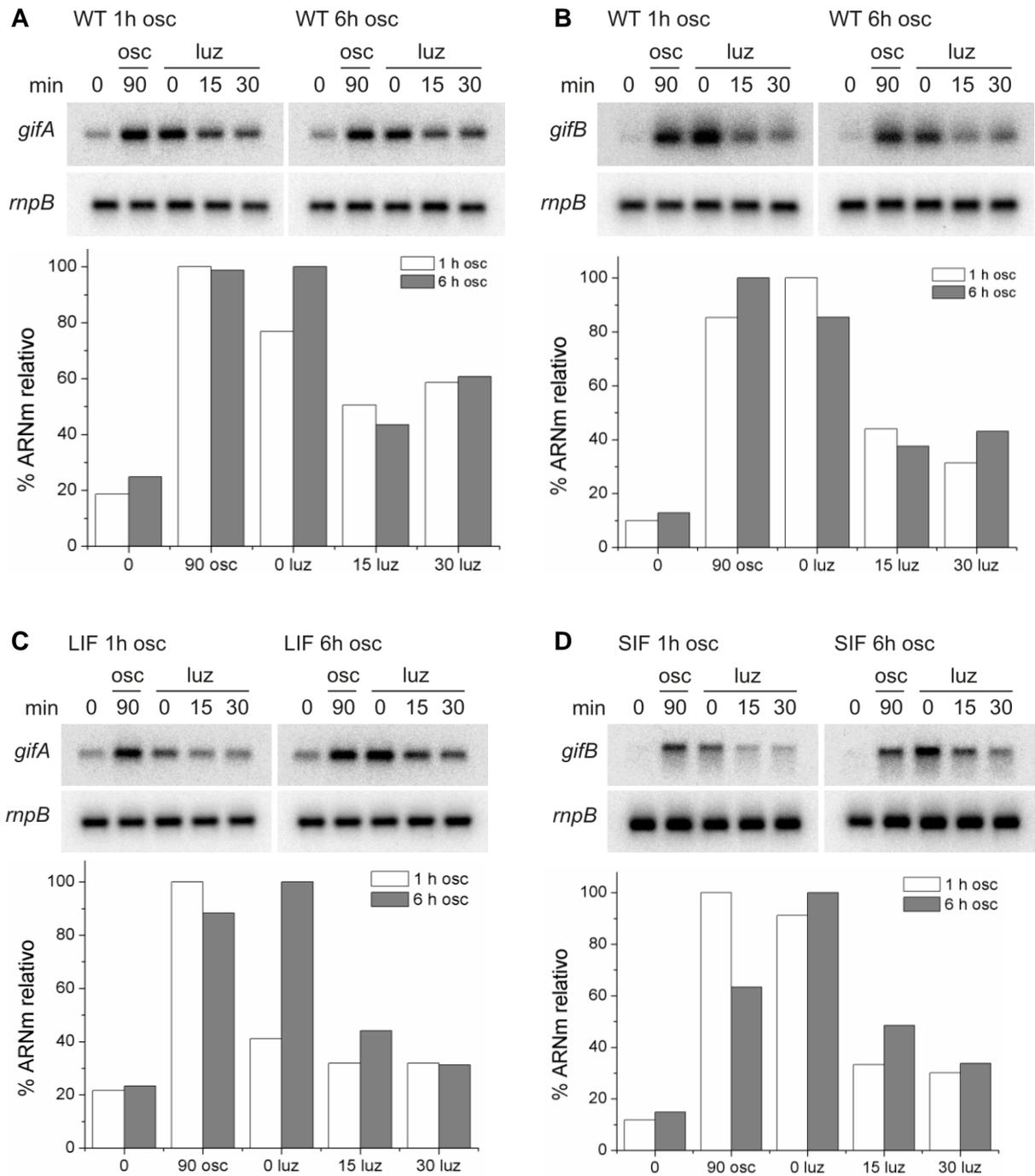


Figura 34. Expresión de los genes *gifA* y *gifB* en las estirpes silvestre y mutantes SIF y LIF de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se extrajo el ARN total de las muestras obtenidas en los tiempos indicados tras la adición de amonio en el medio. Se cargaron 20 µg de ARN de cada muestra y se hibridaron con un fragmento que contiene el gen *gifA* o *gifB*, según fue necesario. Como control de cantidad de ARN de cada muestra y para analizar los niveles relativos de expresión, se hibridaron con un fragmento que contiene el gen *rnpB*. El 100 % de ARN relativo corresponde a la máxima señal de hibridación con *gifA* o *gifB*, en cada estirpe.

Los resultados indican que la presencia de IF17 en la estirpe silvestre estabiliza al factor inactivante IF7, impidiendo de alguna forma la degradación observada en el mutante LIF, carente de IF17.

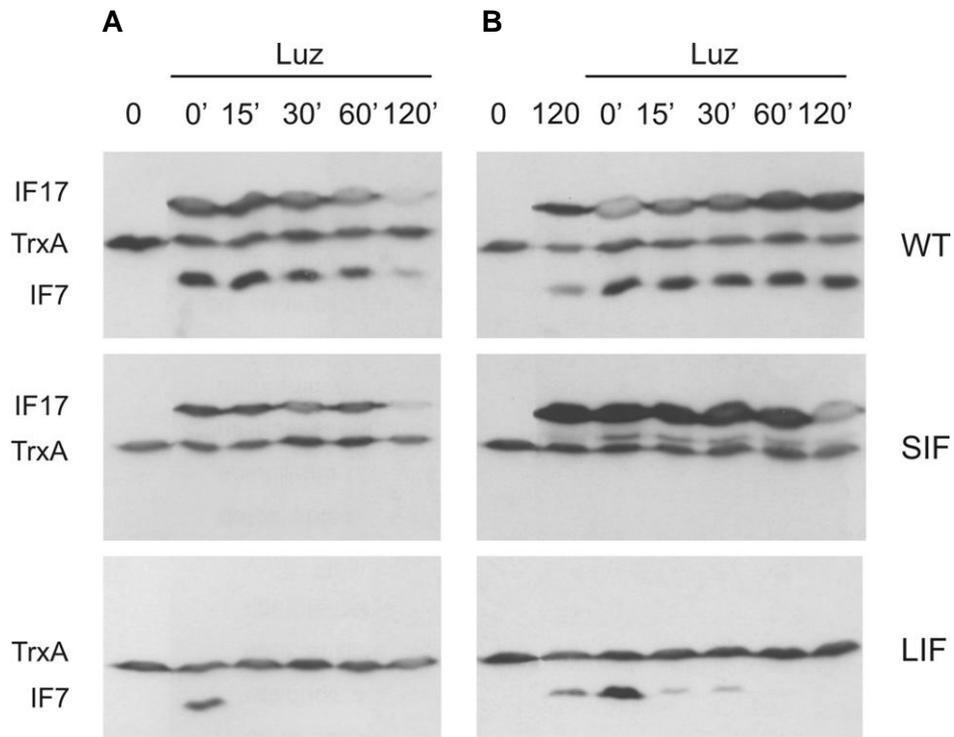


Figura 35. Acumulación de IF7 e IF17 en las estirpes silvestre y mutantes SIF y LIF de *Synechocystis* sp. PCC 6803 durante una cinética de inactivación por glutamina y oscuridad y durante una cinética de reactivación por luz.

La parte izquierda de la figura (A) corresponde con el cultivo sometido a 1 hora de oscuridad. La parte derecha (B) corresponde con el cultivo sometido a 6 horas de oscuridad. El tiempo representado corresponde a los minutos transcurridos tras la adición de glutamina en el medio de cultivo (cuando no lleva un apóstrofe), o tras el comienzo del período de iluminación del cultivo (cuando lleva apóstrofe).

2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA GSI

Como se ha demostrado mediante mutagénesis dirigida de los factores inactivantes, al menos tres residuos presentes en IF7 e IF17 de *Synechocystis* están implicados en la interacción de éstos con la GSI, y en su consiguiente inactivación, tanto *in vitro* como *in vivo*. Puesto que la regulación postraducciona de la GS en cianobacterias implica la interacción reversible de esta enzima con los factores inactivantes (Reyes y Florencio, 1995) y que la interacción entre estas proteínas es de tipo electrostático (Mérida *et al.*, 1991b), cada uno de estos tres residuos de carga positiva debe interactuar con uno o más residuos de carga negativa presentes en la GSI de *Synechocystis*. El objetivo de esta sección es identificar dichos residuos para caracterizar la unión entre la GSI y los factores inactivantes de *Synechocystis*.

2.1 Estudio de la especificidad de la interacción GS/IFs

En nuestro laboratorio hemos descrito recientemente el sistema de inactivación de la GS de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Galmozzi *et al.*, 2010). En esta estirpe el sistema de regulación de la GS opera con un solo factor inactivante (IF7A), codificado por el gen *gifA*. A pesar de que las glutamina sintetasas de *Synechocystis* y *Anabaena* sp. PCC 7120 muestran una identidad del 80.6 %, los factores inactivantes IF7 e IF17 de *Synechocystis* no inactivan *in vitro* a la GS de *Anabaena* sp. PCC 7120. Sin embargo, la GSI de *Synechocystis* es inactivada *in vitro* por IF7A, mostrando una mayor inactivación que la observada en la GS de *Anabaena* sp. PCC 7120 a igualdad de concentración de IF7A. Las escasas diferencias en la secuencia de aminoácidos de ambas enzimas deben proporcionar cambios en las cargas superficiales, que modifiquen la afinidad de la GS por los IFs. Si determinamos cuáles son dichos cambios, podremos identificar una zona de unión entre la GS y los factores inactivantes.

Dado que la GS de *A. variabilis* había sido clonada con anterioridad en nuestro grupo y se disponía asimismo de experiencia en la purificación de esta enzima y en el estudio de su inactivación por amonio, se decidió utilizar la GS de *A. variabilis* para la identificación de los residuos que le confieren a esta enzima la especificidad por IF7A. Las GSs de ambas especies de *Anabaena* (sp. 7120 y *variabilis*) son casi idénticas, presentando una identidad de secuencia del 97.9 %. En el caso de los factores inactivantes esta identidad se eleva al 100 %. El sistema de inactivación de la

GS de esta especie fue analizado mediante ensayos de inactivación con IF7, IF17 e IF7A (Figura 36).

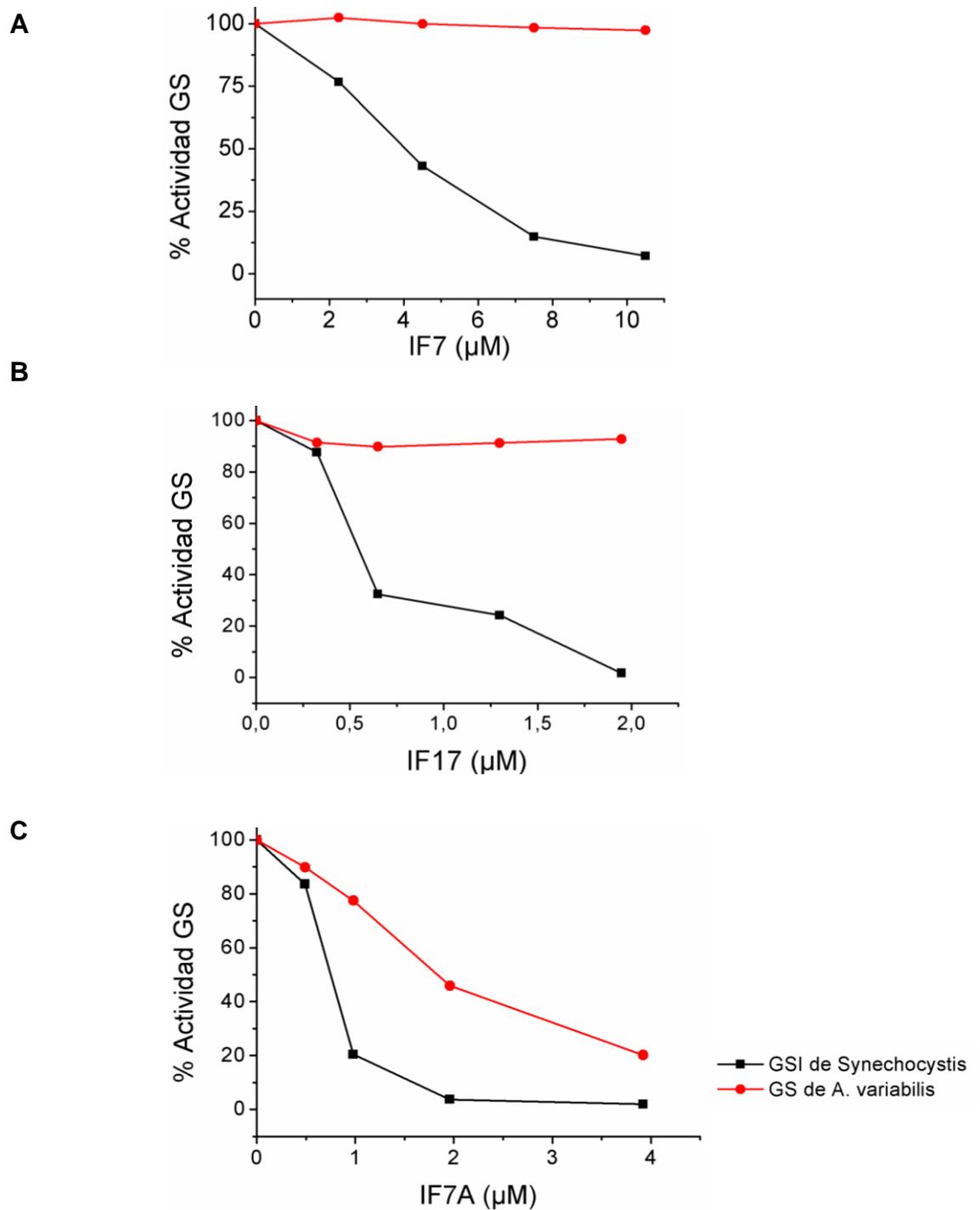


Figura 36. Inactivación *in vitro* de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de *Anabaena variabilis* ATCC 29413 con IF7 (A), IF17 (B) e IF7A (C).

Se utilizaron cantidades crecientes de cada IF para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura (1 μM).

2.1.1 Proteínas quiméricas entre la GS de *Synechocystis* y de *A. variabilis*

En una primera aproximación a la identificación de los residuos involucrados en la especificidad de la GS por los factores inactivantes, se han obtenido proteínas quiméricas entre las glutamina sintetasas de *Synechocystis* y *Anabaena*. Las versiones quiméricas del gen *glnA* se obtuvieron mediante PCR en tres fases (Materiales y Métodos, apartado B 3.5) y se clonaron en el plásmido de expresión pBS-SK(+) junto con la secuencia que codifica una cola de 5 histidinas en el extremo 5' del gen insertado. Cada versión quimérica fue expresada en la estirpe DH5 α de *E. coli*. La purificación de cada una de las proteínas quiméricas se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad por níquel seguida de cromatografía de exclusión molecular (Materiales y métodos, apartado D 6). Estas proteínas quiméricas presentan el extremo amino terminal de la GSI de *Synechocystis* y el extremo carboxilo terminal de la GS de *A. variabilis* (Tabla 8). De esta forma, las proteínas GS-Quimera 1, 2 y 3 contenían un 49 %, 22 % y 12 % del extremo carboxilo terminal de la GS de *A. variabilis*, respectivamente (Figura 37).

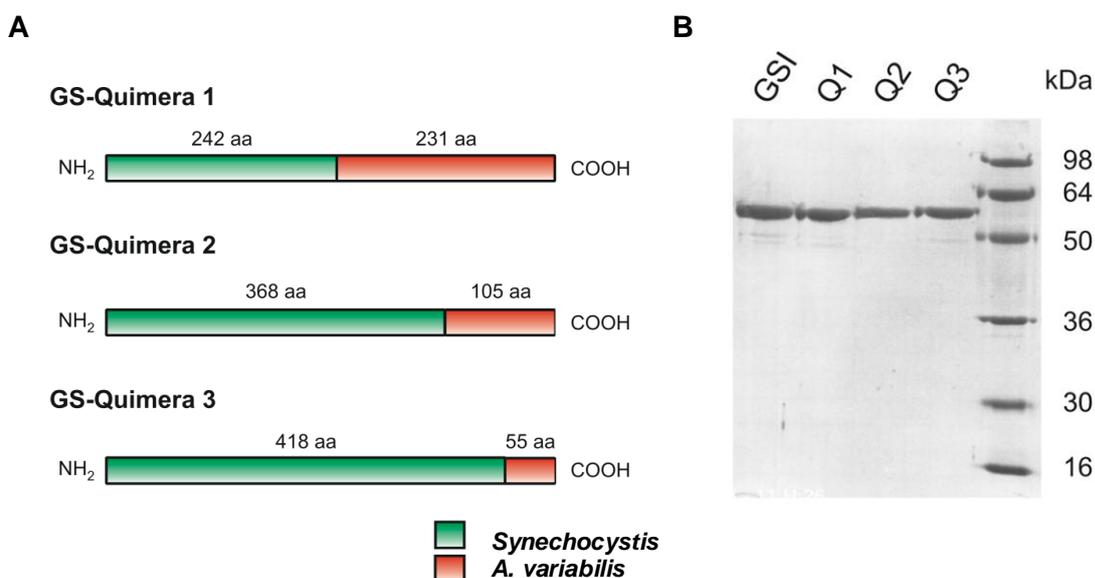


Figura 37. Representación esquemática de las proteínas quiméricas purificadas.

A. Esquema de las proteínas quiméricas purificadas. B. 1.5 μ g de proteínas puras GSI, GS-Quimera 1 (Q1), GS-Quimera 2 (Q2) y GS-Quimera 3 (Q3) sometidos a electroforesis en condiciones desnaturalizantes (12 % SDS).

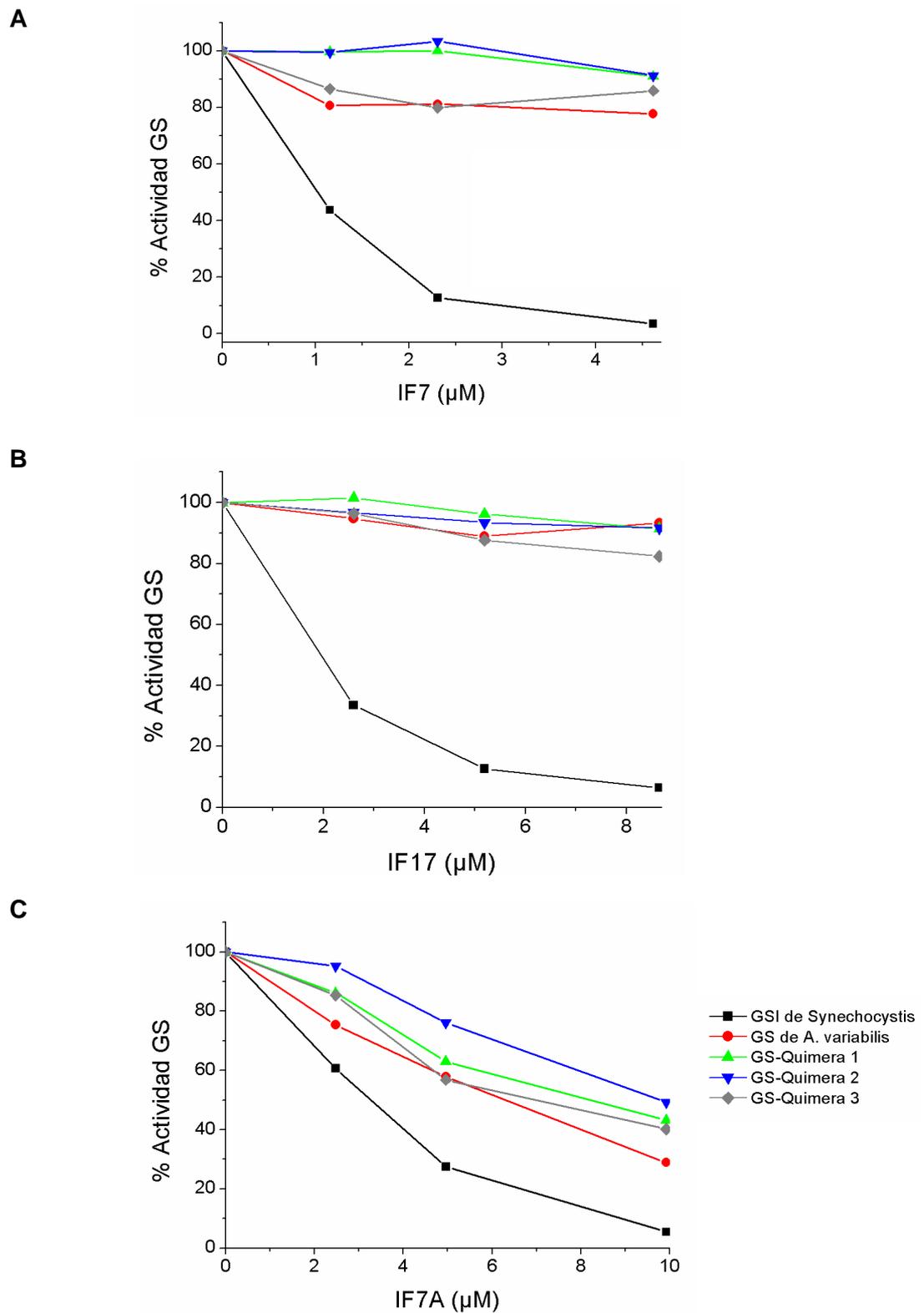


Figura 38. Inactivación *in vitro* de las proteínas quiméricas, la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y la GS de *Anabaena variabilis* ATCC 29413 con IF7 (A), IF17 (B) e IF7A (C).

Se utilizaron cantidades crecientes de cada IF para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura. (1 μM).

Se analizaron las versiones quiméricas junto con las enzimas silvestres de ambos organismos, mediante ensayos de inactivación *in vitro* de la GS (Materiales y métodos, apartado E 1.3). Para ello, se incubó una cantidad fija de las diferentes GS purificadas con cantidades crecientes de IF7A, IF7 e IF17, en tampón de interacción (Hepes-NaOH 50 mM pH 7, KCl 50 mM) en un volumen final de 20 μ l. Tras medir la actividad GS de estas preparaciones, se representó el % de actividad GS frente a la concentración de factores inactivantes utilizada para cada ensayo (Figura 38). El 100 % de actividad GS corresponde a la observada en el ensayo que contiene glutamina sintetasas en ausencia de factores inactivantes.

Las distintas proteínas quiméricas fueron inactivadas por IF7A pero mostraron una actividad máxima constante cuando fueron incubadas con los factores inactivantes de *Synechocystis*. Este patrón de inactivación coincide con el mostrado por la GS de *A. variabilis*. La proteína GS-Quimera 3 sólo posee 53 residuos del extremo carboxilo terminal de la GS de *A. variabilis*. De éstos, los residuos no homólogos entre la GSI de *Synechocystis* y la GS de *A. variabilis* deben ser los responsables de la imposibilidad de inactivación de esta última por los IFs de *Synechocystis*.

2.1.2 Identificación mediante mutagénesis dirigida de los residuos que confieren especificidad a la interacción GS/IF

Dos fenómenos diferentes podrían explicar la especificidad de la GS por los IFs (Figura 39A): la hipótesis de atracción o la hipótesis de repulsión. La hipótesis de atracción se basa en la presencia de uno o varios residuos en la GSI de *Synechocystis*, cuya carga promovería la interacción con IF7 e IF17, y que se encuentren ausentes en la GS de *A. variabilis*. En la hipótesis de repulsión, la especificidad vendría dada por la presencia de uno o varios residuos en la GS de *A. variabilis*, que repelan exclusivamente a los factores inactivantes de *Synechocystis*, permitiendo la unión sólo con IF7A. Ambas hipótesis no son excluyentes.

El alineamiento de la región carboxilo terminal de la GS de ambos organismos ha permitido localizar varios residuos que podrían participar en las hipótesis descritas (Figura 39B). Los residuos Glu430, Glu444 y Asp452 de la GSI de *Synechocystis* presentan carga negativa en sus cadenas laterales y sus homólogos en la GS de *A. variabilis* son aminoácidos neutros (Alanina o Glutamina), por lo que podrían participar en el fenómeno de atracción entre los factores inactivantes y la GS

Los residuos seleccionados fueron sustituidos en la GSI de *Synechocystis* por el residuo homólogo presente en la GS de *A. variabilis*. Las versiones mutantes del gen *glnA* de *Synechocystis* se obtuvieron mediante PCR en tres fases (Materiales y Métodos, apartado B 3.5) y se clonaron en el plásmido pBS-SK(+) junto con la secuencia que codifica una cola de 5 histidinas en el extremo 5' del gen insertado. La expresión y purificación de las proteínas mutantes GS-E430A, GS-E444Q, GS-D452A, GS-AQA y GS-N456K se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito para las proteínas quiméricas. La proteína GS-AQA porta las tres mutaciones simples E430A, E444Q y D452A.

Se analizaron las proteínas mutantes GS-E430A, GS-E444Q, GS-D452A, GS-AQA y GS-N456K junto con las enzimas silvestres de ambos organismos, mediante ensayos de inactivación *in vitro* (Materiales y métodos, apartado E 1.3). Se siguió el mismo procedimiento que para las proteínas quiméricas. Se incubó una cantidad fija de GS con cantidades crecientes de los factores inactivantes. Se representa el % de actividad GS frente a la concentración de factores inactivantes de cada ensayo (Figura 40). El 100 % de actividad GS corresponde a la obtenida en ausencia de factores inactivantes.

En estos ensayos podemos observar que las mutaciones E430A y E444Q no afectan a la inactivación de la GS de *Synechocystis*, por los factores inactivantes IF7, IF17 e IF7A. En cambio, las proteínas mutantes GS-D452A y GS-AQA muestran una menor inactivación en presencia de IF17. Puesto que ambas proteínas presentan el residuo 452 mutado, este resultado indica que dicho residuo de aspartato participa en el proceso de inactivación mediado por IF17.

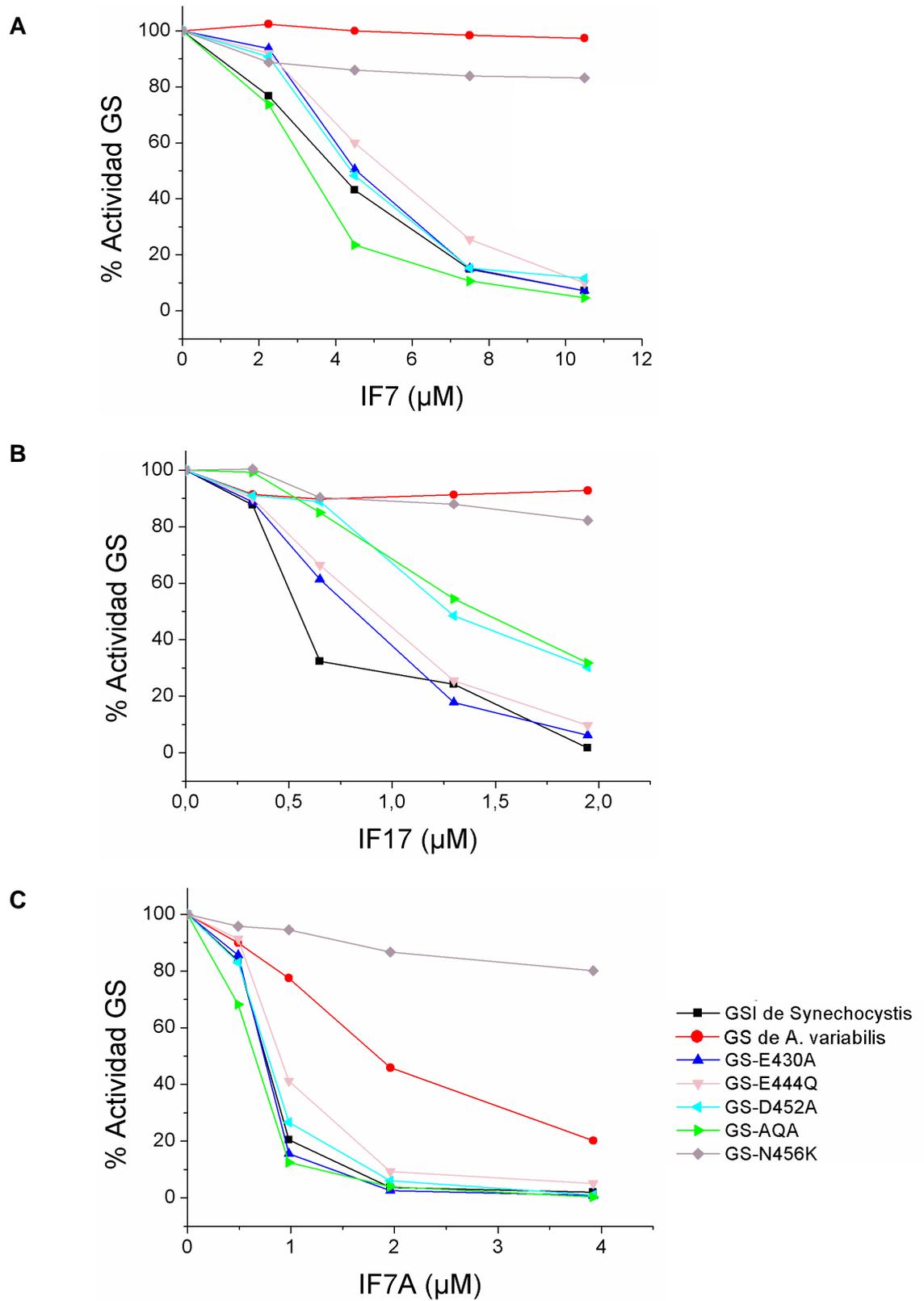


Figura 40. Inactivación *in vitro* de las proteínas GS-E430A, GS-E444Q, GS-D452A, GS-AQA y GS-N456K con IF7 (A), IF17 (B) e IF7A (C).

Se utilizaron cantidades crecientes de cada IF para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura (1 μM). Como control se usaron las proteínas silvestres GS-syn y GS-var.

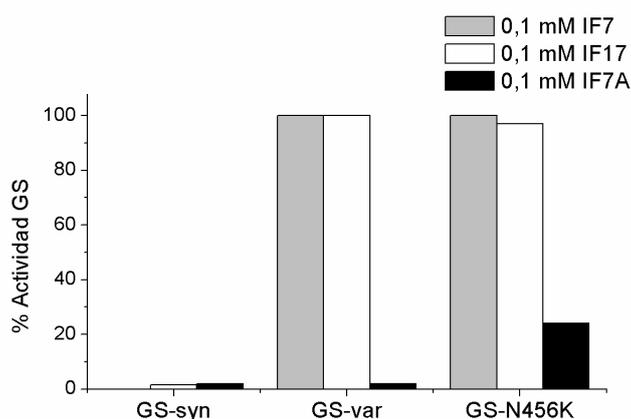


Figura 41. Inactivación *in vitro* de las proteínas GS-syn, GS-var y GS-N456K con IF7, IF17 e IF7A.

Se utilizaron cantidades crecientes de cada IF para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura (1 μ M). Se representa la actividad GS relativa alcanzada cuando se incubó cada GS con 0,1 mM de factor inactivante.

La versión mutante GS-N456K alcanza una actividad GS relativa del 82 % con respecto a la actividad inicial, en presencia de 7 μ M de IF7, 2 μ M de IF17 ó 4 μ M de IF7A. Esta actividad se mantiene constante al aumentar la concentración de IF7 o IF17. Sin embargo, si incrementamos la concentración de IF7A hasta alcanzar 0.1 mM, la actividad de la GS-N456K disminuye alcanzando valores aproximados del 30 % de la actividad inicial (Figura 41). Por tanto, la sustitución de la asparragina 456 por una lisina en la GSI de *Synechocystis*, le hace insensible a la inactivación por los factores inactivantes de *Synechocystis*, asemejándola a la GS de *A. variabilis*.

Los resultados de inactivación *in vitro* indican que las mutaciones D452A y N456K afectan a la inactivación de la GSI por los factores inactivantes. Para determinar si este efecto sobre la inactivación está relacionado con la capacidad de interacción entre la GSI y los factores inactivantes, se procedió al estudio de las versiones mutantes GS-D452A, GS-AQA y GS-N456K, así como los controles silvestres, mediante ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes (Materiales y métodos, apartado D 4.2) (Figura 42). En ausencia de factor inactivante, la GSI de *Synechocystis* aparece como una única banda, mientras que al añadir IF7, IF17 o IF7A, el complejo GS-IF presenta una migración más lenta. Para este ensayo se añadió una concentración saturante de cada factor inactivante (30 μ M).

En los ensayos de retardo en gel observamos que las proteínas mutantes GS-D452A y GS-AQA en presencia de IF17 no muestran un retraso en la migración electroforética, indicando que la proteína mutante no interacciona con IF17 *in vitro*. Estos resultados son concordantes con los ensayos de inactivación *in vitro*. La proteína GS-N456K en ausencia de IFs y en presencia de IF7 se muestra como una única banda, sin presentar un retraso en el patrón de migración. Esto nos indica que esta proteína no interacciona *in vitro* con IF7, lo cual coincide con el ensayo de inactivación *in vitro*. Sin embargo, en presencia de IF17 e IF7A presenta una migración más lenta, lo que indica que la enzima interacciona con ambos factores. En este último caso, los resultados de los ensayos de inactivación *in vitro* no coinciden con los de retardos en gel realizados, puesto que la proteína GS-N456K no es inactivada por IF17, y sin embargo, es capaz de interactuar *in vitro* con dicho factor inactivante.

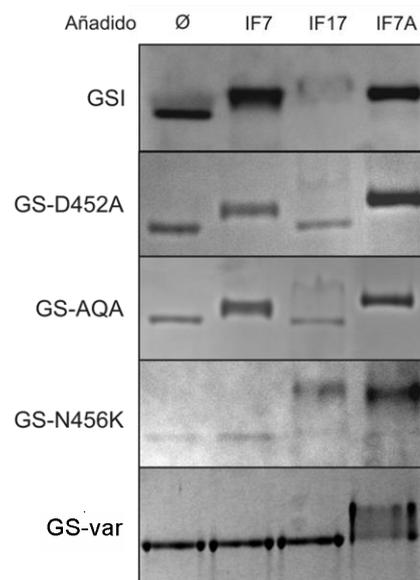


Figura 42. Ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturalizantes de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y sus versiones mutantes GS-D452A, GS-AQA y GS-N456K, así como la GS de *A. variabilis*, incubadas con IF7, IF17 e IF7A.

Se utilizó una cantidad fija de GSI (1.5 µg) incubada con cada factor inactivante (30 µM).

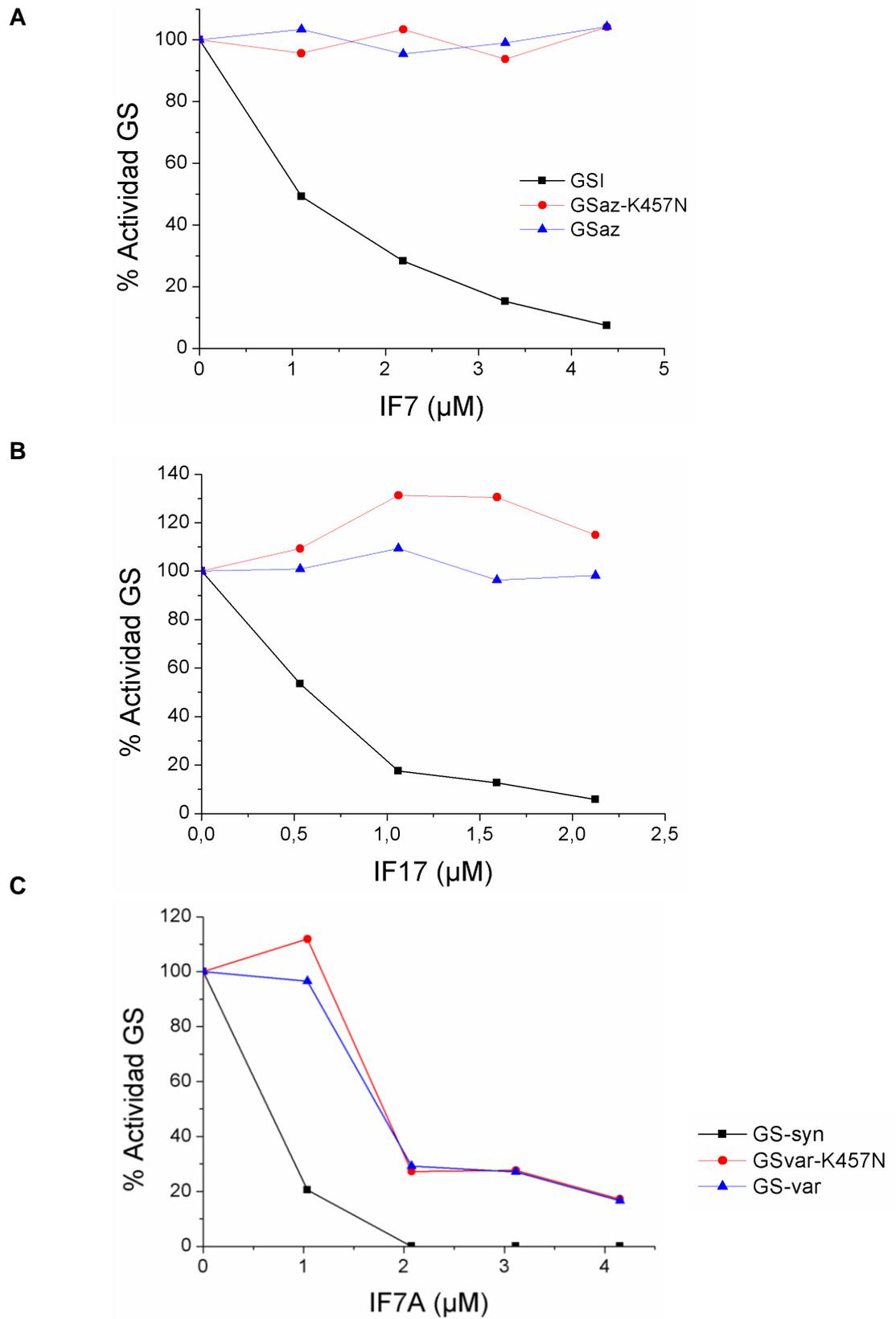


Figura 43. Inactivación *in vitro* de la proteína GSvar-K457N con IF7 (A), IF17 (B) e IF7A (C).

Se utilizaron cantidades crecientes de cada IF para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura (1 μM).

Adicionalmente a los mutantes obtenidos a partir de la proteína silvestre GSI de *Synechocystis*, se ha diseñado y purificado una proteína mutante derivada de la GS de *A. variabilis*, que porta la mutación K457N. Esta mutación corresponde a la sustitución inversa a la ya descrita para la GSI de *Synechocystis* (N456K). De la misma forma que para los casos anteriores, la versión mutante del gen *glnA* de *A. variabilis* se obtuvo mediante PCR en tres fases (Materiales y Métodos, apartado B 3.5) y se clonó en el plásmido pBS-SK(+) junto con la secuencia que codifica una cola de 5 histidinas en el extremo 5' del gen insertado. La expresión y purificación de la proteína mutante GSvar-K457N se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente.

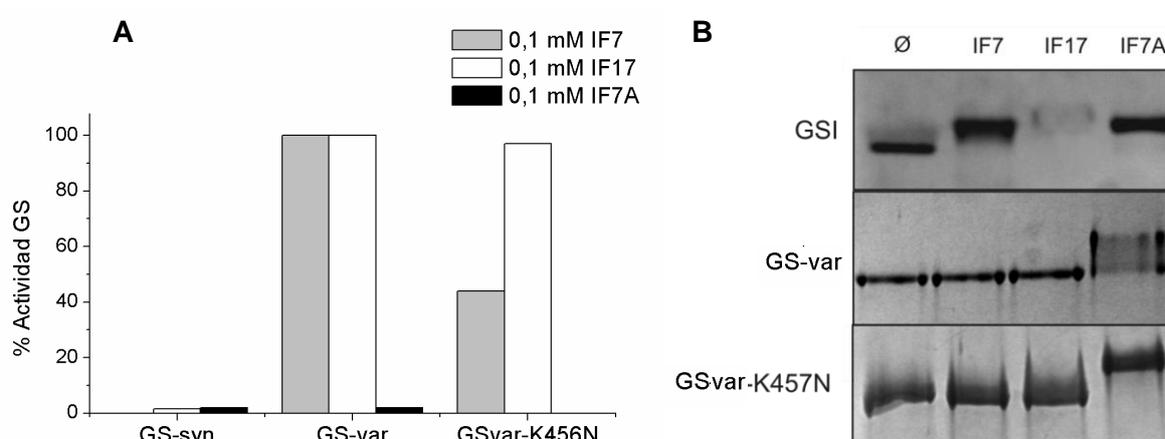


Figura 44. Caracterización de la proteína GSvar-K457N.

A. Inactivación *in vitro* de las proteínas GS-syn, GS-var y GSvar-K457N con IF7, IF17 e IF7A. Se utilizaron cantidades crecientes de cada IF para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura (1 μ M). Se representa la actividad GS relativa alcanzada cuando se incubó cada GS con 0,1 mM de factor inactivante. B. Ensayos de retardo en gel de las proteínas GSI, GS-var y GSvar-K457N (1 μ g) en ausencia y presencia de los factores inactivantes IF7, IF17 e IF7A (30 μ M).

La proteína GSvar-K457N fue analizada en un primer lugar mediante ensayos de inactivación *in vitro*. En los resultados mostrados en la Figura 43 podemos observar que la proteína mutante muestra un nivel de inactivación similar al de la GS de *A. variabilis*. Sin embargo, al añadir los mismos factores inactivantes a una concentración de 0.1 mM, IF7 inactiva parcialmente a la proteína GSvar-K457N alcanzando una actividad del 40 % (Figura 44A).

Con objeto de caracterizar la interacción entre la proteína mutante GSvar-K457N y los factores inactivantes IF7, IF17 e IF7A, se realizaron ensayos de retardo en gel como los anteriormente descritos (Figura 44B). A diferencia de lo obtenido

cuando se incubaba la GS de *A. variabilis* con IF7A, no se observa una modificación clara en la migración de la GS en presencia de IF7 o IF17. Esto indica que aunque IF7 inactive parcialmente a la proteína GSvar-K457N, la afinidad entre ambos no debe ser suficiente para generar un complejo estable que pueda ser observado en los ensayos de retardo en gel.

Con los experimentos realizados en esta sección hemos localizado una región de interacción entre la GSI y los IFs de *Synechocystis*, que corresponde a los 50 últimos residuos del dominio C-terminal. Además, hemos identificado dos residuos que participan activamente en el proceso de interacción e inactivación de la GS, el glutamato 452 y la asparragina 456.

2.2 Mutagénesis dirigida de residuos del extremo carboxilo terminal de la GSI de *Synechocystis*

Una vez localizada una región implicada en la interacción entre la GSI de *Synechocystis* y los factores inactivantes, quisimos profundizar en la identificación de los residuos involucrados en la unión GS/IFs. Para ello se procedió al análisis mutacional de la región carboxilo terminal de la GSI. Para este análisis, se han seleccionado los residuos de carga negativa de la GSI de *Synechocystis*, conservados en aquellas secuencias de GS de cianobacterias que presentan ORFs codificantes de hipotéticos factores inactivantes (Figura 45). Consideramos conservados los aminoácidos idénticos o los cambios isoleucina/leucina, glutamato/aspartato, arginina/lisina y serina/treonina en al menos seis de las ocho secuencias cianobacterianas analizadas.

Mediante PCR en tres fases (Materiales y métodos, apartado B 3.5) se obtuvieron las versiones mutantes del gen *glnA* de *Synechocystis*, que fueron clonadas en el plásmido de expresión pBS-SK(+) junto con la secuencia que codifica una secuencia de 5 histidinas en el extremo 5' del gen insertado. La expresión y purificación de las proteínas mutantes GS-D441A, GS-E448A, GS-E454A, GS-E466A y GS-D472A se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito para las proteínas mutantes descritas en esta sección. Todas las mutaciones diseñadas consistían en la sustitución del residuo conservado por una alanina. Al tratar de expresar y purificar la proteína mutante GS-E466A, observamos que la mutación incorporada provoca una disminución de la solubilidad de la proteína, haciendo necesario el uso de urea para su solubilización y su posterior purificación.

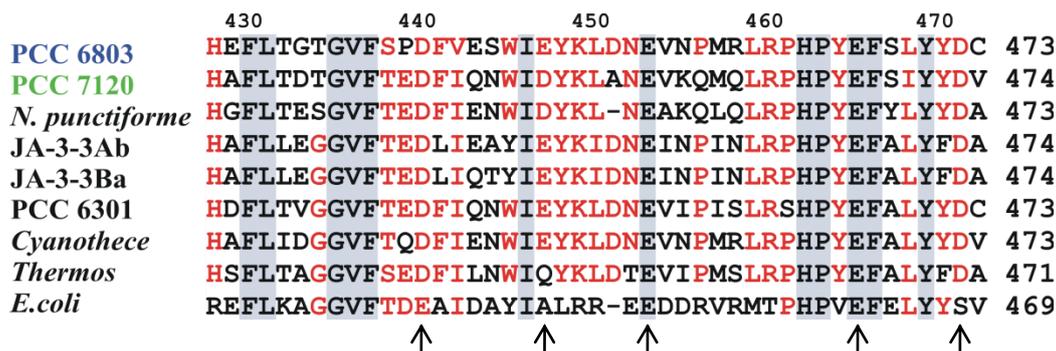


Figura 45. Alineamiento del extremo carboxilo terminal de la GS de cianobacterias y de *Escherichia coli*.

Los residuos conservados en 6 o más secuencias están marcados en rojo. Consideramos conservados los aminoácidos idénticos o los cambios isoleucina/leucina, glutamato/aspartato, arginina/lisina y serina/treonina. Los residuos idénticos en todas las secuencias están sombreados en gris. Los residuos seleccionados para el análisis mutacional están marcados con una flecha. PCC 6803, *Synechocystis* sp. PCC 6803; *Thermos*, *Thermosynechococcus elongatus*; JA-3-3Ab y JA-3-3Ba, *Synechococcus* JA-3-3Ab y JA-3-3Ba, respectivamente; PCC 7120, *Anabaena* sp. PCC 7120; *N. punctiforme*, *Nostoc punctiforme*; PCC 6301, *Synechococcus elongatus* sp. PCC 6301.

Se analizaron las proteínas mutantes obtenidas mediante ensayos de inactivación *in vitro* (Materiales y métodos, apartado E 1.3). Para ello, se incubó una cantidad fija de las diferentes GS purificadas con cantidades crecientes de IF7 e IF17, en tampón de interacción (Hepes-NaOH 50 mM pH 7, KCl 50 mM) en un volumen final de 20 μ l. Tras medir la actividad GS de estas preparaciones, se representó el % de actividad GS frente a la concentración de factores inactivantes de la mezcla (Figura 46). El 100 % de actividad GS corresponde a la obtenida en ausencia de factores inactivantes.

En estos ensayos podemos observar en primer lugar, que el mutante GS-E466A, además de estar afectado en la solubilidad de la proteína, no presenta actividad transferasa. Esto nos indica que el residuo E466 de la GS es crítico para que la enzima sea funcional. Por otro lado, la proteína mutante GS-E448A presenta una menor inactivación con IF7 que la proteína silvestre y una pérdida parcial de la inactivación por IF17. La actividad obtenida cuando la concentración de IF7 es de 2 μ M es del 40 % en relación con la actividad inicial, mientras que la GS silvestre en estas condiciones muestra una actividad residual del 8 %. En cuanto a la inactivación por IF17, mientras que la proteína silvestre se inactiva hasta alcanzar un 4.6 % de

actividad residual en presencia de 1 μM de IF17, la actividad relativa de la proteína mutante GS-E448A es del 25 %.

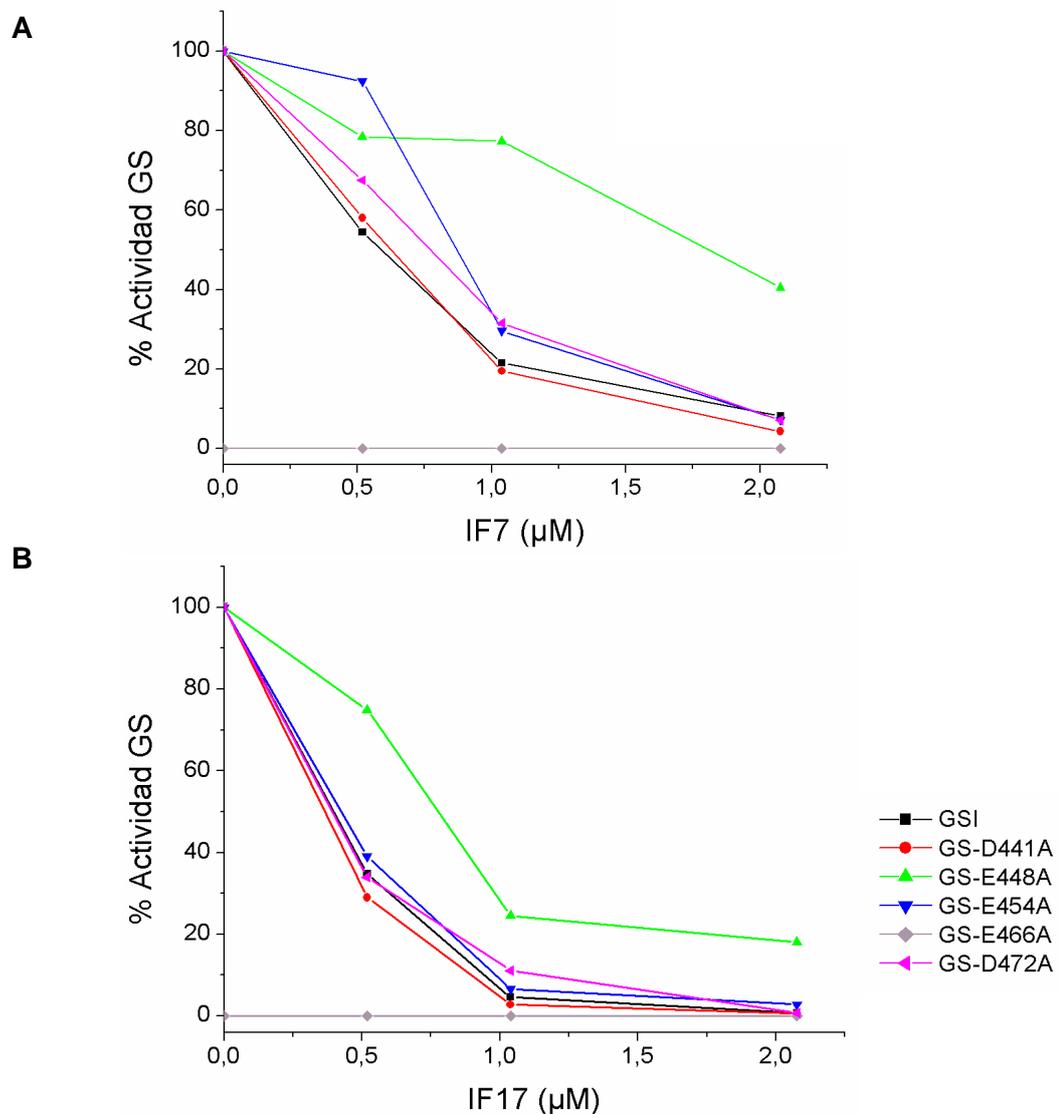


Figura 46. Inactivación *in vitro* de las proteínas GS-D441A, GS-E448A, GS-E454A, GS-E466A y GS-D472A con IF7 (A) e IF17 (B).

Se utilizaron cantidades crecientes de cada IF para inactivar *in vitro* una cantidad fija de GS pura (1 μM).

Se llevaron a cabo ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes con las proteínas mutantes GS-D441A, GS-E448A, GS-E454A y GS-D472A (ver Materiales y métodos, apartado D 4.2) (Figura 47). Como ya se ha mencionado anteriormente, en ausencia de factor inactivante, la GS silvestre de *Synechocystis* aparece como una única banda, mientras que al añadir IF7 o IF17, el complejo GS-IF presenta una migración más lenta.

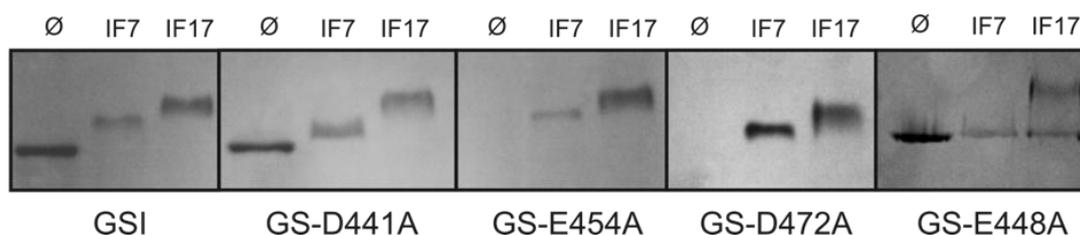


Figura 47. Ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y sus versiones mutantes GS-D441A, GS-E448A, GS-E454A y GS-D472A incubadas con IF7 e IF17.

Se utilizó una cantidad fija de GSI (1.5 µg) incubada con cada factor inactivante (30 µM). El símbolo Ø indica ausencia de factores inactivantes.

Las proteínas GS-E454A y GS-D472A no son detectadas en geles nativos en condiciones no desnaturizantes cuando se encuentran en ausencia de factores inactivantes. Sin embargo, en presencia de éstos, la proteína muestra una migración similar a la observada en la proteína silvestre en las mismas condiciones. Este fenómeno se ha observado en al menos tres repeticiones independientes, con al menos dos preparaciones de proteína de purificaciones diferentes.

En cuanto a la proteína mutante GS-E448A, podemos comprobar que la interacción entre dicha proteína y los factores inactivantes IF7 e IF17 está alterada, puesto que el patrón de migración difiere del observado con la proteína silvestre. En presencia de IF7, la GS-E448A no se retrasa en su migración electroforética. Por otro lado, en presencia de IF17, se observa un retraso parcial en la migración, lo que indica que la proteína GS-E448A tiene una menor afinidad por IF17 que la observada con la proteína silvestre.

Estudios previos han demostrado que la glutamina sintetasa de *Escherichia coli* puede formar agregados supramoleculares en presencia de ciertos metales (ver por ejemplo Yanchunas *et al.*, 1994 y Chen *et al.*, 1997). Con el propósito de determinar si las diferencias en el patrón de migración electroforética de las proteínas GS-E454A y GS-D472A eran debidas a organizaciones supramoleculares se realizó una cromatografía de exclusión molecular de las muestras puras de GSI, GS-E454A y GS-D472A (Figura 48). Las fracciones obtenidas tras la elución fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturizantes, para que mediante tinción con solución de Coomassie se visualizaran las proteínas presentes en cada fracción.

Teniendo en cuenta que este proceso cromatográfico separa a las proteínas en función de su masa molecular, observamos que las tres versiones proteicas aparecen en las mismas fracciones, que corresponden a una masa molecular aproximada de 650 KDa (fracción 15, pico a de la Figura 48A), 350 KDa (fracción 16, pico b de la Figura 48A) y de 55 kDa (fracción 20, pico c de la Figura 48A). Los tamaños se han calculado en función del perfil de elución del preparado comercial estándar. Al someterlo a la cromatografía de exclusión molecular utilizada, este preparado eluye en función a una recta logarítmica que depende del tamaño molecular de las proteínas que contiene. Sabiendo la fracción de elución de la proteína analizada y la ecuación de la recta logarítmica de regresión, podemos calcular el tamaño molecular aproximado de las proteínas que se eluyen en dicha fracción. En todas las fracciones correspondientes a los picos de elución encontramos proteína GS en la electroforesis, por lo que los picos observados corresponden a organizaciones de 12, 6 y 1 subunidades, respectivamente. La altura relativa de los picos b y c es de 0.5 y 0.4, respectivamente, en el análisis de la GSI silvestre; de 0.67 y 0.58, respectivamente, en el análisis de la proteína GS-E454A; y de 0.75 y 0.83, respectivamente, en el análisis de la proteína GS-D472A. Estos resultados indican que la proporción de subunidades desorganizadas en las muestras correspondientes a las proteínas mutantes es mayor que la observada en la muestra de proteína silvestre. Podemos concluir, por tanto, que las diferencias electroforéticas observadas en condiciones no desnaturizantes no se deben a organizaciones supramoleculares, pero podrían deberse a desestabilizaciones que impliquen la desestructuración de la glutamina sintetasa en 6 subunidades o 1 subunidad.

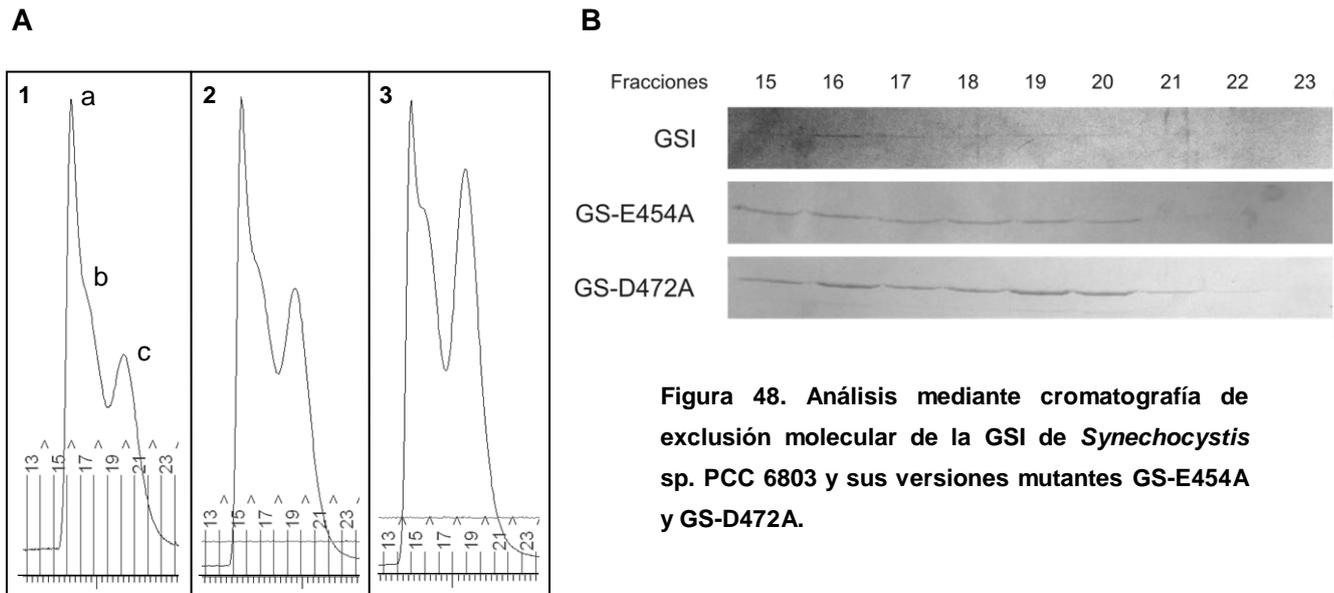


Figura 48. Análisis mediante cromatografía de exclusión molecular de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y sus versiones mutantes GS-E454A y GS-D472A.

La figura 48A corresponde a los perfiles de elución de las proteínas GSI, GS-E454A y GS-D472A (perfiles 1, 2 y 3, respectivamente). Los picos observados se representan aquí como *a*, *b* y *c*. La figura 48B corresponde a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes de las fracciones eluidas.

2.3 Estudio mutacional del residuo E466 de la GSI de *Synechocystis*

Para tratar de determinar cuál es el motivo de la pérdida de solubilidad y actividad en el mutante GS-E466A, se diseñaron y purificaron nuevos mutantes puntuales con distintas sustituciones en el mismo residuo. El objetivo fue cambiar las características bioquímicas del residuo localizado en la posición 466 de la GS de *Synechocystis*. Al igual que para las proteínas mutantes de la GS descritas anteriormente, las versiones del gen *glnA* de *Synechocystis* fueron obtenidas mediante PCR en tres fases (Materiales y métodos, apartado B 3.5), y clonadas en el plásmido pBS-SK(+) junto con la secuencia que codifica 5 histidinas en el extremo 5' del fragmento clonado. Se obtuvieron así las versiones mutantes del gen *glnA* codificantes de las proteínas GS-E466D, GS-E466Q y GS-E466K, que se analizaron junto a la anteriormente citada GS-E466A.

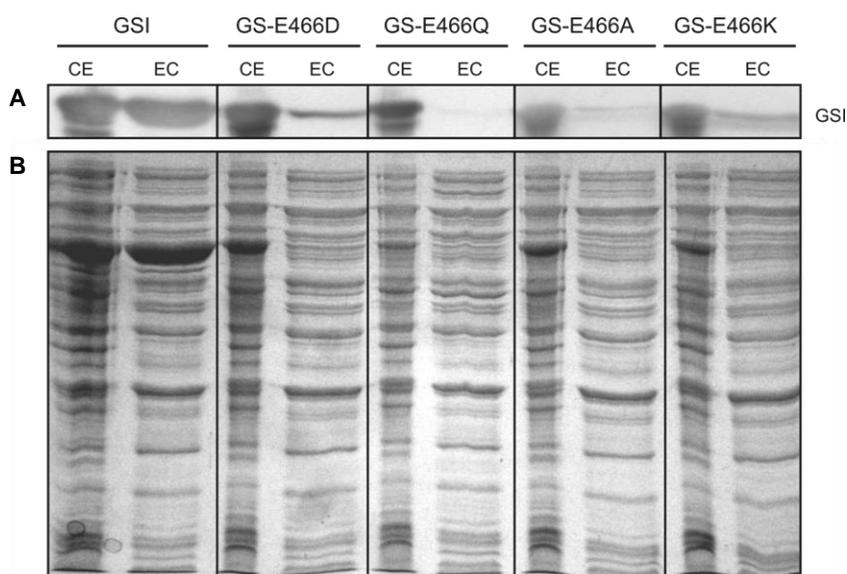


Figura 49. Análisis de solubilidad de las proteínas GSI, GS-E466D, GS-E466Q, GS-E466A y GS-466K mediante Western blot.

Tras la expresión de las diferentes versiones silvestre y mutantes de la GSI en la estirpe ET6017 de *E. coli*, se procedió a separar el extracto crudo (fracción soluble). Las muestras de células enteras (CE) fueron igualadas según la densidad óptica a 600 nm. Las muestras de extracto crudo (EC) fueron igualadas por concentración de proteína, determinada mediante el método de Bradford. Como control de carga del filtro del Western blot (A), las muestras fueron sometidas a electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE al 12% (B).

Con objeto de analizar la solubilidad de las diferentes proteínas mutantes, éstas fueron expresadas en la estirpe ET6017 de *E. coli*, carente de glutamina sintetasa, a la que se le introdujeron las versiones génicas de *glnA* mediante electroporación. Se recogió el cultivo, se resuspendió en tampón Hepes-NaOH 50 mM, pH 8 y se sometió a sonicación durante 10 pulsos de 30 segundos a 40 W, alternados con 30 segundos en hielo. Tras la centrifugación de cada muestra durante 20 minutos a 18000 rpm, fue recogido el sobrenadante (extracto crudo), que corresponde a la fracción soluble de cada una de ellas. Las células enteras así como el extracto crudo fueron analizados mediante Western-blot utilizando anticuerpo anti-GS (Figura 49A). Como control, la misma cantidad de cada muestra fue sometida a electroforesis en condiciones desnaturizantes, y teñida posteriormente con solución de tinción con Coomassie (Figura 49B). Se observa que las proteínas mutantes analizadas mostraban una menor solubilidad que la GS silvestre, en diferentes proporciones. La proteína con mayor solubilidad entre las mutantes es la GS-E466D, seguida por GS-

E466K y por último, las proteínas GS-E466Q y GS-E466A parecen ser completamente insolubles.

El estudio funcional de estas versiones mutantes se llevo a cabo utilizando de nuevo la estirpe ET6017 portadora de las diferentes versiones mutantes de la GS. Para ello, se realizaron ensayos de actividad GS *in situ* utilizando la misma cantidad de células para cada versión mutante y silvestre (Materiales y métodos, apartado E 1.1). Tras medir la actividad GS de estas muestras, se representó la actividad GS relativa respecto a la proteína silvestre de cada una de ellas (Figura 50).

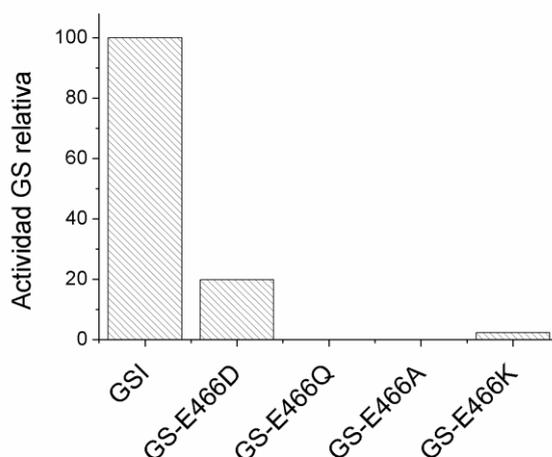


Figura 50. Actividad *in situ* de las proteínas GSI, GS-E466D, GS-E466Q, GS-E466A y GS-E466K en la estirpe ET6017 de *Escherichia coli*.

Se utilizó el mismo número de células para cada versión mutante. El valor 100 % corresponde a la actividad mostrada en la estirpe que contiene la proteína silvestre GSI.

Por otro lado, diluciones seriadas de los cultivos de ET6017 transformantes se sembraron en placas con medio mínimo M9 (Figura 51). La ausencia de GS en la estirpe ET6017 comporta la auxotrofia para la glutamina, haciendo necesaria la adición de este compuesto al medio para su crecimiento. En su defecto, la expresión de una glutamina sintetasa funcional en estas células puede complementar dicha auxotrofia. Así, analizando la capacidad de crecimiento en un medio M9, carente de glutamina, de la estirpe ET6017 transformada con las diferentes versiones mutantes del gen *glnA*, podemos comprobar la capacidad de complementación de cada una de ellas. Observamos en el ensayo de complementación que la proteína silvestre GSI de *Synechocystis* permite el crecimiento de la estirpe ET6017 en ausencia de glutamina. La proteína GS-E466D posibilita también el crecimiento de estas células, aunque en

menor grado que la anterior. Las proteínas GS-E466Q y GS-E466A, en cambio, no son funcionales puesto que no se observa complementación en este ensayo. La auxotrofia de la estirpe ET6017 es levemente complementada al expresar la GS-E466K. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad *in situ*, de forma que el grado de complementación de la auxotrofia de ET6017 es mayor cuanto más actividad transferasa *in situ* presenten.

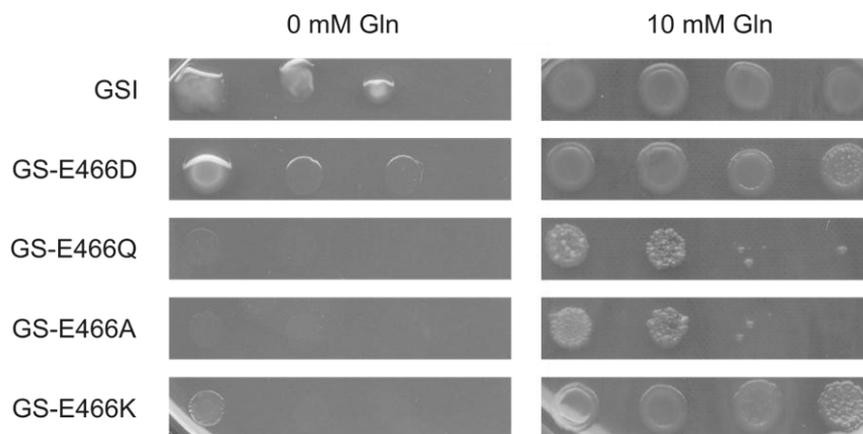


Figura 51. Ensayo de complementación de la auxotrofia de glutamina de la estirpe ET6017 de *Escherichia coli* por la expresión de las proteínas GSI, GS-E466D, GS-E466Q, GS-E466A y GS-E466K.

El medio utilizado para el ensayo de complementación fue medio mínimo M9, suplementado en su caso con 10 mM de L-glutamina. Se utilizaron el mismo número de células para cada versión mutante, utilizando diluciones seriadas 1/10.

Por otra parte, se observa un menor crecimiento en presencia de glutamina en las células que expresan las proteínas mutantes GS-E466Q y GS-E466A (Figura 51). Esto sugiere que la expresión de estas proteínas perjudica y, como consecuencia, disminuye la tasa de crecimiento de las células que las portan.

3. ESTUDIO CRISTALOGRÁFICO DE LA GSI DE *SYNECHOCYSTIS*

La obtención de un modelo estructural de la conformación terciaria o cuaternaria de las proteínas puede aportarnos una noción de cómo éstas desempeñan su función. Existen varias técnicas que permiten la aproximación estructural de moléculas complejas como las proteínas. Las más conocidas y utilizadas son la cristalografía de rayos X y la espectroscopia por Resonancia Magnética Nuclear o NMR (*Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy*), ambas proporcionan un modelo de resolución atómica. La cristalografía de rayos X es un método para determinar la disposición de los átomos dentro de un cristal, el cual es atravesado por un haz de rayos X que difracta en direcciones diferentes y específicas. En función del ángulo y la dirección de estas difracciones, se puede obtener un modelo en tres dimensiones de las densidades atómicas que conforman el cristal. A partir de este mapa de densidad y conociendo la composición del cristal, se determinan las posiciones principales de los átomos que lo forman.

Desde la resolución de la primera estructura mediante cristalografía en 1958 (Kendrew *et al.*, 1958) se han determinado alrededor de 50000 estructuras a partir de cristales de proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas biológicas. Las proteínas, como otras muchas moléculas, pueden cristalizar cuando se las emplaza en las condiciones adecuadas. La cristalografía permite la construcción de modelos estructurales de proteínas sin limitación de tamaño, a diferencia del NMR, técnica restringida al estudio de proteínas de menos de 70 kDa.

El proceso cristalográfico para la resolución de un modelo estructural de una proteína puede resumirse en tres pasos consecutivos. En un primer lugar, se deben obtener cristales a partir de una muestra de proteína pura. Posteriormente, el cristal es sometido a difracción de rayos X, produciendo un patrón determinado de reflexiones. Puesto que el cristal rota gradualmente durante el proceso de la recolección de datos, se obtiene un patrón de reflexiones por cada ángulo de incidencia del haz. Por último, estos datos colectados se combinan mediante manipulación computacional, y se genera y refina un modelo de la organización atómica que conforma el cristal.

3.1 Obtención de cristales de la glutamina sintetasa de *Synechocystis*

Para el análisis estructural de la GSI de *Synechocystis*, se procedió a la expresión y purificación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* silvestre, así como de la versión mutante GS-N456K, incapaz de ser inactivada por los factores inactivantes de *Synechocystis*. Las versiones silvestre y mutante del gen *glnA* de *Synechocystis*, clonadas en el plásmido de expresión pBS-SK(+), se expresaron en la estirpe DH5 α de *E. coli*, a 37 °C durante 10-12 horas en agitación constante. Puesto que se insertó una secuencia que codifica 5 histidinas en el extremo 5' del gen, las proteínas expresadas fueron purificadas, en primer lugar, mediante cromatografía de afinidad por níquel. Posteriormente, y para aumentar la pureza de la muestra, se realizó un proceso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular (ver Materiales y métodos, apartado D 6). Se obtuvieron unas concentraciones de GS silvestre y GS-N456K de 11.25 y 10.64 mg/ml, respectivamente, en un tampón Tris-HCl 25 mM pH 7.0. Mediante cromatografía de exclusión molecular, electroforesis en condiciones no desnaturizantes y estudio mediante *static light scattering* (método que se basa en la dispersión de luz de una muestra de proteína dada en función de la composición de la misma) se determinó la pureza y el estado conformacional de las muestras, siendo óptimas para su cristalización.

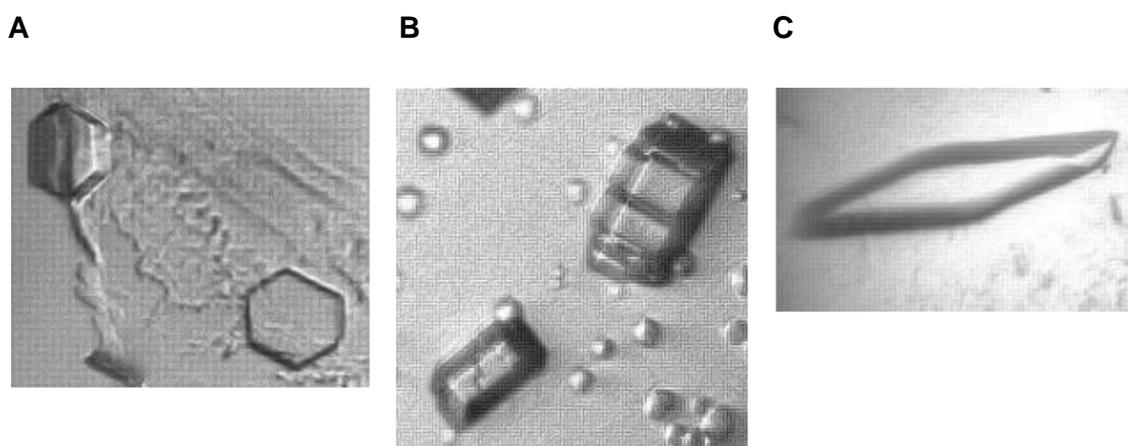


Figura 52. Cristales vistos al microscopio, obtenidos a partir de muestras puras de GS silvestre (A), y mutante GS-N456K (B y C) de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La enzima silvestre fue cocrystalizada con Mn²⁺ y AMP-PNP.

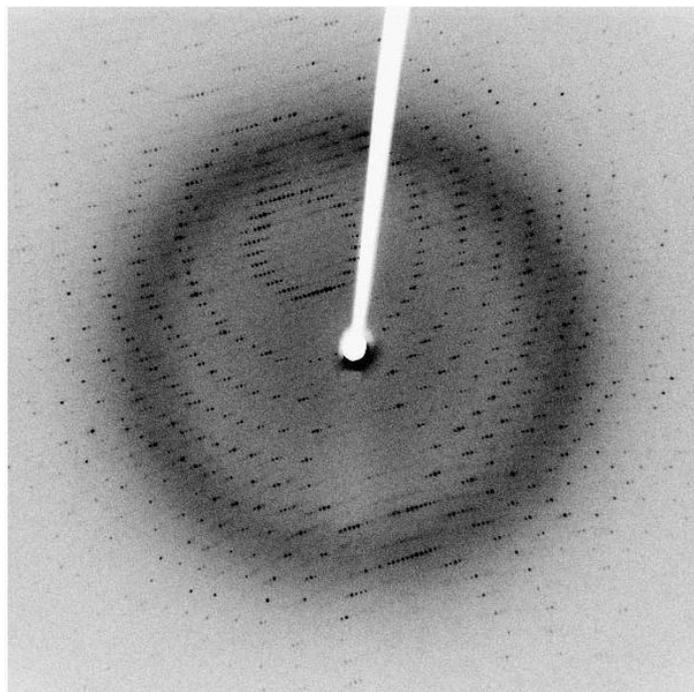


Figura 53. Patrón de difracción de un cristal de GS-N456K de *Synechocystis*.

Para la cristalización de la GSI de *Synechocystis*, se utilizó la técnica de difusión de vapor por gota colgante, tanto para las cribas como para la optimización posterior de la condición adecuada. Para aumentar el rendimiento del procedimiento, se utilizó el sistema automático Mosquito^R (TTP LabTech). Los kits comerciales utilizados para las cribas así como las condiciones óptimas para la cristalización de la GS silvestre y mutante de *Synechocystis* se detallan en Materiales y métodos, apartado F 1. Se obtuvieron cristales a partir de GSI silvestre a 11.25 mg/ml de concentración en presencia de Mn^{2+} , cofactor de la enzima, y AMP-PNP, análogo del ATP que confiere estabilidad a la proteína, que tras ser optimizados, difrataron a una resolución de 2.8 Å (Figura 52A). Se consiguieron también dos tipos de cristales a partir de proteína pura GS-N456K a una concentración de 10.64 mg/ml, que difrataron a 3.69 Å y 3 Å (Figura 52B y C, respectivamente). Los datos de difracción obtenidos se utilizaron posteriormente para la construcción de un modelo estructural de la GS silvestre y mutante.

3.2 Difracción de cristales de la glutamina sintetasa de *Synechocystis*

Los cristales obtenidos en el proceso de cristalización de la GSI silvestre y mutante de *Synechocystis* fueron difractados en el difractómetro de rayos X localizado en el Molecular Biology Institute (MBI) de la Universidad de California Los Angeles (UCLA). Aquellos cristales que difractaron en el difractómetro del MBI a una resolución menor a 4 Å, fueron analizados en el sincrotrón Advance Photon Source (APS) en Chicago (Figura 53).

3.3 Análisis de los datos recogidos

El indexado, el integrado y el escalado de los datos obtenidos en la difracción de los cristales de la GS silvestre y mutante de *Synechocystis* se realizaron utilizando el programa informático Denzo/Scalepack (Materiales y métodos, apartado F 1), generando así un mapa de densidad electrónica para cada cristal difractado y recogido.

3.4 Refinamiento de los modelos estructurales construidos

Tras la obtención de fases se construye un modelo inicial, que es usado para refinar las fases calculadas, dando lugar así a un modelo mejorado, mediante el uso de los programas informáticos Coot y Phenix.

A este respecto, el modelo estructural de la GS silvestre a una resolución de 2.8 Å, presenta un valor R-factor de 0.29, mientras que los dos modelos estructurales obtenidos para la proteína mutante GS-N456K a una resolución de 3.69 Å y 3 Å muestran un R-factor de 0.19 y 0.25, respectivamente. Como se observa, los valores R-factor obtenidos no se corresponden con las resoluciones, debido a problemas internos del cristal.

El cristal que corresponde a la proteína pura GS cocrystalizada con Mn^{2+} y AMP-PNP presentó un problema de translocación (*translocation*), que consiste en el desplazamiento de capas internas del cristal en diferentes direcciones (Figura 54B), y que se manifiesta como cambios en los patrones de difracción, formando líneas en lugar de puntos discretos (Figura 54A). Para corregir dicha imperfección, es necesario eliminar la capa que se encuentra translocada y aplicar un algoritmo de corrección de forma computacional (Wang *et al.*, 2005).

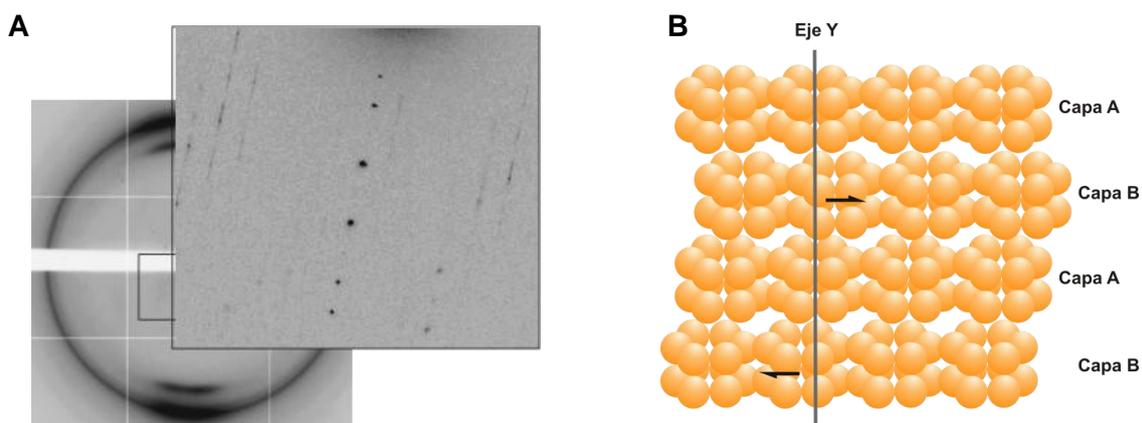


Figura 54. Características de un cristal translocado.

A. Patrón de reflexiones característico de un cristal translocado. Corresponde a una difracción del cristal obtenido a partir de GSI cocristalizada con Mn^{2+} y AMP-PNP B. Esquema del proceso de translocación a nivel molecular en el interior del cristal.

Una vez refinado el modelo estructural, se obtuvo un archivo PDB que puede ser visualizado y analizado mediante los programas PyMolTM o Coot. Los datos que caracterizan los modelos estructurales finales obtenidos se detallan en la Tabla 11. Los modelos estructurales de la GSI-AMP-PNP-Mn a 2.8 Å y la GS-N456K a 3.69 Å y 3.0 Å se representan en la Figura 55, donde se observa la vista superior de un anillo de cada uno de los modelos. El modelo obtenido para la GSI fue depositado en la base de datos PDB (*Protein Data Bank*) siguiendo las instrucciones dadas, de manera que el archivo obtenido fue el 3NG0.pdb.

Parámetro estadístico	GSI-Mn-AMP-PNP	GS-N456K	GS-N456K
Datos recogidos			
Resolución (Å)	2.80	3.00	3.69
Grupo espacial	P622	P1	P21
Dimensiones de la celda unidad			
<i>a</i> (Å)	132.02	128.99	109.92
<i>b</i> (Å)	132.02	193.72	136.51
<i>c</i> (Å)	202.13	129.22	216.94
Fuente de radiación	APS beamline 24-ID-C	FRE+	APS beamline 24-ID-C
Longitud de onda de radiación	0.9791	0.9791	0.9791
Completado (%)	99.2	73	99.6
Datos del refinamiento			
Programa de refinamiento	Phenix 1.5	Phenix 1.5	Phenix 1.5
Moléculas de la proteína en la celda unidad	12	24	12
Residuos refinados	463	11280	5640
Átomos de la proteína (no hidrógenos)	3665	89474	44640
Moléculas de agua del solvente refinadas	18	50	0
Otras moléculas refinadas	2 iones Mg ²⁺ 1 AMP-PNP	0	0
Rango de resolución	75.72-2.8	30.7-3.0	80-3.69
Número de reflexiones utilizadas para el refinado	24998	157672	60558
R-factor	0.28	0.25	0.19
R-free	0.31	0.32	0.23
<i>B</i> -factor general (Wilson) (Å ²)	31.64	17.27	12.7
<i>B</i> -value principal, en cadenas principales (Å ²)	28.9	24.033	41.7 /
r.m.s.d <i>B</i> -factors, en cadenas principales (Å ²)	2.2	8.77	5.3
Patrón Ramachandran			
Residuos favorecidos (%)	91.9	85.16	82.25
Residuos no favorecidos (%)	3.27	6.34	6.16

Tabla 11. Resultados estadísticos del modelo estructural de la GSI silvestre y de la proteína GS-N456K de *Synechocystis* obtenidos mediante cristalografía a una resolución de 2.8 Å, 3.0 Å y 3.69 Å.

Los cristales utilizados contenían proteína pura GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en presencia de Mn²⁺ y AMP-PNP, o bien proteína pura GS-N456K sin adición de otras moléculas.

3.5 Análisis de los modelos estructurales obtenidos

La glutamina sintetasa de tipo I de *Synechocystis* presenta 12 subunidades organizadas en dos anillos hexaméricos superpuestos, con una simetría 622 en su conformación nativa (Figura 56A). Posee 12 sitios activos localizados entre subunidades del mismo anillo. Cada sitio activo forma un doble embudo o *bifunnel* cuya entrada se localiza en la parte superior e inferior para los sustratos ATP y glutamato, respectivamente (Figura 56B). El dominio carboxilo terminal de cada subunidad (subunidades 401-473) participa en la interacción y el mantenimiento de la conexión entre los anillos, y se encuentra embebido en la subunidad más próxima del anillo adyacente.

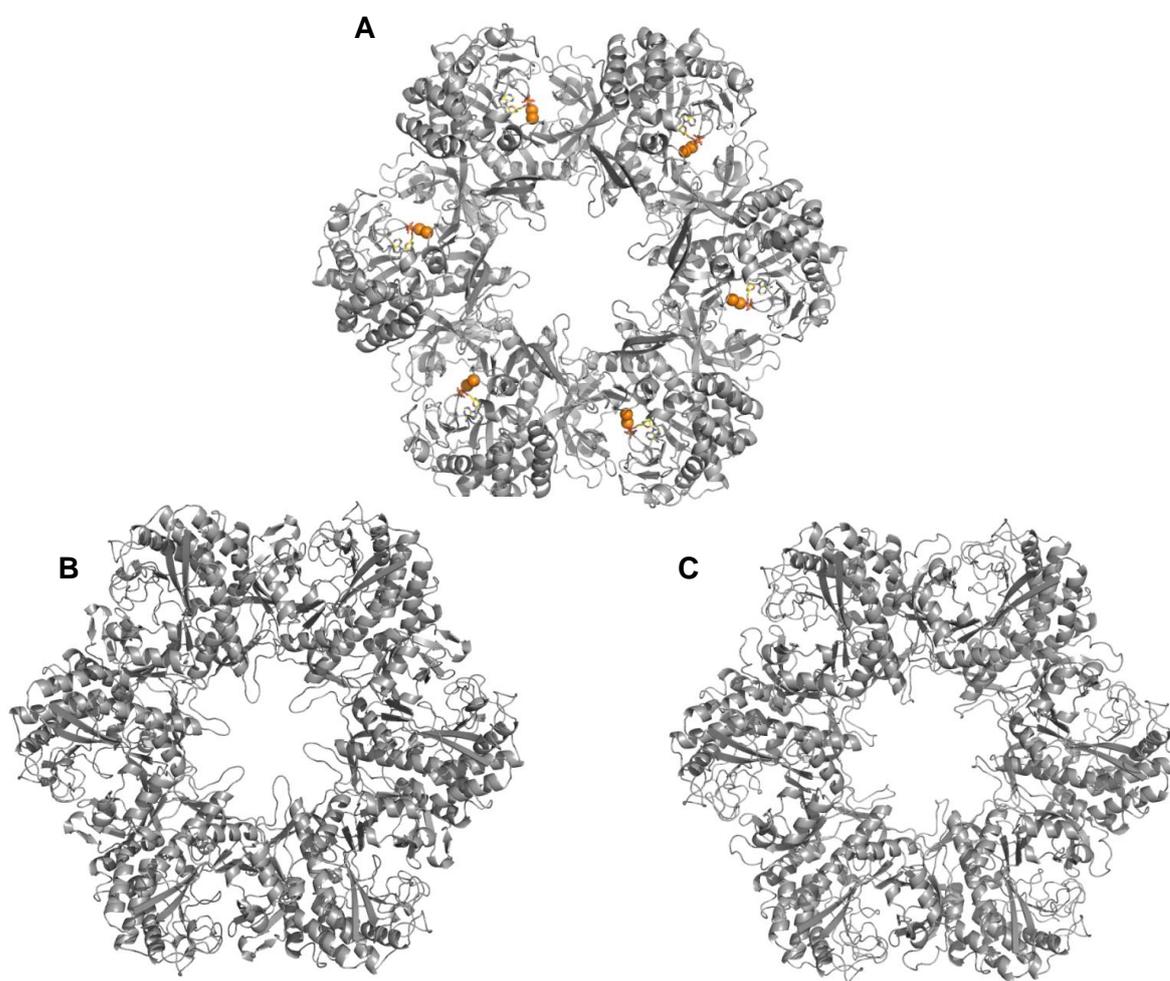


Figura 55. Modelos estructurales de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* obtenidos en este trabajo.

Vista superior de uno de los anillos del modelo estructural de la GSI silvestre (A) y mutante (B y C) de *Synechocystis*. La enzima silvestre fue cocristalizada con AMP-PNP, representado como bastones, y Mn^{2+} , esferas naranjas. Cada anillo presenta una longitud de 148 Å en la simetría de 2 ejes y 102 Å en la simetría de 6 ejes. Las resoluciones obtenidas fueron de 2.8 Å (A), 3.69 Å (B) y 3 Å (C).

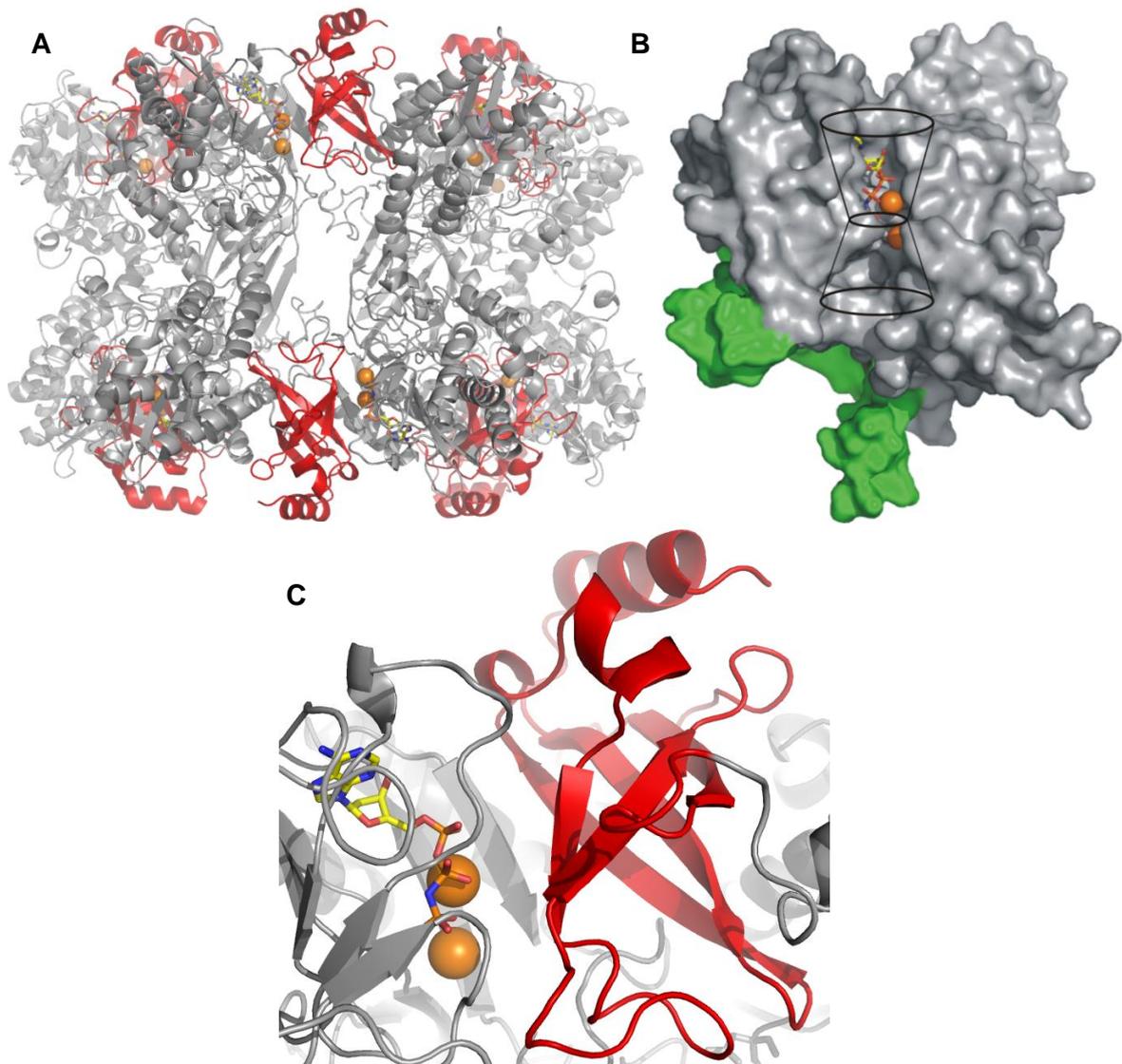


Figura 56. Estructura de la glutamina sintetasa de *Synechocystis*.

A. Vista lateral de la enzima. B. Representación en superficie de una subunidad. C. Ampliación de la región amino terminal de la GSI caracterizada por presentar un dominio β -grasp. La enzima fue cocrystalizada con AMP-PNP, representado como bastones, y Mn^{2+} , esferas naranjas. La zona coloreada en verde corresponde al extremo carboxilo terminal de la enzima (B), la zona sombreada en rojo corresponde al extremo amino terminal (C). Se dibuja sobre la estructura el modelo de doble embudo que forma el sitio activo. La entrada del AMP-PNP, análogo al ATP, ocurre por la parte superior del doble embudo. La entrada del glutamato, no representado aquí, ocurriría por la parte inferior. Los iones de Mn^{2+} se encuentran en la zona central del *bifunnel*, coloreados en naranja.

Residuo de la cadena A	Residuos adyacentes de la cadena G	Distancia (Å)
Asn453	Leu469	3.99
Glu454	Tyr470	2.85
Met458	Glu466	4.17
Arg461	Tyr465	3.53
	Phe264	3.41
	His463	3.87
Pro462	Lys261	3.15
	His463	3.63
His463	Arg461	3.87
	Pro462	3.63
	His463	3.31
Pro464	Ser150	3.46
Tyr465	Arg461	3.53
	Pro457	4.38
Glu466	Thr319	2.77
	His463	2.83
	Lys323	2.70
	Asn320	2.89
Phe467	Met259	3.77
	Pro262	3.68
	Tyr152	3.23
	Ile141	3.80
Ser468	Arg160	3.42
Leu469	Asn453	2.99
Tyr470	Glu454	2.85
	Thr319	3.63
Tyr471	Thr255	3.41
Cys473	Thr366	4.23
	Lys242	3.52
	Lys246	2.97

Tabla 12. Distancias comprendidas entre los últimos 50 residuos del extremo carboxilo terminal de la cadena A, y los residuos de la cadena G (adyacente a la anterior) de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Los residuos aquí omitidos no presentan ninguna interacción aparente con la subunidad adyacente. Se han considerado distancias que potencialmente pueden implicar interacción entre residuos aquellas menores a 4.5 Å.

El extremo N-terminal de cada subunidad está formado por una α -hélice formada por los primeros 18 aminoácidos, seguida de cinco hojas beta antiparalelas

que conforman el dominio β -grasp, que participa en la actividad transferasa de la enzima. Por otro lado, el dominio catalítico de la GS interacciona con el dominio β -grasp de la subunidad vecina, dentro de un mismo anillo (Figura 56A y 56C).

La conexión entre los dos anillos que conforman la enzima ocurre a través del extremo C-terminal de cada subunidad, que se introduce en la subunidad adyacente del anillo contrario. Con objeto de describir qué fuerzas mantienen dicha conexión, se han estudiado los residuos que intervienen, utilizando el programa informático PyMol™. Para cuantificar la implicación de cada uno de los residuos del extremo C-terminal de la GSI, se han calculado las distancias entre dichos residuos y aquellos que pertenecen al anillo adyacente y que se encuentran cercanos a los anteriores (a menos de 4.5 Å), utilizando el modelo estructural de la GSI en presencia de Mn y AMP-PNP, obtenido a 2.8 Å. La Tabla 12 recoge los datos obtenidos.

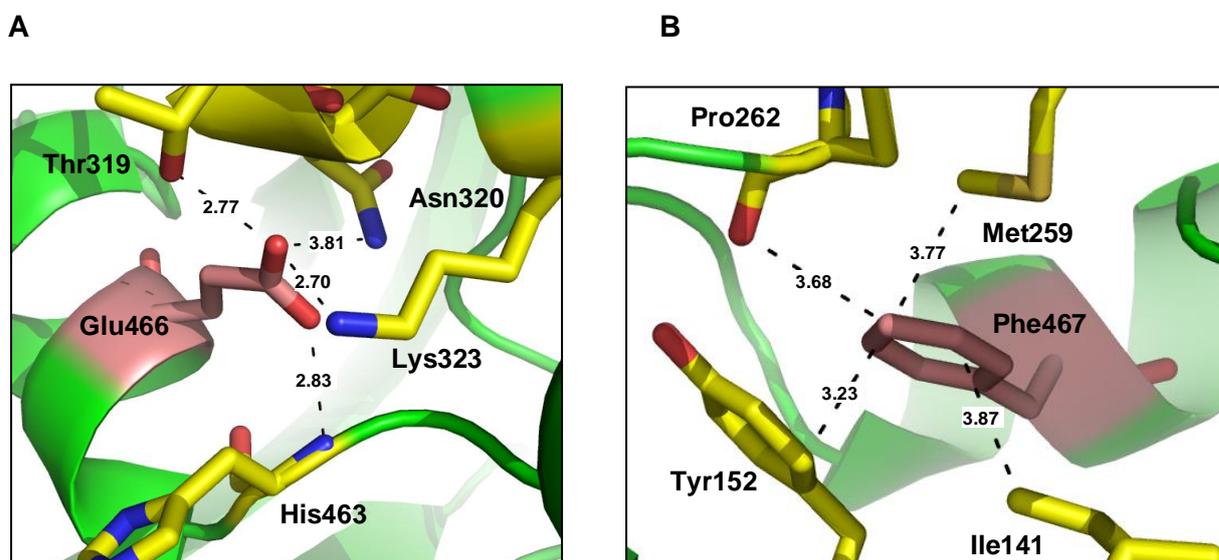


Figura 57. Análisis de los residuos Glu466 (A) y Phe467 (B) de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Los residuos destacados están esquematizados en bastones, los carbonos están coloreados en rosa, para los residuos Glu466 (A) y Phe467 (B), o en amarillo, para el resto. Los nitrógenos están coloreados en azul y los oxígenos en rojo. Las distancias están calculadas en Å.

Almassy *et al.* (1986) determinaron que las subunidades de la GS bacteriana se mantienen unidas mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Podemos observar que los residuos glutamato 466 y fenilalanina 467 de la GSI presentan el mayor número de interacciones con el anillo opuesto de todos los analizados. La fenilalanina 467, que es un residuo de tipo hidrofóbico, muestra

interacción con una metionina, una prolina, una tirosina y una isoleucina (Figura 57B). Tres de estos residuos son del mismo tipo, por lo que es posible que las interacciones que se observan sean hidrofóbicas, típicas de las regiones internas de la proteína. La interacción con la tirosina, en cambio, podría consistir en un puente de hidrógeno, donde el grupo hidroxilo de éste residuo actuara como donador del hidrógeno. El residuo polar Glu466 de carga negativa presenta su grupo carboxilo en conexión con la treonina 319, la histidina 463, la lisina 323 y la asparragina 320 (Figura 57A). La interacción que se observa entre el glutamato 466 y los residuos lisina, treonina y asparragina parecen consistir en enlaces de hidrógeno, en los que el grupo amida de la Asn, el grupo hidroxilo de la Thr y el grupo amino de la Lys actúan como donador del hidrógeno, mientras que el glutamato es el aceptor. Por otro lado, las distancias que presentan son compatibles con la longitud común de un puente de hidrógeno (2.7-2.9 Å). La interacción observada entre la histidina 463 y el grupo carboxilo del glutamato 466 es a través del grupo amino del enlace peptídico de la primera. Por ello, es posible que la interacción entre ambos consista también en un enlace de hidrógeno.

En el sitio activo de la GSI de *Synechocystis* se encuentra una molécula de AMP-PNP (adenosine 5'-[β,γ -imido]triphosphate), molécula no hidrolizable análoga al ATP en la que el átomo de oxígeno entre el último y el segundo fosfato está reemplazado por un grupo imida (Figura 58). Esta molécula se une al sitio activo de la GSI, inhibiéndola (Liaw *et al.*, 1994).

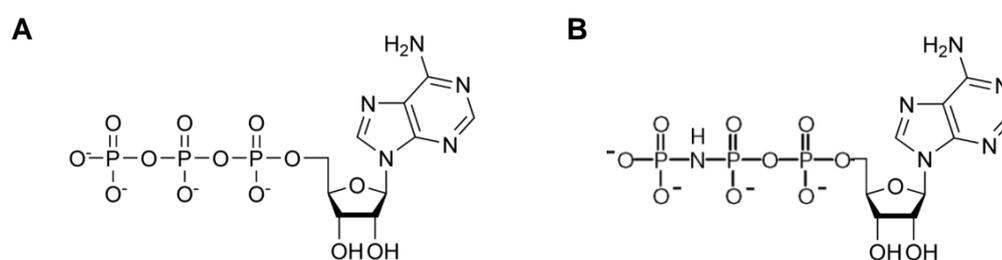


Figura 58. Modelo esquemático de las moléculas de ATP (Adenosín trifosfato) (A) y AMP-PNP (B).

Grupo fosfato del AMP-PNP	Componentes del sitio activo de la GSI	Distancia (Å)
α	Glu210	4.61
	Lys211	3.09
	Mn2	4.41
β	Glu132	2.71
	Mn2	2.66
γ	Arg342	2.74 y 2.99
	Arg363	3.18
	His272	2.66
	Glu361	2.11
	Glu132	2.60
	Mn2	2.75

Tabla 13. Distancias comprendidas entre los grupos fosfatos del AMP-PNP y los componentes del sitio activo de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La molécula de AMP-PNP interactúa con múltiples residuos del sitio activo de la GSI de *Synechocystis*. En primer lugar, la adenina del AMP-PNP se encuentra en contacto con la lisina 356, la arginina 359 y la fenilalanina 228, separada de ellos por una distancia de 3.62 Å, 3.47 Å y 3.55 Å, respectivamente (Figura 59A). En cuanto a la ribosa, ésta interactúa con la histidina 274, la arginina 359, el glutamato 210, la isoleucina 226 y la lisina 227, presentando unas distancias de 3.47 Å, 4.09 Å, 3.29 Å, 2.71 Å y 3.52 Å, respectivamente (Figura 59B). Por último, las interacciones entre los grupos fosfato con los diferentes componentes del sitio activo se recogen en la Tabla 13 (Figura 59C).

Además del AMP-PNP, en el sitio activo de la GSI de *Synechocystis* encontramos dos iones Mn^{2+} , denominados aquí Mn1 y Mn2 y localizados en las posiciones conocidas en la bibliografía como n2 y n1, respectivamente. Ambos se encuentran en la zona central del sitio activo donde confluyen los dos embudos del *bifunnel*, y están involucrados en la transferencia del grupo fosfato (n1) y en estabilizar la GS activa (n2) (Eisenberg *et al.*, 2000). En la GSI de *Synechocystis*, ambos iones están separados por una distancia de 5.35 Å y se encuentran en conexión con diferentes residuos del sitio activo así como con el AMP-PNP (Tabla 14) (Figura 60).

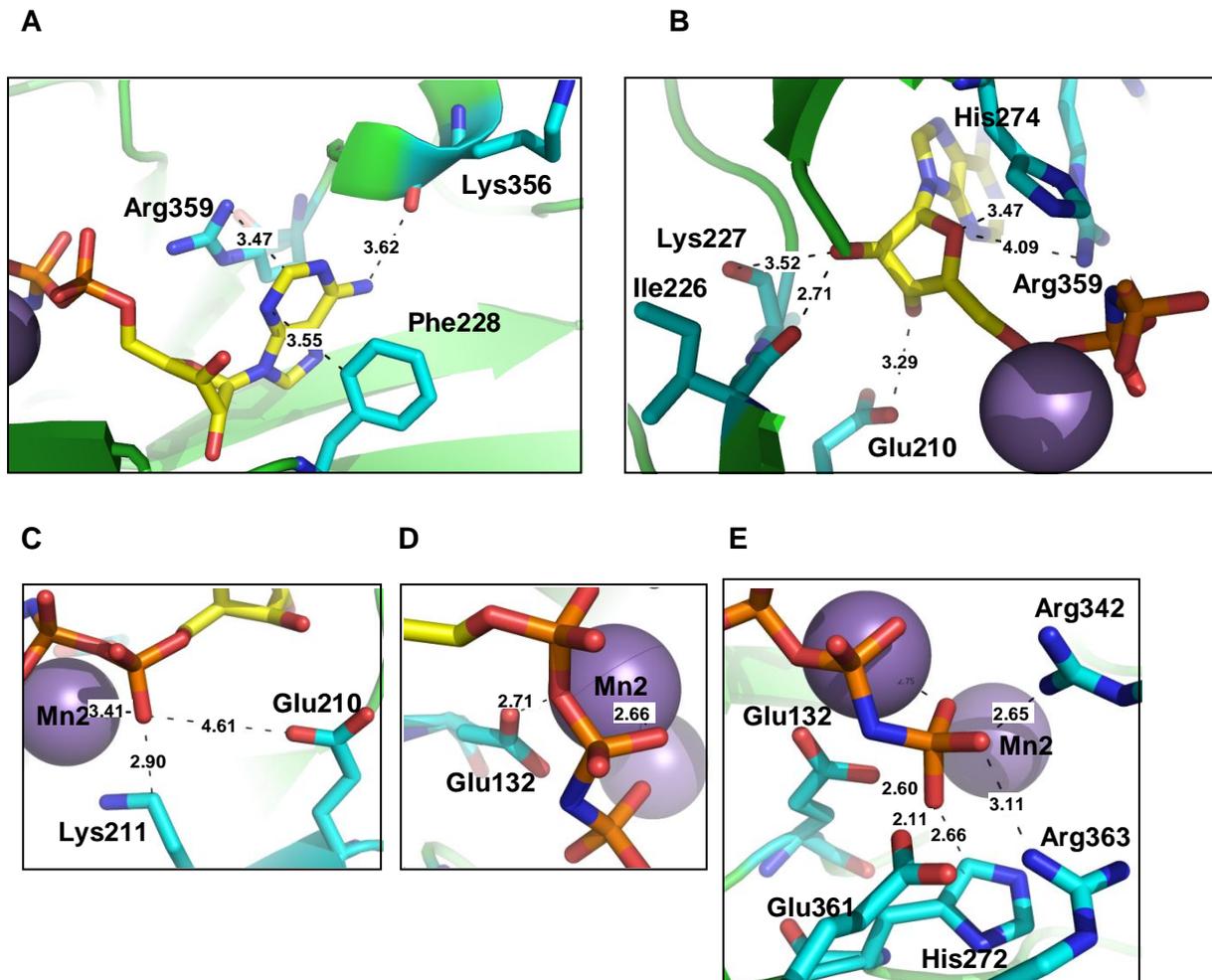


Figura 59. Análisis del AMP-PNP en el sitio activo de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se muestran las conexiones observadas entre los residuos del sitio activo y la adenosina (A) y la ribosa (B) y los grupos fosfatos (C, alpha; D, beta; E, gamma) del AMP-PNP. Los residuos están esquematizados en bastones, los carbonos están coloreados en amarillo, para el AMP-PNP, o en azul claro, para el resto. Los nitrógenos están coloreados en azul, los fósforos en naranja y los oxígenos en rojo. Las distancias están calculadas en Å.

ión Mn^{2+}	Grupo del AMP-PNP o residuos del sitio activo	Distancia (Å)
Mn1 (n2)	Fosfato γ	4.51
	His272	4.80
	Glu134	2.58
	Glu215	2.70
	Glu223	3.03
	Mn2	5.35
Mn2 (n1)	Fosfato α	2.75
	Fosfato β	2.66
	Fosfato γ	3.41
	Lys211	3.18
	His213	5.22
	Glu132	2.79
	Mn1	5.35

Tabla 14. Distancias comprendidas entre los iones Mn^{2+} y los residuos del sitio activo de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 así como el AMP-PNP.

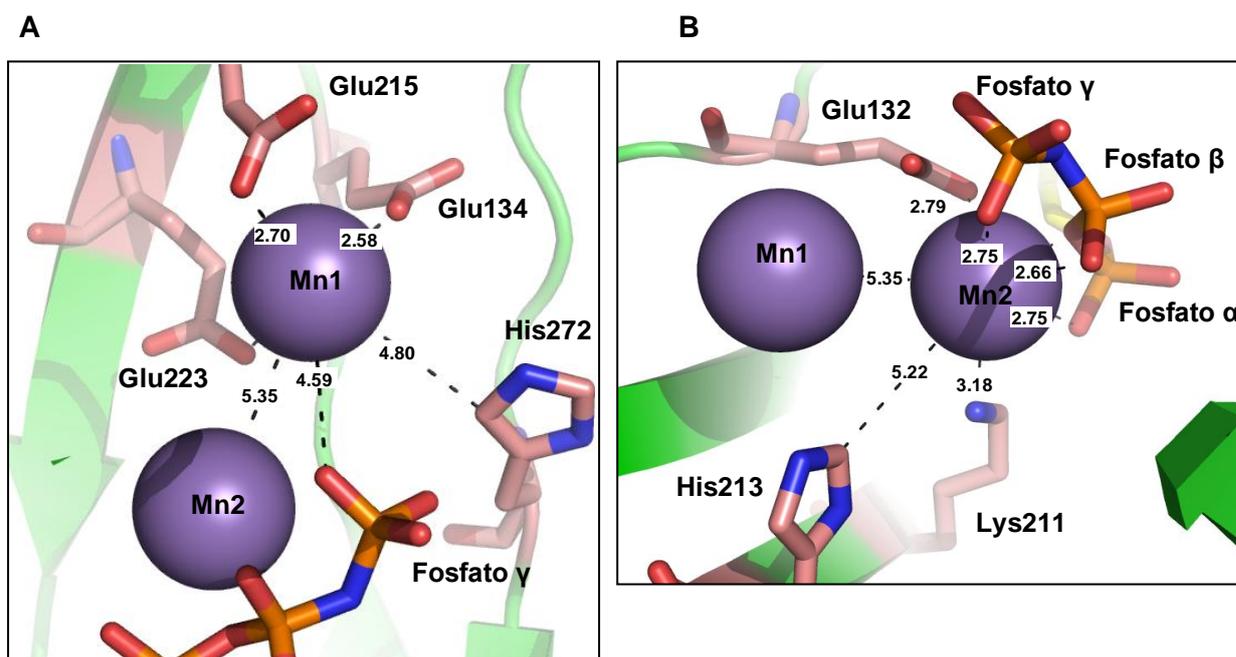


Figura 60. Análisis de los iones Mn^{2+} en el sitio activo de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se muestran las conexiones observadas entre los residuos del sitio activo y los iones Mn1 (A) en el sitio n2, y Mn2 (B) en el sitio n1. Los residuos están esquematizados en bastones, los carbonos están coloreados en rosa. Los nitrógenos están coloreados en azul, los fósforos en naranja y los oxígenos en rojo. Las distancias están calculadas en Å.

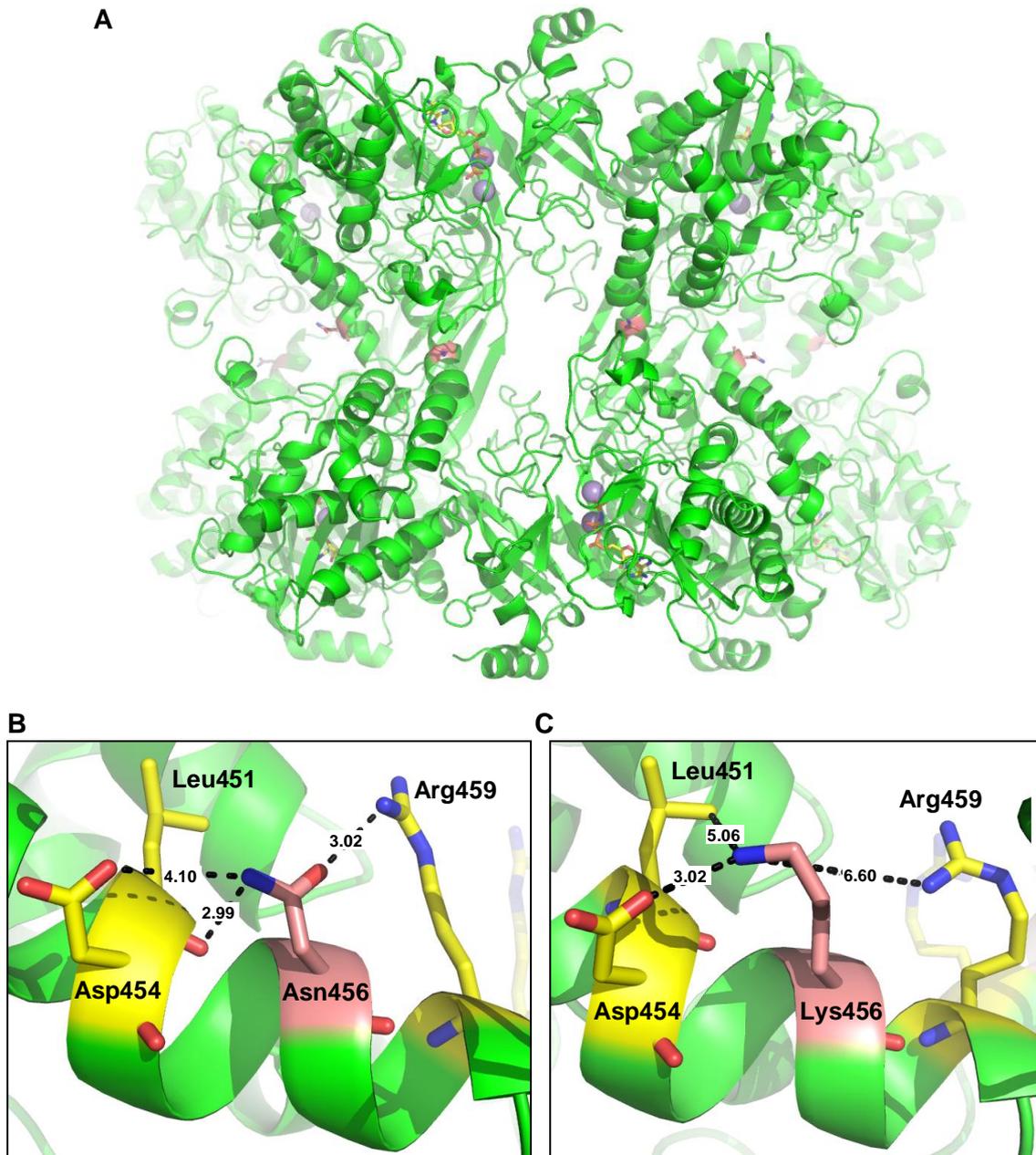


Figura 61. Análisis comparativo del residuo localizado en la posición 456 de la GSI silvestre y de la proteína mutante GS-N456K de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se muestra la proteína GSI silvestre con el residuo N456 representado como bastones (A). Se representan también las conexiones observadas entre el residuo N456 de la proteína silvestre (B) y K456 de la proteína mutante GS-N456K (C) y los aminoácidos vecinos. Los residuos están esquematizados en bastones, en los que los nitrógenos y oxígenos están coloreados en azul y rojo, respectivamente. Los carbonos de N456 y K456 están coloreados en rosa. En los residuos adyacentes a éstos, los carbonos están coloreados en amarillo. Las distancias están calculadas en Å. Se han utilizado los modelos estructurales, obtenidos en este trabajo, de la proteína GSI (A y B) en presencia de AMP-PNP y Mn^{2+} , y resuelto a 2.8 Å; y de la proteína GS-N456K (C), resuelto a 3.0 Å.

La proteína mutante GS-N456K fue incluida en nuestro análisis cristalográfico con el propósito de poder comparar el entorno estructural del residuo Asn456, crítico para la inactivación de la GSI por los IFs. Al analizar el residuo Asn456 en el modelo estructural de la proteína silvestre observamos que interacciona con los residuos Arg459, Leu451 y Asp454, presentando unas distancias de 3.0 Å, 3.0 Å y 4.1 Å, respectivamente (Figura 61A). En cambio, el residuo K456 de la proteína mutante GS-N456K presenta unas distancias de 6.6 Å, 5.0 Å y 3.0 Å, respectivamente (Figura 61B). La mayor longitud de la cadena lateral de la lisina así como el cambio de carga puede haber sido responsable de un cambio en la orientación del residuo, acercándose al Asp454 y alejándose de la Arg459 y la Leu451.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LOS FACTORES INACTIVANTES

La regulación postraducciona de la glutamina sintetasa de cianobacterias difiere de las ampliamente estudiadas adenilación y regulación por retroalimentación por producto, observadas en otras bacterias (Leigh y Dodsworth, 2007; Reitzer, 2003). En *Synechocystis* se ha descrito un mecanismo de inhibición que implica la interacción proteína-proteína entre la GSI y los factores inactivantes IF7 e IF17, que depende de las condiciones nitrogenadas del medio (García-Domínguez *et al.*, 1999). En este trabajo se ha caracterizado la interacción entre la glutamina sintetasa de tipo I y los factores inactivantes de *Synechocystis*. Para ello, se ha realizado el análisis mutacional de los tres componentes del sistema de regulación (la GSI y los factores IF7 e IF17), así como el estudio estructural de la GSI silvestre y de una versión mutante de la enzima que está afectada en la regulación por inactivación.

Analizando el alineamiento de las secuencias de las proteínas homólogas a los IFs (Figura 17, Resultados, apartado 1), podemos observar que el extremo carboxilo terminal del factor inactivante IF17 es homólogo a IF7 y que ambas proteínas presentan una carga neta positiva, lo que se traduce en un alto punto isoeléctrico. Puesto que ambas proteínas realizan la misma función, el dominio carboxilo terminal de IF17, rico en residuos de carga positiva, debe participar en la interacción con la GSI. El análisis mutacional *in vitro* de este dominio ha permitido identificar tres residuos de arginina (R90, R103 y R110) críticos para su funcionalidad, que intervienen en la interacción con la GSI y en la inactivación. En este estudio se han realizado dos tipos de sustituciones de los residuos conservados, bien por un aminoácido hidrofóbico no polar (alanina) o bien por un residuo polar con carga negativa (glutamato). Puesto que la arginina es un residuo básico que se caracteriza por presentar una cadena lateral con carga positiva y que la inactivación de la GS está controlada por fuerzas electrostáticas, el efecto observado al sustituirlo por una alanina es menor que al hacerlo por un glutamato, residuo de carga negativa (Figura 18, Resultados, apartado 1.1).

En este trabajo se ha caracterizado *in vitro* tanto la funcionalidad de las versiones mutantes del extremo carboxilo terminal de IF17 como su capacidad de interacción, mediante ensayos de inactivación de la GSI y ensayos de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes, respectivamente. Los resultados indican que la

pérdida de la capacidad inactivante de la GSI de las proteínas mutantes en las argininas 90, 103 y 110 es consecuencia de la incapacidad de éstas de interactuar con su proteína diana (Figuras 18 y 19, Resultados, apartado 1.1). Sin embargo, se observa cierto grado de inactivación *in vitro* de la GSI por los mutantes IF17-R90E, IF17-R103E e IF17-R110E a una concentración que no provoca un retraso en la migración electroforética de la GSI en el ensayo de retardo en gel en condiciones no desnaturizantes. Estas diferencias pueden deberse a que la estabilidad del complejo formado por la GSI y las versiones mutantes mencionadas no permite que se observe un retraso en la migración electroforética en los ensayos de retardo en gel, pero es suficiente para causar una inactivación parcial de la enzima.

Con objeto de comprobar si la sustitución de las argininas críticas por un residuo de su misma carga provocaba algún efecto en su función, se obtuvo una versión mutante de IF17 en el que la arginina 103 se sustituyó por una lisina. Esta proteína mutante presentó, *in vitro*, una capacidad de interacción e inactivación de la GSI similar a la observada en la proteína IF17 silvestre (Figura 18 y 19, Resultados, apartado 1.1).

Tras la caracterización *in vitro* del extremo carboxilo terminal del factor inactivante IF17, y teniendo en cuenta el análisis mutacional previo realizado en nuestro laboratorio (Galmozzi, 2008) procedimos a completar el estudio de IF7 mediante mutagénesis dirigida. La sustitución de alguna de las argininas 8, 21 y 28 (homólogas a 90, 103 y 110 en IF17) por un glutamato provocó la pérdida completa de la capacidad de IF7 de inactivar a la GSI así como de interactuar con ésta (Figura 20 y 19, Resultados, apartado 1.1). El efecto de estas sustituciones es más drástico que el observado al sustituir los residuos homólogos de IF17, lo que puede ser debido a la mayor inestabilidad de IF7 (Galmozzi *et al.*, 2007).

Para estudiar *in vivo* el efecto de estas sustituciones en *Synechocystis*, se obtuvieron diferentes estirpes portadoras de algunas de las versiones mutantes analizadas *in vitro*. Al analizar las estirpes mutantes de IF17 se observó que la pérdida de inactivación observada es más drástica *in vivo* con respecto a los estudios equivalentes *in vitro* (Figuras 18 y 24, Resultados, apartado 1.1). Esta observación puede ser debida a la ausencia, en los ensayos *in vitro*, de un sistema proteolítico que degrade a IF17. En cambio, en los ensayos *in vivo*, los factores inactivantes mutantes con baja o nula afinidad por la GSI son susceptibles de proteólisis, no acumulándose en cantidad suficiente para inactivar la GSI.

El análisis de las estirpes de *Synechocystis* portadoras de versiones mutantes de IF7 permitió comprobar que las argininas 8, 21 y 28 son también indispensables para la funcionalidad *in vivo* de dicho factor inactivante. Al igual que se observó en trabajos anteriores (Galmozzi, 2008), la mutación K19E provoca una pérdida total de función del factor inactivante IF7, *in vivo*.

Se ha descrito previamente que la presencia de GSI *in vivo* es crucial para la estabilidad de los factores inactivantes (Galmozzi *et al.*, 2007). Por tanto, la presencia de IF7 ó IF17 en extractos crudos obtenidos de células tratadas con amonio, es indicio de la capacidad de cada versión de IF7 o IF17 de interactuar con la GSI. Aquellas versiones mutantes incapaces de interactuar con la GSI serán rápidamente degradadas y, por tanto, no detectadas mediante Western blot. Teniendo en consideración este hecho, se analizaron mediante Western blot las estirpes portadoras de las versiones mutantes de IF7 e IF17 obtenidas (Figuras 25 y 29, Resultados, apartado 1.1). De esta forma, podemos observar una correlación positiva entre la capacidad inactivante de las diferentes versiones mutantes, con la acumulación de éstas en el Western blot, concluyendo así que la incapacidad de interacción del factor es la causa de su pérdida de función.

En estudios previos se ha descrito que IF7 es más inestable *in vitro* que IF17, siendo imposible reproducir la degradación proteolítica de este último en ensayos de inactivación *in vitro* (Galmozzi *et al.*, 2007). Por otro lado, puesto que la región carboxilo terminal de IF17 es homóloga a la proteína completa IF7, se consideró que el extremo amino terminal debe ser el responsable de las diferencias de estabilidad observadas. Para comprobar esta hipótesis, se generó una proteína quimérica formada por la región amino terminal de IF17 junto a la proteína completa IF7 y se analizó su estabilidad y funcionalidad. Esta proteína quimérica presentó una mayor estabilidad que IF7, similar a la observada en el análisis de IF17 (Galmozzi, 2008). Al comparar las secuencias de las proteínas homólogas a IF17 (Figura 17, Resultados, apartado 1), destacan tres repeticiones conservadas de la secuencia YRG en la región amino terminal. Con objeto de determinar si dichas repeticiones contribuyen a la estabilidad de IF17, se ha desarrollado en este trabajo un estudio mutacional en el cual se han sustituido dichas secuencias YRG por tres alaninas (AAA). Las versiones mutantes obtenidas no parecen estar afectadas en su funcionalidad, son equivalentes al silvestre tanto en su capacidad de interacción como de inactivación de su proteína diana, la GSI (Figuras 30 y 31B, Resultados, apartado 1.2). Utilizando extractos crudos celulares de la estirpe SLIF, carente de factores inactivantes, a diferentes pHs, hemos observado que la versión mutante IF17-ABC, que presenta la sustitución de las tres

repeticiones YRG por AAA, muestra una acumulación similar a la proteína silvestre en ensayos de Western blot. Esto indica que las repeticiones YRG del extremo amino terminal no afectan a la estabilidad de IF17 *in vitro*.

Puesto que el punto isoeléctrico estimado para IF17 es de 10.89, esta proteína no migra en un gel de electroforesis en condiciones no desnaturizantes a pH 8.9, en su forma libre. Sin embargo, asociada a la GSI es detectable en este tipo de geles (Galmozzi, 2008). Con objeto de estudiar el efecto de las mutaciones en las repeticiones YRG de IF17 en su afinidad por la GSI, se analizaron las muestras de extracto crudo de la estirpe SLIF en presencia de las proteínas silvestre y mutante ABC-IF17 mediante electroforesis en condiciones no desnaturizantes. Este análisis muestra una menor interacción de IF17-ABC con la GSI a partir de las 3 horas tras la adición de proteína pura a pH 8.5. Sin embargo, la interacción de la proteína silvestre con la GSI parece constante en dichas condiciones (Figura 31D, Resultados, apartado 1.2). Las diferencias en cuanto a interacción que muestran las diferentes versiones de IF17 concuerdan con la reactivación diferencial observada en el extracto crudo de SLIF tras la adición de proteína pura (Figura 31A, Resultados, apartado 1.2). Esto sugiere que la proteína mutante IF17-ABC presenta una menor afinidad por la GSI a pH 8.5 que la mostrada por la proteína silvestre IF17 *in vitro*.

Se ha descrito que IF7 es una proteína intrínsecamente desplegada en su estado nativo (Muro-Pastor *et al.*, 2003). Este hecho podría explicar la elevada susceptibilidad a la degradación de IF7 en los experimentos *in vitro* e *in vivo* detallados en Galmozzi *et al.*, 2007. La diferencia de estabilidad observada en ambos IFs sugiere que IF7 no comparte su naturaleza desplegada con IF17, el cual puede presentar un plegamiento que dificulte o impida su degradación. Con objeto de determinar si la región amino terminal de IF17 puede potencialmente presentar plegamiento, se utilizó el programa PONDR® que predice las regiones naturalmente desordenadas (Galmozzi, 2008). Según este estudio, la región comprendida entre los residuos 90 y 135 podría presentar ausencia de plegamiento, mientras que se predice que los primeros 90 aminoácidos, correspondientes al dominio amino terminal, presentaría conformación nativa plegada. Es posible, por tanto, que el plegamiento del extremo amino terminal prevenga de la degradación a IF17, en un mecanismo independiente de las repeticiones YRG previamente estudiadas.

Sabiendo que la presencia de la GSI es crucial para la estabilidad de los IFs, se consideró la posibilidad de que la ausencia *in vivo* de uno de los factores inactivantes afecte a la estabilidad del IF restante. Es por eso que se analizaron las

estirpes SIF y LIF, carentes de IF7 e IF17, respectivamente. Para ello, se realizaron ensayos de inactivación de la GS *in vivo*, por adición de glutamina e incubación en oscuridad, así como ensayos de reactivación de la GS, reiluminando los cultivos tras 1 ó 6 horas en oscuridad. Al incubar el cultivo en oscuridad, se inhibe el proceso fotosintético de forma que no se produce 2-oxoglutarato. Por otro lado, el 2-oxoglutarato presente en el interior celular se consume por acción de la enzima GOGAT en presencia de glutamina. Estos procesos conllevan la disminución de la concentración de 2-oxoglutarato, que será menor cuanto más tiempo se incuba el cultivo en oscuridad. Así, se preve que la recuperación de los niveles de 2-oxoglutarato tras la iluminación del cultivo sea más rápida cuanto más corto sea el periodo de oscuridad. Teniendo en cuenta esto, se analizaron las estirpes SIF y LIF junto con el control silvestre en estas condiciones, mediante ensayos de actividad GS (Figura 32 y 33, Resultados, apartado 1.3), análisis de expresión por Northern blot (Figura 34, Resultados, apartado 1.3) y análisis de acumulación de IF7 e IF17 por Western blot (Figura 35, Resultados, apartado 1.3).

En primer lugar, las diferentes estirpes estudiadas mostraron una expresión de los genes *gif* similar en las condiciones analizadas. Tras un periodo de 1 hora de oscuridad, la expresión de los genes *gif* aumenta, mientras que el aumento es mayor tras 6 horas en oscuridad. Esto puede ser debido a la baja o mínima concentración de 2-oxoglutarato intracelular, que provoca la desrepresión de los genes *gif* por NtcA (Muro-Pastor *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 1997; García-Domínguez *et al.*, 2000). Los ensayos de actividad GS revelan que la ausencia de cualquiera de los factores inactivantes tiene como consecuencia una menor inactivación de la GS. Esto indica que ambos factores contribuyen a la inactivación de la GS *in vivo*, siendo máxima en presencia de los dos factores inactivantes. Esta observación coincide con los datos descritos en García-Domínguez *et al.*, 1999.

Por otro lado, la reactivación de la GS tras un periodo de oscuridad de 6 horas es más rápida en los mutantes SIF y LIF que en la estirpe silvestre. Esta observación puede explicarse para el mutante SIF tras observar los ensayos de Western blot (Figura 35, Resultados, apartado 1.3). La cantidad de IF7 en la estirpe mutante LIF decrece más rápidamente tras iluminar el cultivo que en la estirpe silvestre. La degradación drástica de IF7 provoca una reactivación rápida de la GSI (Figura 33). Además, estos resultados indican que la presencia de IF17 aumenta la estabilidad de IF7, puesto que la acumulación de esta proteína es más duradera en la estirpe silvestre. En el caso del mutante SIF, la GS debe encontrarse separada de IF17 puesto que recupera la actividad tras las 6 horas de oscuridad (Figura 33,

Resultados, apartado 1.3). La acumulación de IF17 mientras está separado de la GS implica que IF17 debe ser estable en las condiciones analizadas (Figura 35, Resultados, apartado 1.3).

Por último, la estirpe mutante LIF presentó una mayor acumulación de IF7 tras 8 horas de oscuridad que la estirpe silvestre, hecho observado en repeticiones independientes del experimento. Estos datos indican que la ausencia de IF17 permite una mayor acumulación de IF7, posiblemente por el aumento de sitios de interacción disponibles en su proteína diana (la GSI), contribuyendo así a la estabilización de IF7.

2. ANÁLISIS MUTACIONAL DE LA GLUTAMINA SINTETASA

Una vez demostrada la intervención de 3 residuos básicos presentes en los IFs en la formación del complejo con la GSI y su inactivación, nos propusimos localizar la región de la GSI que interacciona con dichos residuos. Para ello, se analizaron las proteínas quiméricas formadas por la fusión entre la GSI de *Synechocystis* y la GS de *Anabaena variabilis* ATCC 29413. La cianobacteria filamentosa *A. variabilis* presenta el mismo sistema de inactivación de la GS que la descrita en *Anabaena* sp. PCC 7120, donde opera un único factor inactivante, denominado IF7A. Al analizar la inactivación interespecífica de las GSs utilizando los IFs de ambos organismos, se observa que los factores inactivantes de *Synechocystis* no son capaces de inactivar a la GS de *Anabaena*. Sin embargo, el factor IF7A inactiva a la GS de *Synechocystis* de forma más eficiente que a la GS de *Anabaena* (Galmozzi *et al.*, 2010; Figura 36, Resultados, apartado 2.1).

Mediante el análisis de las proteínas quiméricas formadas por el extremo amino terminal de la GSI de *Synechocystis* y la región carboxilo terminal de la GS de *A. variabilis*, hemos identificado una región involucrada en la interacción con los IFs y en la inactivación enzimática (Figura 38, Resultados, apartado 2.1). Esta región consiste en los últimos 50 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de la enzima. Estudios estructurales de la GS de bacterias (ver como ejemplo Liaw *et al.*, 1994; Eisenberg *et al.*, 2000) así como el estudio cristalográfico realizado en este trabajo, muestran que el dominio carboxilo terminal de la glutamina sintetasa interviene en la contención inter-subunidad de los dos anillos hexaméricos. Al comparar las secuencias de las GSs de los dos organismos estudiados, se han identificado varios residuos localizados en esta región que pueden participar en las hipótesis de atracción o repulsión de los IFs, previamente detalladas (Figura 39, Resultados, apartado 2.1), que explicarían la especificidad observada en la regulación de la GS de *Synechocystis* y *A. variabilis*. Estos aminoácidos fueron sustituidos en la GSI de *Synechocystis* por los aminoácidos homólogos localizados en la GS de *A. variabilis*.

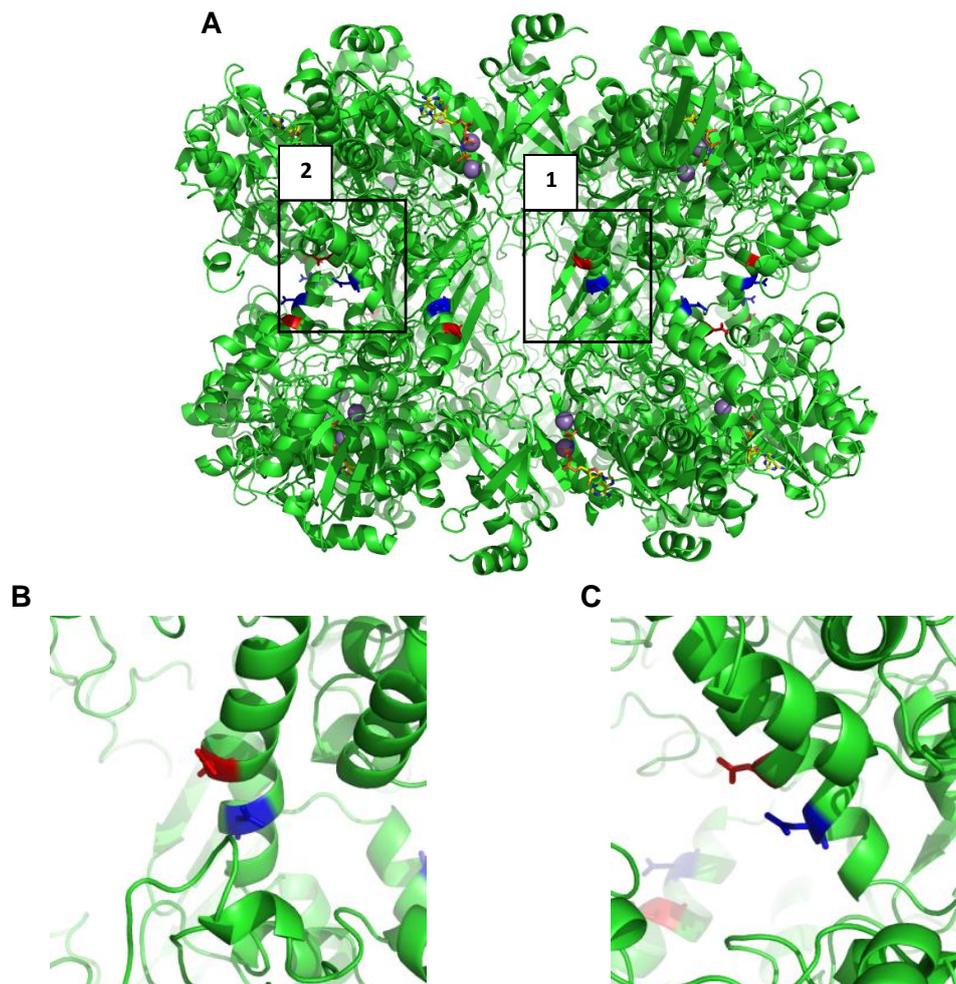


Figura 62. Residuos D452 y N456 de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* a una resolución de 2.8 Å.

Vista lateral de la enzima (A) y vista ampliada de los residuos D452 (rojo) y N456 (en azul) (B y C). Las imágenes B y C corresponden a las ampliaciones de los recuadros 1 y 2, respectivamente, representados en el apartado A de esta misma figura. La enzima fue cocrystalizada con AMP-PNP, representado como bastones, y Mn^{2+} , esferas violetas.

El análisis de las diferentes versiones mutantes mostró que la sustitución N456K provoca en la GSI de *Synechocystis* la pérdida completa de inhibición por los factores inactivantes IF7 e IF17, y la disminución parcial de inactivación por IF7A (Figura 40, Resultados, apartado 2.1). En cuanto a la formación del complejo *in vitro*, analizada en geles en condiciones no desnaturizantes, la GS-N456K es incapaz de interactuar con IF7, y sin embargo, muestra interacción con IF17 e IF7A (Figura 42, Resultados, apartado 2.1). Esto implica que el complejo formado por la proteína

mutante GS-N456K y el factor inactivante IF17 es un complejo activo. Por tanto, se propone que IF17 se une a la enzima por al menos dos regiones distintas, y sólo una de ellas estaría involucrada en el proceso de inactivación. Por tanto, el residuo de lisina, con carga positiva presente en la posición 457 de la GS de *Anabaena*, provoca la repulsión de los IFs de *Synechocystis*, imposibilitando la funcionalidad de éstos. Otra de las versiones mutantes analizadas, la GS-D452A, presenta una pérdida de inactivación e interacción con IF17. En este caso, el aspartato 452 es un residuo de carga negativa que atrae de forma diferencial a IF17 de *Synechocystis* y que no está presente en la GS de *Anabaena*. Tras observar la estructura de la GS de *Synechocystis*, podemos apreciar que estos aminoácidos presentan sus cadenas laterales expuestas a la parte exterior de la enzima y se localizan en la región comprendida entre los dos anillos hexaméricos, lugar accesible para los factores inactivantes (Figura 62).

Por otro lado, al comparar la localización, orientación y el entorno bioquímico de los residuos N456 y K456 en los modelos estructurales resueltos en este trabajo observamos que aunque la localización y orientación se mantienen en ambas proteínas, las distancias observadas entre estos residuos y los adyacentes difieren en ambas estructuras (Figura 61, Resultados, apartado 3.5). Estas interacciones diferenciales pueden ser responsables de una modificación de la carga superficial de la zona en la proteína mutante GS-N456K con respecto a la proteína silvestre. Este cambio de carga puede provocar una disminución de la afinidad de la enzima por los factores inactivantes, que interaccionan con la GSI por dicha región. Esto hace de la asparragina 456 un residuo crítico para la inactivación de la GSI de *Synechocystis*.

Para determinar el efecto que supone la presencia de una asparragina en lugar de una lisina en la posición 457 de la GS de *A. variabilis* (posición homóloga al N456 de la GSI de *Synechocystis*), se analizó la proteína mutante GSvar-K457N. Esta proteína se inactivó parcialmente por IF7 y mostraba capacidad de interaccionar con éste, mientras que careció de capacidad de interaccionar con IF17 y de ser inactivada por él (Figura 44, Resultados, apartado 2.1). Es posible que la presencia del aspartato en la posición 453 (homóloga al D452 de la GSI de *Synechocystis*) sea necesaria para la atracción del IF17 y su funcionalidad. En su lugar, la GS de *A. variabilis* presenta una alanina en la posición 453. Sería necesaria la obtención de la proteína GS de *A. variabilis* portadora de la doble mutación K457N y A453D para verificar esta hipótesis.

En conclusión, el efecto conjunto de la presencia de la asparragina 456 y el aspartato 452 en la GSI de *Synechocystis* y la carencia de éstos en la GS de

Anabaena pueden explicar la dicotomía del sistema de inactivación de ambos organismos. No obstante, esta observación no descarta la existencia de otros aminoácidos involucrados en la especificidad por los IFs. En estudios futuros, se abordará el análisis *in vivo* de una o varias de estas versiones mutantes de la GSI, que porten cada una de las sustituciones (N456K y D452E) o ambas.

Las hipótesis de atracción y repulsión que explican la especificidad por los factores inactivantes de las GSs de *Synechocystis* y *A. variabilis* vienen dadas por residuos diferenciales tanto en las secuencias de las GSs como en la de los factores inactivantes. Hasta ahora, hemos comprobado que los residuos D452 y N456 de la GS de *Synechocystis* así como los residuos A453 y K457 de la GS de *A. variabilis* intervienen en esta dicotomía. Sin embargo, no se han analizado los residuos diferenciales entre IF7A y los factores inactivantes de *Synechocystis*. IF7 e IF17 deben contener uno o varios residuos de carga positiva que sean repelidos por la lisina 457 presente en la GS de *A. variabilis*, y/o que sean atraídos por el aspartato 452 presente en la GS de *Synechocystis*, y que no aparezcan en la secuencia de IF7A. Observando el alineamiento entre las proteínas homólogas a IF7 e IF17 de *Synechocystis*, encontramos varios aminoácidos que podrían cumplir dichas condiciones (Figura 17, Resultados, apartado 1). Los residuos KT en la posición 46-47 de IF17 así como los residuos HH en la posición 14-15 de IF7 están ausentes en IF7A, en cuya posición homóloga encontramos los aminoácidos QY. La lisina (K) y la histidina (H) son aminoácidos polares de carga positiva, mientras que la glutamina (Q) y la tirosina (Y) son aminoácidos polares o ligeramente polares, sin carga. Estos residuos además, se encuentran en posición intermedia entre dos argininas involucradas en la interacción e inactivación de la GS (las argininas 8 y 21 de IF7, y las argininas 90 y 103 de IF17). Es posible por tanto que estos residuos diferenciales participen en la especificidad aquí estudiada. Estos residuos serán objeto de análisis en el futuro, con el propósito de identificar los aminoácidos presentes en los IFs, responsables de la especificidad de la interacción GS/IF entre distintas cianobacterias.

El estudio de proteínas quiméricas así como de mutantes puntuales de la región carboxilo terminal de la GSI nos ha permitido localizar un lugar de interacción de esta enzima con los IFs. En estudios previos se ha descrito que la interacción entre la GSI de *Synechocystis* y sus factores inactivantes es de naturaleza electrostática, puesto que basta con el cambio de pH o el aumento de fuerza iónica para la reactivación de la GS *in vivo* (Mérida *et al.*, 1991b) e *in vitro* (Galmozzi *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que los factores inactivantes presentan 3 aminoácidos básicos que son críticos para su funcionalidad, predecimos que en la GSI, uno o varios

residuos con carga negativa participan en la interacción con los IFs. Con objeto de identificar los residuos conservados de carga negativa que participan en el proceso de inactivación de la GSI, hemos comparado las secuencias de las GSs presentes en aquellas cianobacterias que contengan algún ORF homólogo a los genes *gif* de *Synechocystis* (Figura 45, Resultados, apartado 2.2). Posteriormente, se han obtenido mutantes puntuales de la GSI de *Synechocystis* con cambios en todos los residuos ácidos conservados presentes en el extremo carboxilo terminal. De ellos, sólo la versión mutante que presenta la sustitución E448A muestra una inactivación diferente con respecto a la proteína silvestre. Esta proteína mutante ha perdido parcialmente la capacidad de inactivarse por los IFs (Figura 46, Resultados, apartado 2.2). Además, no presenta interacción con IF7 y está afectada en la interacción con IF17 (Figura 47, Resultados, apartado 2.2). Puesto que en los sistemas *in vitro* no está presente la maquinaria proteolítica que afecta a la acumulación de los IFs *in vivo*, es esperable que la mutación E448A en la GS implique una menor inactivación *in vivo* que la observada *in vitro*. Para comprobar esta hipótesis, en estudios futuros analizaremos el efecto *in vivo* de la mutación E448 en la GS de *Synechocystis*.

El residuo de glutamato 448 se caracteriza por presentar una cadena lateral que se encuentra cargada negativamente a pH fisiológico y se localiza en la región comprendida entre los dos anillos hexaméricos (Figura 63). A diferencia de lo que ocurre con los residuos D452 y N456 que se localizan en la zona central de la intersección entre los anillos de la enzima, este residuo E448 se encuentra próximo a la zona de entrada del glutamato en el sitio activo (Figura 63). Este residuo además, está conservado en todas aquellas cianobacterias que presentan proteínas homólogas a los IFs de *Synechocystis* (Figura 45, Resultados, apartado 2.2), con excepción de *Thermosynechococcus elongatus*. Puesto que esta cianobacteria presenta dos factores inactivantes de tipo IF17, y el residuo E448 afecta mayoritariamente a la interacción e inactivación *in vitro* de la GSI mediante la unión con IF7, la presencia de una glutamina en lugar del glutamato 448 presente en la GS de *Synechocystis* puede estar suplida con algún otro residuo que participe en la interacción con su proteína homóloga de IF17. De esta forma, la carencia de este glutamato no interferiría en el proceso de inactivación de la enzima en este organismo.

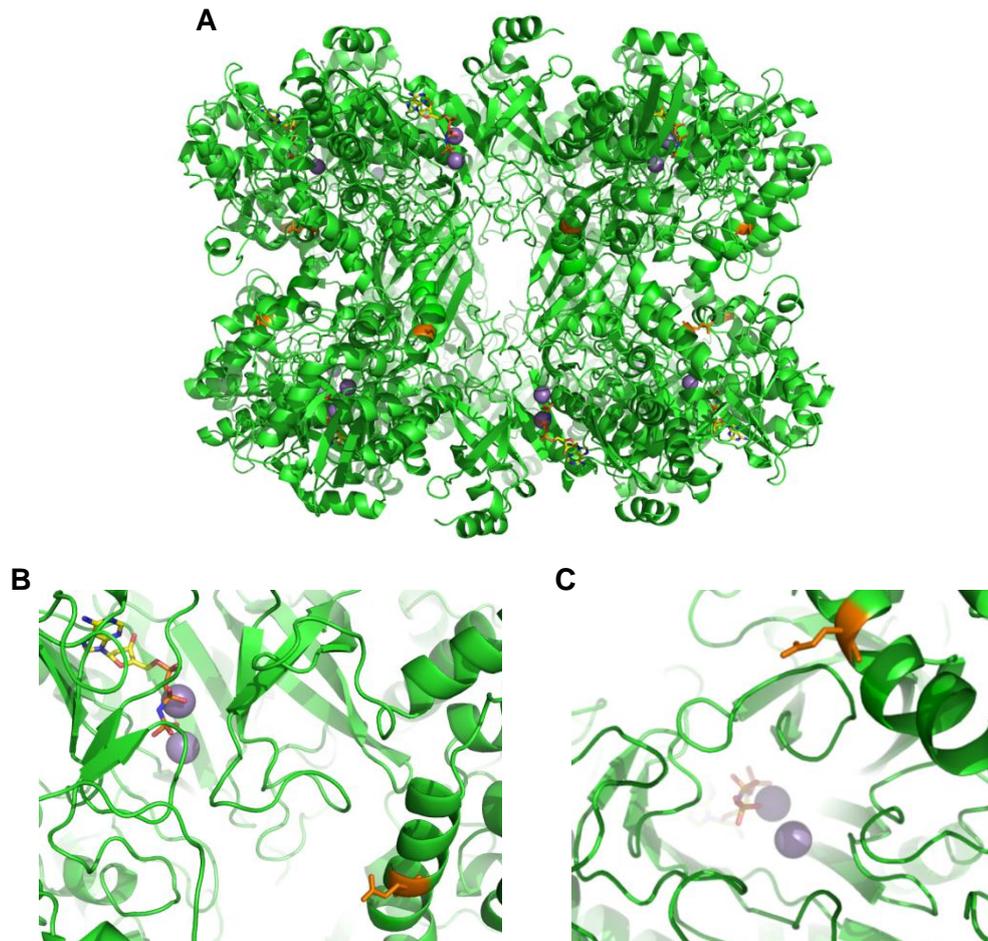


Figura 63. Residuo E448 de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* a una resolución de 2.8 Å.

Vista lateral de la enzima (A) y vista ampliada del residuo E448 (naranja) (B y C). Las imágenes B y C corresponden a la ampliación del residuo E448, siendo la figura B la vista lateral del residuo y la figura C, la vista inferior del centro activo donde se observa la posición del residuo E448. En la figura C se observa el túnel formado por hojas beta que caracterizan al sitio activo. La enzima fue cocrystalizada con AMP-PNP, representado como bastones, y Mn^{2+} , esferas violetas.

Al analizar la posición relativa del glutamato 448 y los residuos que intervienen en la coordinación del sustrato glutamato en el sitio activo, observamos que E448 se encuentra a aproximadamente 24 Å de la mayoría de ellos. Según Eisenberg *et al.* (2000), el glutamato localizado en la posición 327 de la GS de *Salmonella typhimurium* actúa como una compuerta del sitio activo, protegiendo al sustrato glutamato de una posible hidrólisis. El residuo homólogo a éste en la GSI de *Synechocystis* es el glutamato 330 (Tabla 2, Introducción 3.1). En el modelo estructural de la GSI de *Synechocystis* resuelto en este trabajo, el E330 se encuentra en estado relajado, lo que permitiría la entrada del sustrato en el sitio activo. En esta conformación, el

glutamato 448, implicado en la inactivación de la GS cianobacteriana por los IFs, se encuentra a 23.7 Å del residuo E330 (Figura 64A). Sin embargo, simulando el cierre del sitio activo mediante el posicionamiento de la cadena lateral del residuo E330 sobre la entrada del mismo, la distancia entre ambos disminuye hasta los 19.9 Å (Figura 64B). Esta distancia sería suficiente para el posicionamiento de los IFs en la región comprendida entre el residuo Glu448 y el Glu330. Por tanto, se podría especular que la función de los factores inactivantes se basa en el impedimento de la entrada del sustrato en el sitio activo. Sin embargo, estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio demuestran que el análogo del glutamato e inhibidor de la GSI, la metionina sulfoximina (MSX), es fosforilado en el sitio activo en presencia de ambos factores inactivantes (datos no mostrados). Puesto que los factores inactivantes no impiden la entrada del sustrato glutamato en el centro activo, su función puede basarse en contener el producto en el interior del sitio activo, imposibilitar la actividad transferasa de la enzima, o desestabilizar la coordinación del ión amonio. Analicemos estas posibilidades.

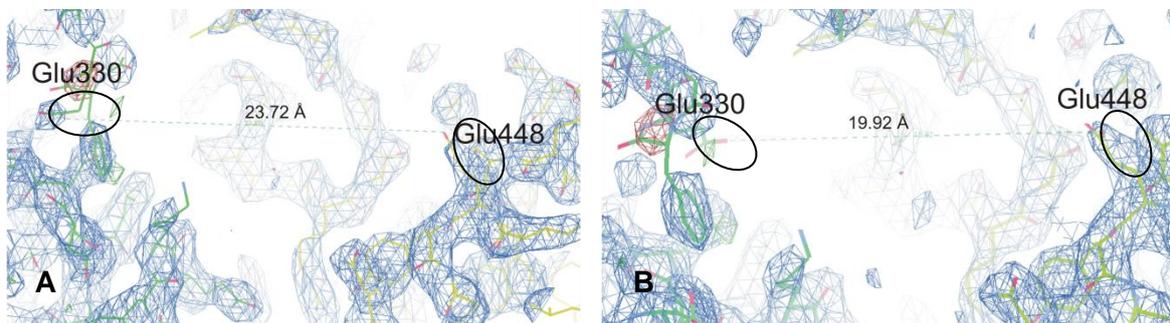


Figura 64. Posición relativa del glutamato 448 y el glutamato 330 en la GSI de *Synechocystis sp. PCC 6803* cuando el sitio activo se encuentra abierto para el sustrato (A) o cerrado (B).

El glutamato 330 del sitio activo de la GSI de *Synechocystis* actúa como una compuerta que permite la entrada del sustrato glutamato cuando está abierta, y protege al sustrato de hidrólisis durante la reacción enzimática cuando está cerrada. El modelo estructural de la GSI obtenido aquí presenta el residuo Glu448 en su posición de apertura del sitio activo. En esta figura se compara esta situación con una hipotética, en la que el residuo E448 cierra el sitio activo. Esta simulación se llevó a cabo usando el programa Coot que permite la rotación de cadenas laterales.

Los modelos estructurales de proteínas de masas moleculares similares a IF7 e IF17 indican que el tamaño aproximado de vértice a vértice varía entre 30 y 40 Å (ver por ejemplo 3ITP.pdb; 3M97.pdb y 2KMU.pdb). El tamaño puede variar en función

de la estructura cuaternaria de la proteína. Puesto que la distancia calculada entre los residuos Glu448 y Glu330 (en posición de cierre del sitio activo) es de 19.9 Å (Figura 64B), es posible que el tamaño de los factores inactivantes sea el suficiente como para interactuar con el aminoácido Glu330 y, mediante atracción electrostática, forzar el cierre del sitio activo.

Por otro lado, modificaciones de la estructura cuaternaria de la GSI podrían provocar cambios en las posiciones relativas de los residuos del sitio activo, que intervienen en la reacción enzimática. La unión de la GSI con los IFs podría promover estas modificaciones.

Durante la reacción enzimática, el ión amonio entra en el sitio activo y se une a un bolsillo cargado negativamente formado por Asp50, Tyr179, Glu212 y Ser53 en la GS de *Salmonella* (Liaw *et al.*, 1995). Los residuos homólogos a éstos en la GSI de *Synechocystis* son Asp53, Tyr182, Glu215 y Ser56 (Tabla 2, Introducción 3.1); y se encuentran a una distancia del glutamato 448 de 17.6 Å, 21.6 Å, 24.3 Å y 15.1 Å, respectivamente (Figura 65). Puesto que la distancia entre el Glu448 y los residuos Asp53 y Ser56 es escasa (17.7 Å y 15.1 Å, respectivamente), y que IF7 presenta una carga neta positiva, es posible que la presencia del factor inactivante en la región colindante a dichos residuos modifique la carga del bolsillo (Figura 65E), impidiendo el emplazamiento del ión amonio en él.

Cualquiera de las tres posibilidades discutidas podría explicar el mecanismo de inactivación de los factores inactivantes. Para la comprensión del motivo subyacente a la disminución de la inactivación por los IFs de la proteína mutante GS-E448A, en un futuro se analizará *in vivo* el efecto de la sustitución del glutamato 448 de la GS de *Synechocystis*. Se comprobará así el efecto *in vivo* de la pérdida de inactivación e interacción observada *in vitro*.

El análisis mutagénico que se ha llevado a cabo en este trabajo nos ha proporcionado información acerca de cómo interacciona la glutamina sintetasa de *Synechocystis* con los factores inactivantes. Sin embargo, aún quedan muchos interrogantes que deben ser resueltos. Para ello, nuestro laboratorio está trabajando actualmente en la resolución de la estructura del complejo GS/IFs.

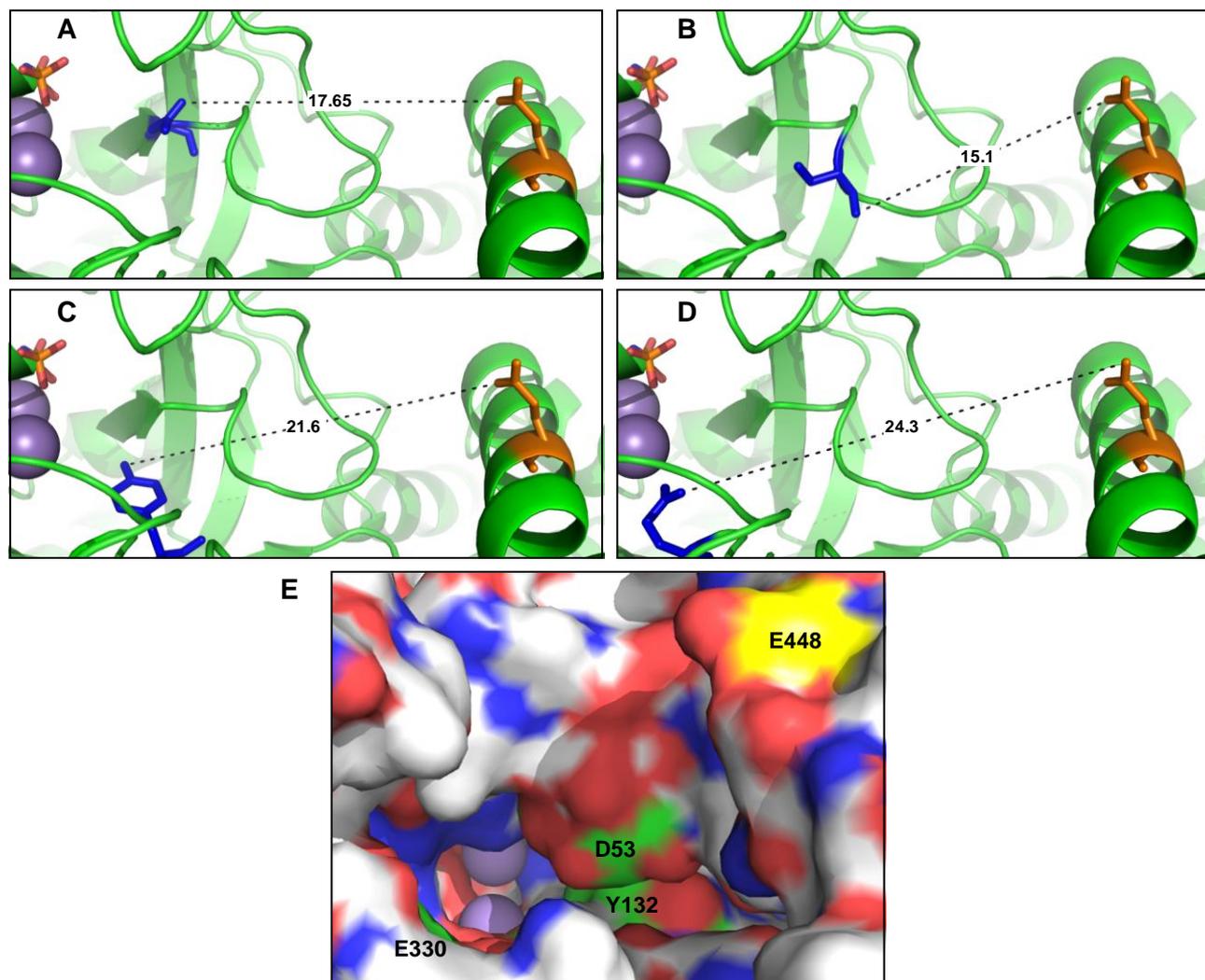


Figura 65. Posición relativa del glutamato 448 y los residuos Asp53 (A), Ser56 (B), Tyr182 (C), Glu215 (D) y del sitio activo (E) en la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Los residuos de la GSI de *Salmonella typhimurium*, homólogos a éstos, están involucrados en la coordinación del ión amonio mediante la formación de un bolsillo de carga negativa (Eisenberg *et al.*, 2000). En la representación en superficie del sitio activo, están coloreadas en azul las cargas superficiales positivas; y en rojo, las cargas superficiales negativas. Los carbonos de los residuos que participan en la formación del bolsillo de coordinación del ión amonio están coloreados en verde. Los carbonos del residuo E448 están coloreados en amarillo. Los iones Manganeso están representados como esferas de color violeta.

Además del estudio de la interacción entre la GS y los IFs, con el análisis mutacional de la GS hemos conseguido identificar varios residuos críticos para el mantenimiento de la estructura cuaternaria, para la solubilidad de la enzima o para su actividad. En primer lugar, observamos que las proteínas mutantes GS-E454A y GS-

D472A no presentan un comportamiento similar al de la proteína silvestre al someterlas a electroforesis en condiciones no desnaturizantes. Sin embargo, en presencia de los factores inactivantes, migran igual que la GSI silvestre (Figura 47, Resultados, apartado 2.2). Otros trabajos han demostrado que la GS de *Escherichia coli* puede formar agregados supramoleculares en presencia de ciertos metales, como Zn^{2+} , Cu^{2+} o Co^{2+} , entre otros (ver por ejemplo Yanchunas *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997). Por otro lado, la enzima podría haberse desorganizado en subunidades o anillos independientes, cambiando la movilidad electroforética en condiciones no desnaturizantes. Para analizar si la modificación en el comportamiento electroforético observada en las versiones mutantes GS-E454A y GS-D472A era debida a organizaciones supramoleculares o desestabilización entre las subunidades de la enzima, las muestras de proteínas puras fueron sometidas a cromatografía de exclusión molecular (Figura 48, Resultados, apartado 2.2). Las versiones mutantes no presentaron agregados de mayor tamaño molecular que el observado en la proteína silvestre, pero si mostraron desorganizaciones en subunidades y anillos. Trabajos cristalográficos previos han determinado que las subunidades de la GS bacteriana se mantienen unidas mediante interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno (Almassy *et al.*, 1986). Al analizar el entorno bioquímico de estos residuos observamos que el residuo E454 interacciona con la Lys450 y la Tyr470 formando puentes de hidrógeno, en el que el glutamato actúa como aceptor del hidrógeno, y con la Pro317 mediante una interacción de tipo hidrofóbico. Todos estos residuos pertenecen a la misma subunidad enzimática, excepto la Tyr470, que pertenece a la subunidad más próxima del anillo adyacente (Figura 66C). Por otro lado, este tipo de interacción hidrofóbica también se observa entre el residuo D472 y los residuos hidrofóbicos Ile30 y Leu469 (Figura 66D) La isoleucina pertenece a la subunidad vecina mientras que la leucina se encuentra en la misma subunidad que el aspartato 472. Esto indica que los residuos Glu454 y Asp472 participan en las interacciones dentro de una misma subunidad y entre subunidades de diferentes anillos, lo que mantiene la estructura cuaternaria de la enzima. Esta observación estructural explica que al sustituir los residuos E454 y D472 por alanina, las subunidades de la enzima pierdan afinidad entre si, desorganizándose en anillos y monómeros.

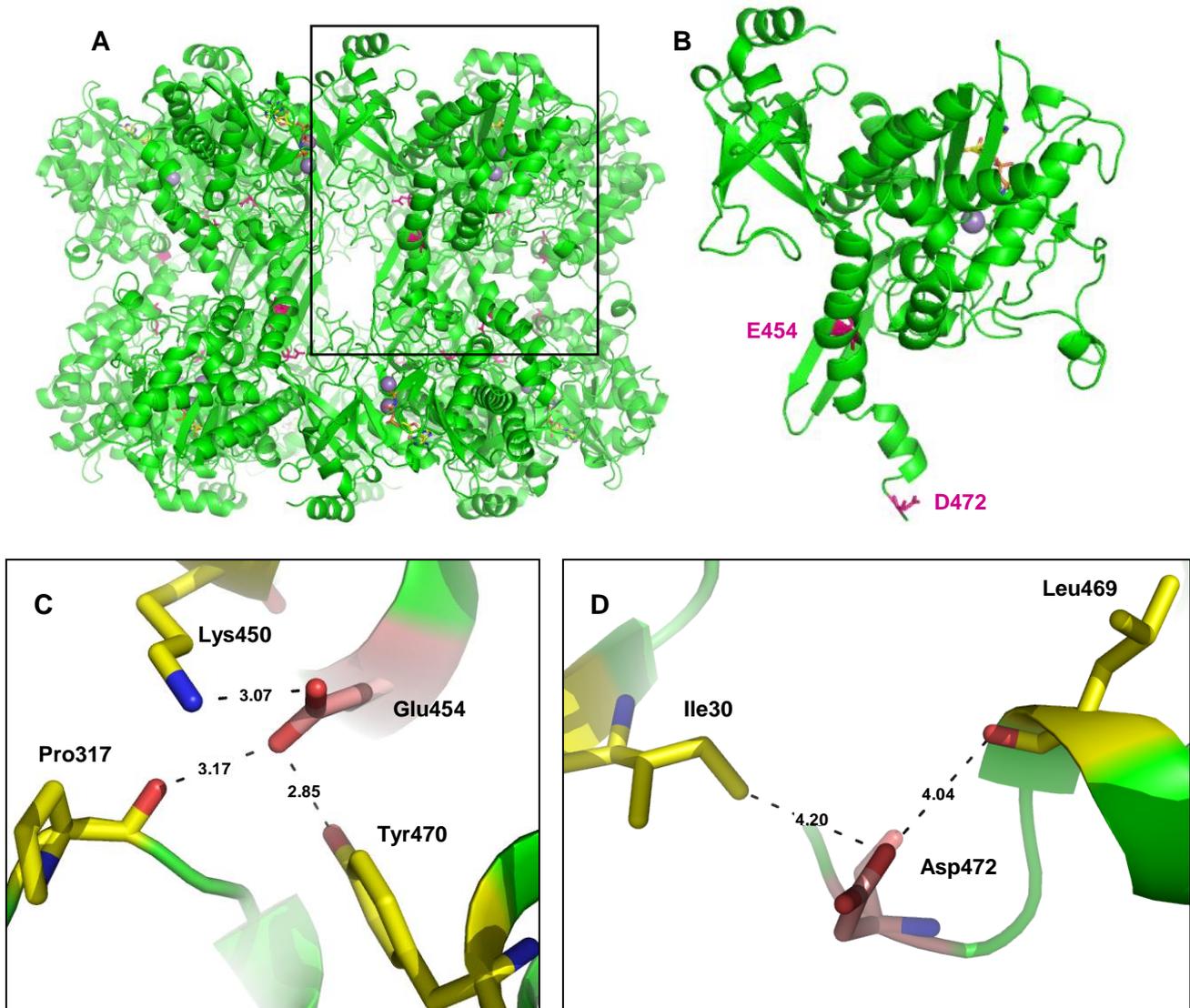


Figura 66. Estructura de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 a una resolución de 2.8 Å.

Vista lateral de la enzima (A) y vista ampliada de una subunidad remarcada de la enzima (B). Las figuras C y D corresponden a las ampliaciones del entorno de los residuos Glu454 y Asp472 y las interacciones que mantienen con los residuos adyacentes. Los residuos E454 y D472, representados como bastones, están coloreados en rosa. Los residuos con los que interaccionan están coloreados en amarillo. La enzima fue cocrystalizada con AMP-PNP, representado como bastones, y Mn^{2+} , esferas violetas.

El análisis mutacional del extremo carboxilo de la GSI nos permitió identificar un residuo crítico para la estabilidad y para la actividad enzimática, el residuo de glutamato en la posición 466 (Figura 46, Resultados, apartado 2.2). El glutamato 466 de la GS de *Synechocystis*, así como los residuos que interaccionan con éste, están conservados en las glutamina sintetisas bacterianas conocidas, como es el caso de la GS de *Salmonella typhimurium* (Figuras 57, 67 y 69). En esta enzima, el glutamato

homólogo al E466 se encuentra en el residuo 461, y los residuos con los que interacciona son Thr316, Asn317, Lys320 e His458 (Figura 67), homólogos a los aminoácidos Thr319, Asn320, Lys323 e His463 presentes en la GSI de *Synechocystis* (Figura 57A, Resultados, apartado 3.5). Todos los aminoácidos con los que interacciona se encuentran en la subunidad adyacente del anillo vecino. Las distancias entre E461 y éstos son de 2.72 Å, 2.85 Å, 2.25 Å y 3.01 Å, respectivamente. Al analizar el entorno bioquímico del residuo Glu466 de la GS de *Synechocystis* podemos observar que las interacciones entre éste y los residuos colindantes son enlaces de hidrógeno, en los que el aceptor del hidrógeno es el grupo carboxilo del residuo Glu466 y los donadores son los residuos Thr319, Asn320 y Lys323.

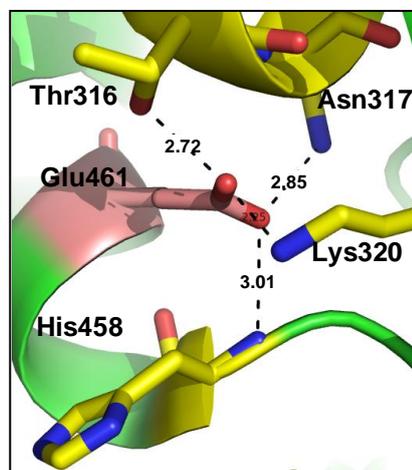


Figura 67. Análisis del entorno bioquímico del residuo E461 en la GS de *Salmonella typhimurium*.

El modelo estructural de la GS de Salmonella se ha obtenido del archivo 1F52.pdb (Gill y Eisenberg, 2001). El residuo E461 de esta enzima es homólogo al residuo E466 de la GSI de *Synechocystis* (Figura 57).

En este trabajo, el glutamato 466 ha sido sustituido por varios residuos diferentes (E466D, E466Q, E466A y E466K), para obtener información sobre la aportación de este residuo a la conformación nativa de la GSI. Los aminoácidos aspartato (D) y glutamato (E) pertenecen al grupo de aminoácidos con carga negativa a pH fisiológico, debido a que sólo presentan grupo carboxilo en su cadena lateral. El tamaño de ambos residuos difiere en un único carbono, presente en el glutamato, y que aumenta la longitud de la cadena lateral. La sustitución de uno por otro no debe modificar la carga de los residuos pero disminuiría ligeramente el tamaño relativo de la cadena lateral. Además, ambos presentan un grupo carboxilo en la cadena lateral que

puede actuar como aceptor en un enlace de hidrógeno. La actividad GS *in situ* obtenida en la estirpe ET6017 de *E. coli* portadora de la proteína mutante GS-E466D, así como la solubilidad de esta proteína, son notablemente menores que las obtenidas en el análisis de la GSI silvestre (Figuras 48 y 49, Resultados, apartado 2.3). Esto indica que la sustitución de E por D provoca una disminución de la afinidad entre anillos como consecuencia del cambio de longitud en la cadena lateral que aumenta la distancia de los enlaces de hidrógeno. Esto implicaría una disminución de la solubilidad y una consiguiente reducción de la actividad enzimática.

La glutamina (Q) es un residuo polar con un grupo amino en su cadena lateral, y puede así participar en interacciones dipolares o puentes de hidrógeno. Sin embargo, el grupo amino de la glutamina actúa como donador del hidrógeno, mientras que el grupo carboxilo del glutamato es el aceptor. La alanina (A) es un residuo hidrofóbico que presenta una cadena lateral de un solo carbono. Al sustituir el glutamato por alanina, se elimina la carga negativa, disminuye drásticamente el tamaño de la cadena lateral y pierde la capacidad de interactuar con los residuos adyacentes mediante puentes de hidrógeno. Consecuentemente, estos cambios bioquímicos conllevan la pérdida de actividad y solubilidad en los mutantes GS-E466Q y GS-E466A.

Por último, la lisina es un residuo básico cuya cadena lateral le confiere una carga positiva a pH fisiológico y su grupo amino participa en puentes de hidrógeno como donador del hidrógeno. La sustitución, en este caso, del glutamato por lisina implicaría un cambio de carga (de negativa a positiva) con un aumento de la longitud en la cadena lateral de un carbono, y la imposibilidad de aceptar el hidrógeno de los residuos adyacentes. A pesar de estos cambios, el mutante GS-E466K muestra un 2.3 % de actividad con respecto a la proteína silvestre, además de complementar ligeramente la auxotrofia por glutamina del mutante ET6017 (Figuras 49 y 50, Resultados, apartado 2.3). Es posible que la cadena lateral de la lisina forme algún tipo de interacción electrostática con los residuos vecinos (como la treonina 319, figura 57A), suficiente para aportar un mínimo de solubilidad, que confiere actividad a la enzima.

Teniendo en cuenta el estudio mutacional del residuo E466 de la GSI y los datos obtenidos mediante el estudio estructural de la GS, podemos postular que la pérdida de actividad se debe a la pérdida de solubilidad; y el residuo E466 participa en el mantenimiento de la integridad de la estructura cuaternaria de la enzima y en su solubilidad. Esto se deduce de la correlación observada entre la solubilidad y la

actividad enzimática, de forma que cuanto más insoluble es la versión mutante, menor actividad presenta (Figuras 48, 49 y 50, Resultados, apartado 2.3). Mediante la comparación de secuencias de las glutamina sintetetas bacterianas observamos que el residuo E466 y aquellos con los que mantiene interacción en la GSI de *Synechocystis*, han sido conservados en la evolución bacteriana, posiblemente por su importancia en el mantenimiento de estructura cuaternaria de la proteína (Figura 69). Todos estos datos sugieren que el residuo E466 de la GS de *Synechocystis* y sus homólogos son esenciales para la estructura cuaternaria de la enzima y su funcionalidad.

3. ESTUDIO CRISTALOGRÁFICO DE LA GSI DE *SYNECHOCYSTIS*

El primer objetivo durante el estudio cristalográfico se centró en la obtención de cristales de tamaño y calidad óptimos para la correcta difracción de los mismos. Es por eso que se utilizaron compuestos como el AMP-PNP o el cofactor manganeso para conferir estabilidad a la enzima (Maurizi y Ginsburg, 1982). El uso de estos compuestos ayudó a la cristalización de la enzima silvestre, por lo que los datos obtenidos en la difracción de los cristales fueron suficientes para la resolución de la estructura. Utilizando como modelo la estructura ya resuelta de la glutamina sintetasa de *Mycobacterium tuberculosis* (2BVC.pdb; Krajewski *et al.*, 2005), hemos obtenido el mapa de densidad electrónica de la glutamina sintetasa silvestre y mutante GS-N456K de *Synechocystis*. No obstante, el cristal difractado correspondiente a la GSI silvestre presentó un problema de translocación, que ocurre cuando algunas capas o grupos de moléculas están ordenados de forma aleatoria dentro del cristal, en relación con otros grupos de moléculas (Tsai *et al.*, 2009). En este caso, una capa formada por una molécula completa (12 subunidades) de la GS silvestre en presencia de AMP-PNP y Mn^{+2} estaba perfectamente ordenada, mientras que la segunda capa aparecía en posiciones aleatorias.

Los desórdenes en el crecimiento de un cristal pueden conllevar varios problemas en el análisis de los datos de difracción. Uno de los desórdenes más conocidos es el *twinning* (Helliwell, 2008), en el que existen tres dominios dimensionales diferentes, que presentan una orientación diferente entre sí, pero que están ordenados individualmente. El término de translocación de matriz ha sido utilizado para describir situaciones en las que diferentes grupos de moléculas en un cristal, organizadas o no en capas, están ordenadas entre sí de forma estocástica, pero acorde con uno o más vectores de traslación (Wang *et al.*, 2005b). En los últimos años se han presentado varios trabajos que describen la translocación. El primer trabajo que describió la translocación fue realizado por Bragg y Howwells (1954) en el que se resolvió la estructura de la metahemoglobina. Cada vez son más frecuentes los trabajos en los que se enfrentan a este tipo de desorden (ver como ejemplos Wang *et al.*, 2005a; Tanaka *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2008).

La translocación se manifiesta frecuentemente por patrones de difracción que presentan al mismo tiempo líneas y puntos discretos, con reflexiones difusas (Tsai *et al.*, 2009). Las intensidades de las reflexiones también se ven afectadas por este problema (Figura 53, Resultados, apartado 3.4). Para corregir los efectos de la translocación fue necesaria la eliminación de la capa translocada así como el uso de

algoritmos de corrección. Éstos consisten en ecuaciones que relacionan las intensidades observadas con las intensidades cristalográficas que se esperarían en un cristal ideal carente de translocación (Wang *et al.*, 2005a). De esta forma, algunas reflexiones consideradas “translocadas” son descartadas, mejorando así la calidad del modelo. Las intensidades corregidas son las utilizadas posteriormente para el refinamiento. No obstante, los índices de calidad de modelos corregidos (*R factors*) no son óptimos, indicando que los datos obtenidos no se ajustan correctamente al mapa de densidad electrónica calculado. A pesar de ello, el modelo final de la GSI silvestre de *Synechocystis* presentó unos valores de *Rwork* de 0.28 y de *Rfree* de 0.31, que son aceptables dada la complicación producida por el desorden. Este modelo contenía 12 subunidades por celda unidad, con los residuos 3-473 de un total de 473 aminoácidos de cada monómero (Tabla 11, Resultados, apartados 3.2). Los cristales derivados de la proteína mutante GS-N456K no presentaron ningún desorden en el crecimiento, por lo que el procesamiento de los dos modelos obtenidos fue llevado a cabo mediante reemplazamiento molecular sin aplicar correcciones algorítmicas.

Se han realizado diversos estudios estructurales de las glutamina sintetasas de procariotas y eucariotas (ver por ejemplo Almasy *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 1999; Unno *et al.*, 2006; Krajewski *et al.*, 2008; van Rooyen *et al.*, 2006). Todas ellas están formadas por dos anillos superpuestos cuyo número de subunidades varía en función del tipo de GS. De esta forma, la GS de tipo I y III están formadas por 12 subunidades, mientras que la GS de tipo II está formada por 10 subunidades. La glutamina sintetasa tipo I de *Synechocystis* presenta 12 subunidades organizadas en los dos típicos anillos superpuestos y enfrentados. El dominio β -grasp del extremo amino terminal de la glutamina sintetasa está formado por 5 hojas beta antiparalelas, mientras que el extremo carboxilo terminal contiene el dominio catalítico y la región de interacción anillo-anillo. El dominio β -grasp de una subunidad interacciona con el dominio catalítico de la subunidad vecina (Figura 56, Resultados, apartado 3.4). El modelo estructural obtenido en este trabajo se asemeja en gran medida a los resueltos para *Salmonella typhimurium* o *Mycobacterium tuberculosis* (Almasy *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 1999). Al comparar los modelos estructurales conocidos con la estructura de la GSI de *Synechocystis* obtenida en este trabajo, podemos comprobar que los residuos que conforman el sitio activo están ampliamente conservados en bacterias. Los aminoácidos involucrados en la coordinación del ión amonio en el sitio activo de la GS de *Salmonella typhimurium* son Asp50, Ser53, Tyr179 y Glu327 (Eisenberg *et al.*, 2000) (Figura 68B y 68D) y están organizados de forma similar a sus homólogos en la GSI de *Synechocystis* (Figura 68A y 68C). Lo mismo ocurre con los residuos que

coordinan el nucleótido y el sustrato glutamato. Sin embargo, se observan diferencias en cuanto a la localización de los sitios n1 y n2 (en los que se localizan los iones Mn^{+2} o Mg^{+2}) entre la GS de *Synechocystis* y la de *Salmonella*. Ya que el AMP-PNP contiene un grupo fosfato más que el ADP, es posible que estas diferencias sean debidas al uso de AMP-PNP para la cristalización de la GS de *Synechocystis*, en lugar de ADP, usado para la cristalización de la GS de *Salmonella*. Sin embargo, si analizamos el sitio activo de la GS de *Zea Mays* (Figura 68E) observamos que no sólo presenta tres sitios de unión a aniones, sino que las posiciones relativas de dos de ellos son similares a las que encontramos en la GS de *Synechocystis*. Cabe destacar que los modelos estructurales resueltos para las GSs de animales o de plantas suelen contener más de dos iones Mn^{2+} o Mg^{2+} en sus sitios activos, mientras que las GSs bacterianas presentan sólo uno o dos (ver por ejemplo Unno *et al.*, 2006; Krajewski *et al.*, 2008).

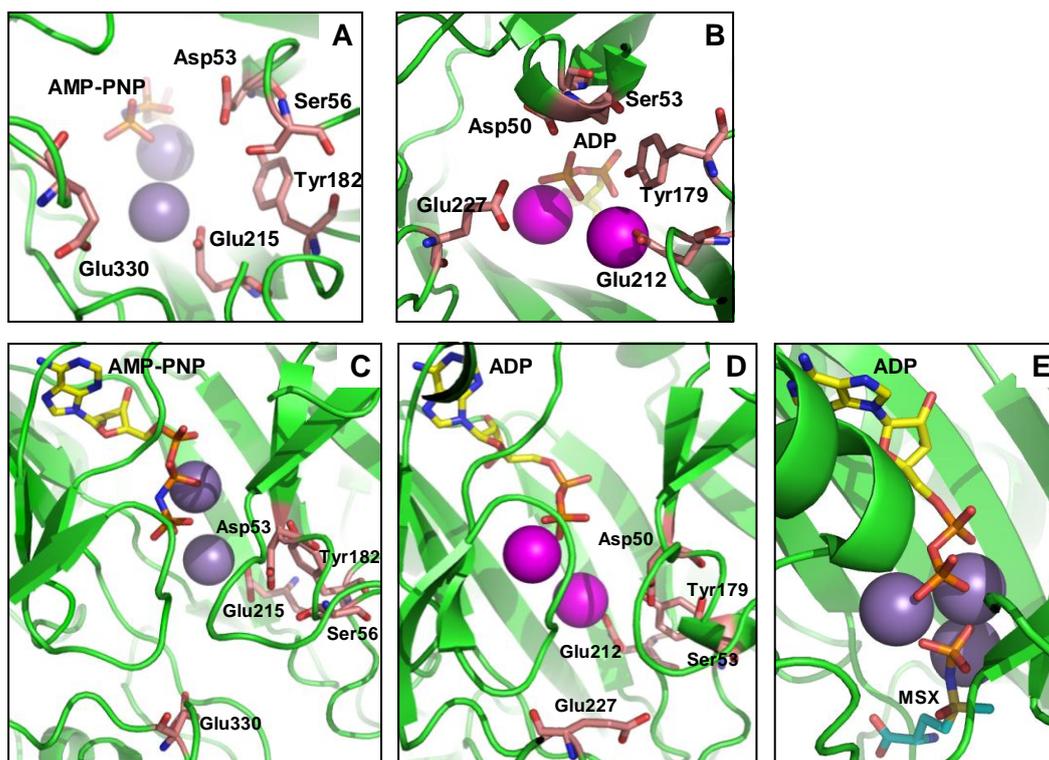


Figura 68. Representación del sitio activo de las glutamina sintetasas de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (A y C), *Salmonella typhimurium* (B y D) y *Zea Mays* (E).

Las imágenes A y B corresponden a la vista inferior del sitio activo. Las imágenes C, D y E corresponden a la vista lateral del sitio activo. Los residuos involucrados en la coordinación del ión amonio en el sitio activo de la GS de *Synechocystis* y de *Salmonella* presentan sus carbonos coloreados en rosa. Los iones Mn^{2+} se encuentran representados como esferas. El nucleótido ADP o AMP-PNP muestra los carbonos de color amarillo. La imagen E presenta además el compuesto L-Metionina DL-Sulfoximina (MSX), cuyos carbonos están coloreados en azul cian.

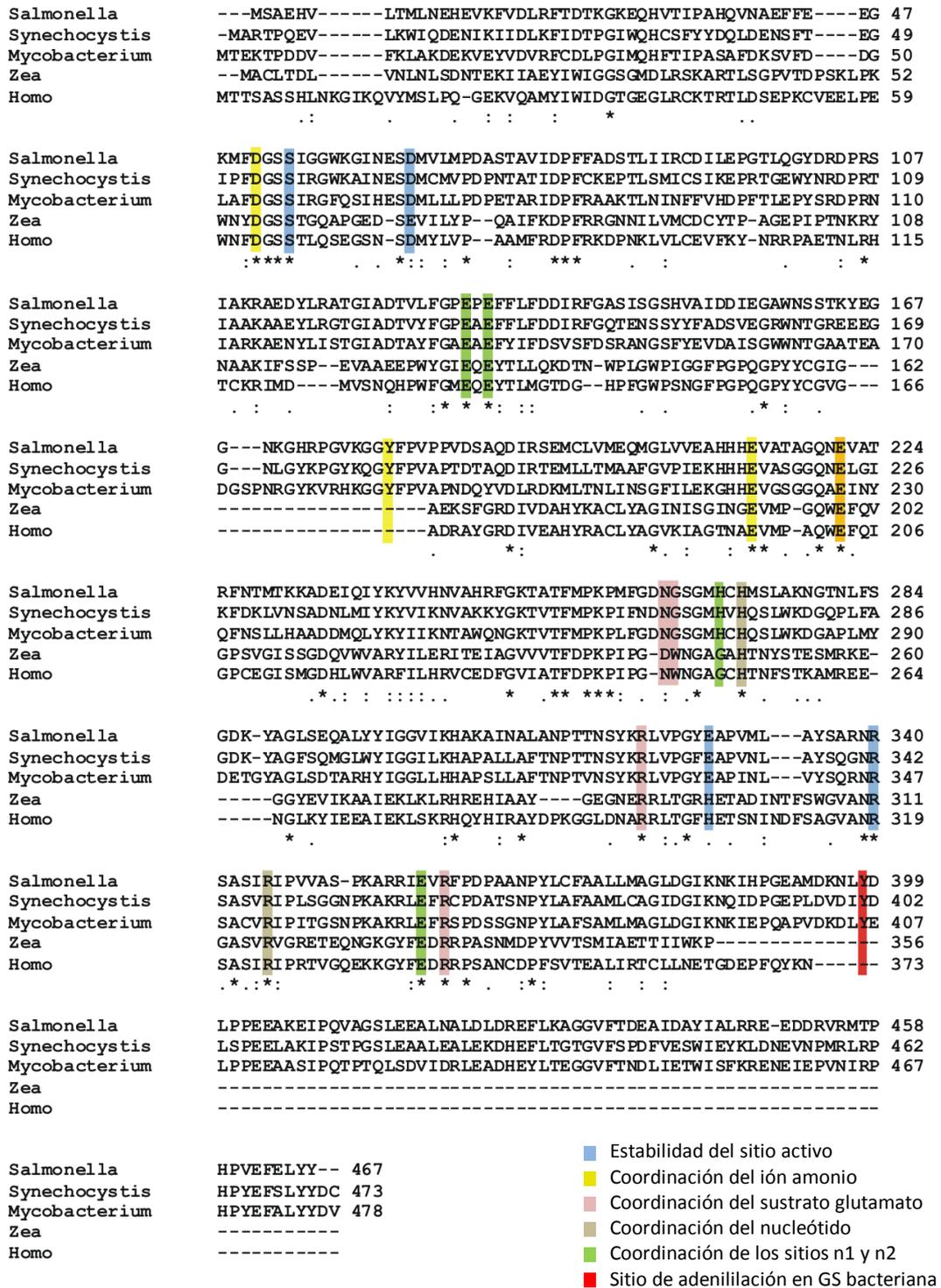


Figura 69. Alineamiento de las secuencias de las glutamina sintetasas de *Salmonella typhimurium*, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Mycobacterium tuberculosis*, *Zea mays* y *Homo Sapiens*.

Los residuos involucrados en conferir estabilidad al sitio activo, en la coordinación del ión amonio, del sustrato glutamato, del nucleótido y de los sitios n1 y n2, así como el sitio de adenililación en bacterias están sombreados por los colores detallados en la leyenda.

Como se ha descrito en la glutamina sintetasa bacteriana (Shapiro y Ginsburg, 1968), el ión Mn1 localizado en la posición n2 parece estabilizar la conformación activa de la GS, coordinando varios residuos de glutamato localizados en el sitio activo (Tabla 14 y Figura 60, Resultados, apartado 3.5). El ión Mn2, localizado en el sitio n1, se encuentra interaccionando fundamentalmente con los grupos fosfatos del AMP-PNP (Tabla 14 y Figura 60, Resultados, apartado 3.5), lo que corrobora su intervención en la transferencia del grupo fosfato al sustrato glutamato, como se ha descrito en la GS de *Escherichia coli* (Hunt *et al.*, 1975).

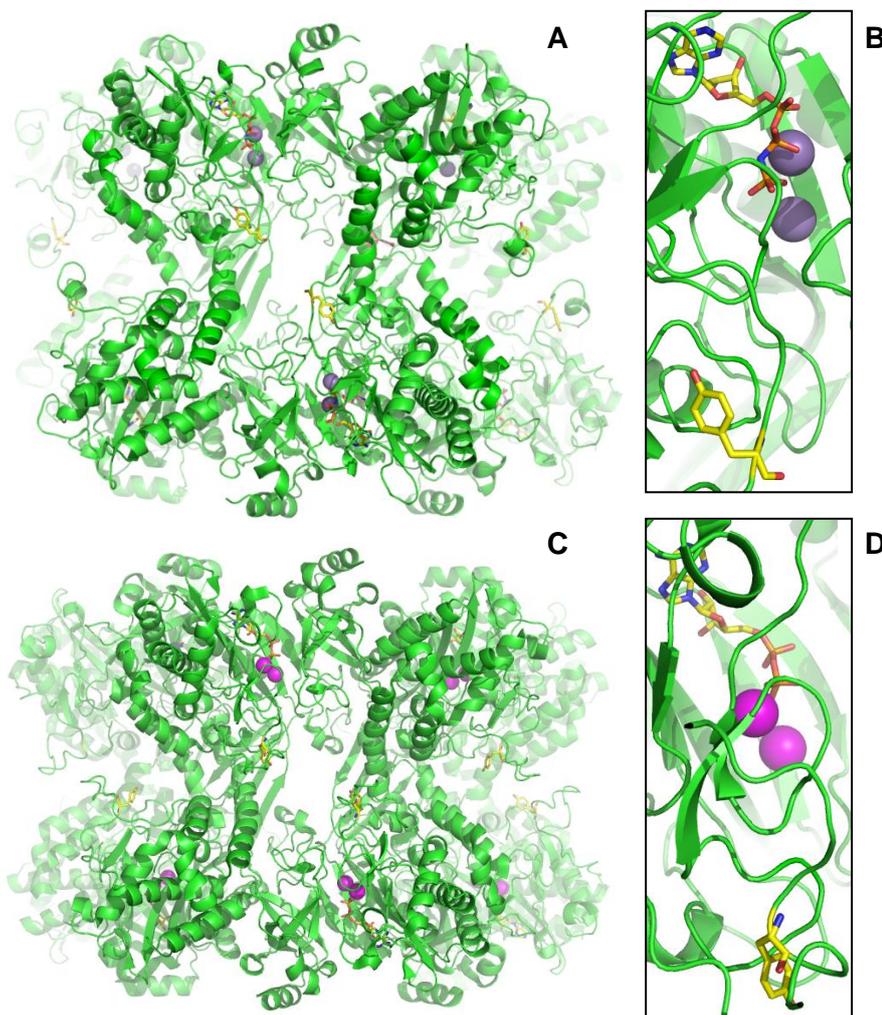


Figura 70. Representación del sitio de adenilación de la glutamina sintetasa de *Salmonella typhimurium* (C y D) y de su homólogo en la GS de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (A y B).

Las imágenes A y C corresponden a la GS completa. Las imágenes B y D corresponden a la ampliación del sitio activo y de los residuos Tyr401 (B) o Tyr397 (D). Los iones manganeso se encuentran representados como esferas. El nucleótido ADP o AMP-PNP muestra los carbonos de color amarillo. Los residuos tirosina 401 de la GS de *Synechocystis* y tirosina 397 de la GS de *Salmonella* presentan los carbonos de color amarillo.

El alineamiento entre las secuencias de las GSs de bacterias, animales y plantas muestra pocas diferencias en cuanto a los residuos involucrados en conferir estabilidad al sitio activo, en la coordinación del ión amonio, los iones Mn^{+2} o Mg^{+2} , el sustrato glutamato y el nucleótido (Figura 69). Aunque cabe destacar que son mayores las concordancias entre las GSs de los organismos procariotas o eucariotas entre sí.

Aunque ha sido excluida la regulación por adenililación-deadenililación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* y de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Mérida *et al.*, 1991a; Orr y Haselkorn, 1981), la tirosina diana de adenililación en bacterias está conservada en estas cianobacterias (Figura 69). Además, la localización de la tirosina 397 de la GS de *Salmonella* y su residuo homólogo, la tirosina 401 de la GS de *Synechocystis* en los modelos estructurales es similar (Figura 70A y 70C), aunque la orientación no es exactamente la misma, ya que la cadena lateral de la Tyr401 está más expuesta (Figura 70B y 70D). Según estudios mutacionales de la tirosina diana de adenililación de la glutamina sintetasa de *E. coli*, este residuo no parece ser sólo un punto de ataque para el grupo adenilo, sino que también parece ser importante para la actividad de la enzima no adenililada (Luo *et al.*, 2005). Esta observación podría explicar el grado de conservación del residuo en diferentes organismos.

El sistema de regulación de la glutamina sintetasa de *Synechocystis* ha sido analizado en profundidad desde principios de los años 90 (Mérida *et al.*, 1991a). Con el trabajo presentado aquí se ha tratado de caracterizar la interacción entre la glutamina sintetasa y los factores inactivantes desde un punto de vista bioquímico. Los resultados nos han permitido establecer conclusiones acerca del mecanismo de inactivación de la GSI. Puesto que aún desconocemos el posicionamiento de los factores inactivantes al interactuar con la GSI, en estudios futuros se completará el análisis cristalográfico mediante la cristalización del complejo GS/IF y la resolución de su estructura.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis mediante mutagénesis dirigida de las proteínas IF7 e IF17 ha permitido identificar tres residuos de arginina conservados (en las posiciones 8, 21 y 28 en IF7 y 90, 103 y 110 en IF17) como críticos para la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de los factores inactivantes.
2. Los datos obtenidos a partir del análisis del mutante IF17-ABC indican que los residuos conservados YRG presentes en la región amino terminal de IF17 no están implicados en su estabilización ni participan en el proceso de interacción e inactivación de la GSI *in vitro*.
3. La rápida degradación de IF7 en la estirpe LIF durante el proceso de reactivación de la GSI implica que la ausencia de IF17 disminuye la estabilidad de la proteína IF7.
4. La región carboxilo terminal de la GSI compuesta por 50 residuos de aminoácidos participa en la interacción con los factores inactivantes y en la inactivación enzimática.
5. Los residuos D452 y N456 presentes en la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y sus homólogos en la GS de *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (A453 y K457, respectivamente) son críticos para la especificidad en la interacción GS/IF de ambos organismos.
6. El estudio de interacción de la proteína GS-N456K con los factores inactivantes demuestra que la proteína IF17 interacciona con la GSI por al menos dos regiones distintas, y sólo una de ellas está involucrada en el proceso de inactivación.
7. El residuo E448 de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 interviene en la interacción con los factores inactivantes y en la inactivación enzimática por IF7.
8. El residuo E466 de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803, conservado en las glutamina sintetasas bacterianas, es crítico para el mantenimiento de la solubilidad de la enzima, su conformación, así como su actividad.
9. Se ha determinado mediante estudios cristalográficos que la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 está formada por 12 subunidades organizadas en dos anillos hexaméricos superpuestos; y que el sitio activo está localizado entre cada dos subunidades dentro de un mismo anillo.

10. Los residuos de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 involucrados en conferir estabilidad al sitio activo y en la coordinación del ión amonio, los iones Mn^{+2} , el sustrato glutamato y el nucleótido, están muy conservados en bacterias; el estudio cristalográfico de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha permitido determinar que la localización de dichos residuos es similar a la observada en la GS de *Salmonella typhimurium*.
11. El modelo estructural de la GSI de *Synechocystis* sp. PCC muestra que uno de los iones Mn^{+2} localizado en el sitio activo se posiciona de forma diferente a los iones de las GSs bacterianas en los modelos estructurales hasta ahora resueltos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD (2005). A robust bulk-solvent correction and anisotropic scaling procedure. *Acta Crystallogr.* D61:850-5
- Almassy RJ, Janson CA, Hamlin R, Xuong NH, Eisenberg D (1986). Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* 323:304-9
- Berlett BS, Levine RL, Stadtman ER (1998). Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2784-9
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-23
- Blanco F, Alana A, Llama MJ, Serra JL (1989). Purification and properties of glutamine synthetase from the non-N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J. Bacteriol.* 171:1158-65
- Blankenship RE (1992). Origin and early evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res* 33:91-111
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54
- Buick R (1992). The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archaean lakes. *Science* 255:74-7
- Caban CE, Ginsburg A (1976). Glutamine synthetase adenylyltransferase from *Escherichia coli*: purification and physical and chemical properties. *Biochemistry* 15:1569-80
- Cai YP, Wolk CP (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.* 172:3138-45
- Chauvat F, Labarre J, Ferino F (1988). Development of genes transfer system for the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 629-37
- Chayen NE (2005). Methods for separating nucleation and growth in protein crystallisation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 88:329-37
- Chen JP, Dabrowski MJ, Atkins WM (1997). Synthesis and characterization of supramolecular protein aggregates: self-assembled, molecularly-ordered, tubes from electrostatic complementation of glutamine synthetase dodecamers. *Protein Eng.* 10:1289-94

- Chen YM, Backman K, Magasanik B (1982). Characterization of a gene, *glnL*, the product of which is involved in the regulation of nitrogen utilization in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 150:214-20
- Chernov AA (2003). Protein crystals and their growth. *J. Struct. Biol.* 142:3-21
- Chung HK, Rhee SG (1984). Separation of glutamine synthetase species with different states of adenylylation by chromatography on monoclonal anti-AMP antibody affinity columns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 81:4677-81
- Crespo JL, García-Domínguez M, Florencio FJ (1998). Nitrogen control of the *glnN* gene that codes for GS type III, the only glutamine synthetase in the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. *Mol. Microbiol.* 30:1101-12
- Davis TL, Walker JR, Loppnau P, Butler-Cole C, Allali-Hassani A, Dhe-Paganon S (2008). Autoregulation by the juxtamembrane region of the human ephrin receptor tyrosine kinase A3 (EphA3). *Structure* 16:873-84
- Eisenberg D, Gill HS, Pfluegl GM, Rotstein SH (2000). Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1477:122-45
- Emsley P, Cowtan K (2005). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.* D60:2126-32
- Espie GS, Jalali F, Tong T, Zacal NJ, So AK (2007). Involvement of the *cynABDS* operon and the CO₂-concentrating mechanism in the light-dependent transport and metabolism of cyanate by cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 189:1013-24
- Espinosa J, Castells MA, Laichoubi KB, Contreras A (2009). Mutations at *pipX* suppress lethality of PII-deficient mutants of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J. Bacteriol.* 191:4863-9
- Espinosa J, Forchhammer K, Burillo S, Contreras A (2006). Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Mol. Microbiol.* 61:457-69
- Florencio FJ, Ramos JL (1985). Purification and characterization of glutamine synthetase from the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 838:39-48
- Florencio FJ, Reyes JC (2002). Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. En Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon metabolism and respiratory metabolism. Noctor, C.H.F.a.G.es (ed). The Netherlands: Kluwer Academic, 93-113

- Flores E, Herrero A (1994). Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En The molecular biology of cyanobacteria. Bryant, D.A.es (ed). The Netherlands: Kluwer Academic, 487-517
- Flores E, Herrero A (2005). Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33:164-7
- Flores E, Herrero A (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:39-50
- Flores E, Wolk CP (1985). Identification of facultatively heterotrophic, N₂-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. *J. Bacteriol.* 162:1339-41
- Forchhammer K, Tandeau de Marsac N (1995). Phosphorylation of the PII protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of *in vitro* kinase activity. *J. Bacteriol.* 177:5812-7
- Frías JE, Flores E, Herrero A (1994). Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 14:823-32
- Frías JE, Mérida A, Herrero A, Martín-Nieto J, Flores E (1993). General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 175:5710-3
- Galmozzi CV (2008). Mecanismo de regulación postraduccional de la glutamina sintetasa de tipo I en cianobacterias. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla
- Galmozzi CV, Fernández-Avila MJ, Reyes JC, Florencio FJ, Muro-Pastor MI (2007). The ammonium-inactivated cyanobacterial glutamine synthetase I is reactivated *in vivo* by a mechanism involving proteolytic removal of its inactivating factors. *Mol. Microbiol.* 65:166-79
- Galmozzi CV, Saelices L, Florencio FJ, Muro-Pastor MI (2010). The postranscriptional regulation of glutamine synthetase in the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. Differential expression between vegetative cells and heterocysts. *J. Bacteriol.* 192:4701-11
- García-Domínguez M, Reyes JC, Florencio FJ (1997). Purification and characterization of a new type of glutamine synthetase from cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* 244:258-64
- García-Domínguez M, Reyes JC, Florencio FJ (1999). Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96:7161-6

- García-Domínguez M, Reyes JC, Florencio FJ (2000). NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 35:1192-201
- García-Fernández JM, de Marsac NT, Diez J (2004). Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:630-8
- García-Ruiz JM, Hyde ST, Carnerup AM, Christy AG, van Kranendonk MJ, Welham NJ (2003). Self-assembled silica-carbonate structures and detection of ancient microfossils. *Science* 302:1194-7
- Gill HS, Eisenberg D (2001). The crystal structure of phosphinothricin in the active site of glutamine synthetase illuminates the mechanism of enzymatic inhibition. *Biochemistry* 40:1903-12
- Gill HS, Pfluegl GM, Eisenberg D (1999). Preliminary crystallographic studies on glutamine synthetase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr.* D55:865-8
- Gill HS, Pfluegl GM, Eisenberg D (2002). Multicopy crystallographic refinement of a relaxed glutamine synthetase from *Mycobacterium tuberculosis* highlights flexible loops in the enzymatic mechanism and its regulation. *Biochemistry* 41:9863-72
- Giovannoni SJ, Turner S, Olsen GJ, Barns S, Lane DJ, Pace NR (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170:3584-92
- Goodman HJ, Woods DR (1993). Cloning and nucleotide sequence of the *Butyrivibrio fibrisolvens* gene encoding a type III glutamine synthetase. *J. Gen. Microbiol.* 139:1487-93
- Gray MW (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* 5:294-9
- Grigorieva G, Shestakov S (1982). Transformation in cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* 13:367-70
- Gunnerson D, Haley B (1992). Detection of glutamine synthetase in the cerebrospinal fluid of Alzheimer diseased patients: a potential diagnostic biochemical marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11949-53
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-80
- Helliwell JR (2008). Macromolecular crystal twinning, lattice disorders and multiple crystals. *Crystallography Reviews* 14:189-250

- Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E (2001). Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183:411-25
- Hunt JB, Smyrniotis PZ, Ginsburg A, Stadtman ER (1975). Metal ion requirement by glutamine synthetase of *Escherichia coli* in catalysis of gamma-glutamyl transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* 166:102-24
- Ikeda TP, Shauger AE, Kustu S (1996). *Salmonella typhimurium* apparently perceives external nitrogen limitation as internal glutamine limitation. *J. Mol. Biol.* 259:589-607
- Ikeuchi M, Tabata S (2001). *Synechocystis* sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 70:73-83
- Jiang F, Hellman U, Sroga GE, Bergman B, Mannervik B (1995). Cloning, sequencing, and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 270:22882-9
- Jiang P, Ninfa AJ (1999). Regulation of autophosphorylation of *Escherichia coli* nitrogen regulator II by the PII signal transduction protein. *J. Bacteriol.* 181:1906-11
- Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ (1998). The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylylation state. *Biochemistry* 37:12802-10
- Jiang P, Zucker P, Atkinson MR, Kamberov ES, Tirasophon W, Chandran P, Schefke BR, Ninfa AJ (1997). Structure/function analysis of the PII signal transduction protein of *Escherichia coli*: genetic separation of interactions with protein receptors. *J. Bacteriol.* 179:4342-53
- Keener J, Kustu S (1988). Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NTRB and NTRC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NTRC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4976-80
- Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181:662-6
- Khademi S, O'Connell J 3rd, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJ, Stroud RM (2004). Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 305:1587-94
- Kleiner D (1981). The transport of NH₃ and NH₄⁺ across biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 639:41-52
- Knoll AH (2008). Cyanobacteria and Earth History. Norfolk: Caister Academic

- Koksharova OA, Wolk CP (2002). Genetic tools for cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58:123-37
- Krajewski WW, Collins R, Holmberg-Schiavone L, Jones TA, Karlberg T, Mowbray SL (2008). Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *J. Mol. Biol.* 375:217-28
- Krajewski WW, Jones TA, Mowbray SL (2005). Structure of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase in complex with a transition-state mimic provides functional insights. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:10499–504
- Krishnaswamy PR, Pamiljans V, Meister A (1960). Activated glutamate intermediate in the enzymatic synthesis of glutamine. *J. Biol. Chem.* 235:39-40
- Labarre J, Chauvat F, Thuriaux P (1989). Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 171:3449-57
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
- Lei M, Aebi U, Heidner EG, Eisenberg D (1979). Limited proteolysis of glutamine synthetase is inhibited by glutamate and by feedback inhibitors. *J. Biol. Chem.* 254:3129-34
- Leigh JA, Dodsworth JA (2007). Nitrogen regulation in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:349-77
- Liaw SH, Eisenberg D (1994). Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase, based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry* 33:675-81
- Liaw SH, Jun G, Eisenberg D (1994) Interactions of nucleotides with fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* 33:11184-8
- Liaw SH, Villafranca JJ, Eisenberg D (1993). A model for oxidative modification of glutamine synthetase, based on crystal structures of mutant H269N and the oxidized enzyme. *Biochemistry* 32:7999-8003
- Liu X, Curtiss R 3rd (2009). Nickel-inducible lysis system in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:21550-4
- Luque I, Flores E, Herrero A (1994). Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J.* 13:5794
- Luo S, Kim G, Levine RL (2005). Mutation of the adenylylated tyrosine of glutamine synthetase alters its catalytic properties. *Biochemistry* 44:9441-6

- Mac Kinney YGG (1941). Absorption of light of chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140:315-22
- Maeda S, Omata T (2009). Nitrite transport activity of the ABC-type cyanate transporter of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J. Bacteriol.* 191:3265-72
- Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, André B (1994). Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 13:3456-63
- Martín-Figueroa E, Navarro F, Florencio FJ (2000). The GS-GOGAT pathway is not operative in the heterocysts. Cloning and expression of *glsF* gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett.* 476:282-6
- Martin G, Haehnel W, Böger P (1997). Oxidative inactivation of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 179:730-4
- Maurizi MR, Ginsburg A (1982). Active site ligand stabilization of quaternary structures of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 257:7246-51
- Meeks JC, Wolk CP, Lockau W, Schilling N, Shaffer PW, Chien WS (1978). Pathways of assimilation of $[^{13}\text{N}]\text{N}_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.* 134:125-30
- Mérida A, Candau P, Florencio FJ (1991a). Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium. *J. Bacteriol.* 173:4095-100
- Mérida A, Candau P, Florencio FJ (1991b). *In vitro* reactivation of *in vivo* ammonium-inactivated glutamine synthetase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181:780-6
- Mérida A, Leurentop L, Candau P, Florencio FJ (1990). Purification and properties of glutamine synthetases from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain PCC 7601. *J. Bacteriol.* 172:4732-35
- Mitsui A, Cao S, Takahashi A, Arai T (1987). Growth of synchrony and cellular parameters of the unicellular nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain Miami BG 043511, under continuous illumination. *Physiol. Plant.* 69:1-8
- Montesinos ML, Herrero A, Flores E (1997). Amino acid transport in taxonomically diverse cyanobacteria and identification of two genes encoding elements of a neutral amino acid permease putatively involved in recapture of leaked hydrophobic amino acids. *J. Bacteriol.* 179:853-62

- Montesinos ML, Muro-Pastor AM, Herrero A, Flores E (1998). Ammonium/methylammonium permeases of a Cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated *amt* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 273:31463-70
- Moss J, Stanley SJ, Levine RL (1990). Inactivation of bacterial glutamine synthetase by ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* 265:21056-60
- Muro-Pastor MI, Barrera FN, Reyes JC, Florencio FJ, Neira JL (2003). The inactivating factor of glutamine synthetase, IF7, is a "natively unfolded" protein. *Protein Sci.* 12:1443-54
- Muro-Pastor MI, Florencio FJ (1992). Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 203:99-105
- Muro-Pastor MI, Florencio FJ (1994). NADP(+)-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: purification and characterization of the enzyme and cloning, sequencing, and disruption of the *icd* gene. *J. Bacteriol.* 176:2718-26
- Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ (1996). The NADP+-isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 178:4070-76
- Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ (2001). Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.* 276:38320-8
- Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 83:135-50
- Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Mimuro M, Miyashita H, Tsuchiya T, Sasamoto S, Watanabe A, Kawashima K, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakazaki N, Shimpo S, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2003). Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.* 10:137-45
- Neilson AH, Doudoroff M (1973). Ammonia assimilation in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 89:15-22
- Orr J, Haselkorn R (1982). Kinetic and inhibition studies of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J Biol Chem.* 256:13099-104
- Orr J, Keefer LM, Keim P, Nguyen TD, Wellem's T, Heinrikson RL, Haselkorn R (1981). Purification, physical characterization, and NH₂-terminal sequence of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* 256:13091-8

- Otwinowski Z, Minor W (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Method. Enzymol.* 276:307-26
- Picossi S, Montesinos ML, Pernil R, Lichtlé C, Herrero A, Flores E (2005). ABC-type neutral amino acid permease N-I is required for optimal diazotrophic growth and is repressed in the heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* 57:1582-92
- Porter RD (1986). Transformation in cyanobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 13:111-32
- Ramasubramanian TS, Wei TF, Golden JW (1994). Two *Anabaena* sp. strain PCC 7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. *J. Bacteriol.* 176:1214-23
- Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass AD (1999). AtAMT1 gene expression and NH₄⁺ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J.* 19:143-52
- Reitzer L (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:155-76
- Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ (1997). Transcription of glutamine synthetase genes (*glnA* and *glnN*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *J. Bacteriol.* 179:2678-89
- Reyes JC, Florencio FJ (1994). A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 176:1260-7
- Rhodes G (1993). Crystallography Made Crystal Clear. San Diego: Academic Press
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979). Generic assignments, strain stories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61
- Rupp B (2010). Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology. New York: Garland Science
- Sakakibara H, Shimizu H, Hase T, Yamazaki Y, Takao T, Shimonishi Y, Sugiyama T (1996). Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *J. Biol. Chem.* 271:29561-8
- Sakamoto T, Inoue-Sakamoto K, Bryant DA (1999). A novel nitrate/nitrite permease in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* 181:7363-72
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory

- Sauer J, Dirmeier U, Forchhammer K (2000). The *Synechococcus* strain PCC 7942 *glnN* product (glutamine synthetase III) helps recovery from prolonged nitrogen chlorosis. *J. Bacteriol.* 182:5615-9
- Sauer J, Gorl M, Forchhammer K (1999). Nitrogen starvation in *Synechococcus* PCC 7942: involvement of glutamine synthetase and NtcA in phycobiliprotein degradation and survival. *Arch. Microbiol.* 172:247-55
- Schägger H, von Jagow G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166:368-79
- Schopf JW (1993). Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260:640-6
- Schulz AA, Collett HJ, Reid SJ (2001). Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiol. Lett.* 205:361-7
- Shah V, Garg N, Madamwar D (2001). Ultrastructure of the fresh water cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production. *FEMS Microbiol Lett.* 194:71-5
- Shapiro BM, Ginsburg A (1968). Effects of specific divalent cations on some physical and chemical properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. Taut and relaxed enzyme forms. *Biochemistry* 7:2153-67
- Shapiro BM, Stadtman ER (1968). 5'-adenylyl-O-tyrosine. The novel phosphodiester residue of adenylylated glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243:3769-71
- Shapiro BM, Stadtman ER (1970). Glutamine synthesis (*Escherichia coli*). *Method. Enzymol.* 17a:910-22
- Siewe RM, Weil B, Burkovski A, Eikmanns BJ, Eikmanns M, Krämer R (1996). Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 271:5398-403
- Smith GD, Daday A, Newbigin EJ, Smith E (1982). The effect of glyoxylate on nitrogenase-catalyzed hydrogen formation in *Anabaena cylindrica*. *FEBS Lett.* 144:219-22
- Southern JA, Parker JR, Woods DR (1986). Expression and purification of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. *J. Gen. Microbiol.* 132:2827-35
- Spence E, Sarcina M, Ray N, Moller SG, Mullineaux CW, Robinson C (2003). Membrane-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Mol. Microbiol.* 48:1481-9

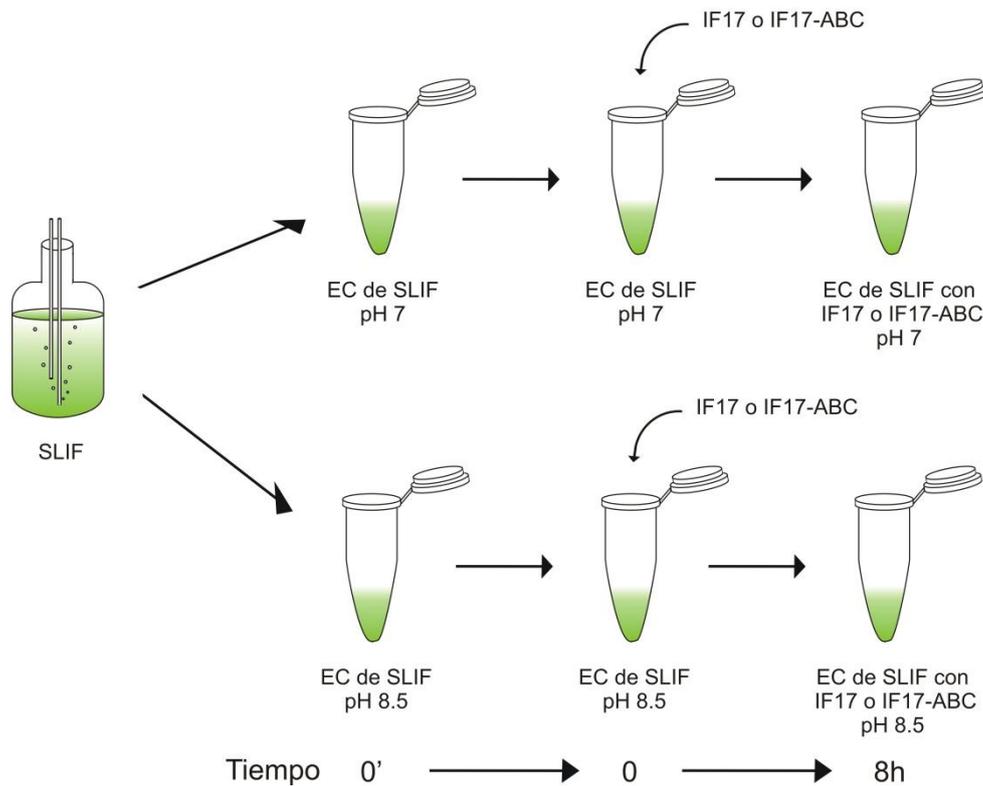
- Stacey G, Tabita FR, van Baalen C (1977). Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: purification of glutamine synthetase from *Anabaena* sp. strain CA. *J. Bacteriol.* 132:596-603
- Stadtman ER (2001) The story of glutamine synthetase regulation. *J. Biol. Chem.* 276:44357-64
- Stadtman ER, Ginsburgs A (1974). The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. En *The Enzymes*. Boyer, P.D.es (ed). New York: Academic Press
- Stal LJ, Zehr JP (2008). Cyanobacterial Nitrogen Fixation in the ocean: Diversity, Regulation and Ecology. Norfolk: Caister Academic
- Stanier RY, Cohen-Bazire G (1977). Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:225-74
- Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35:171-205
- Stewart WDP, Rowell P (1975). Effects of L-methionine-DL-sulfoximine on assimilation of newly fixed NH₃, acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65:846-55
- Studier FW, Moffatt BA (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113-30
- Suzuki I, Simon WJ, Slabas AR (2006). The heat shock response of *Synechocystis* sp. PCC 6803 analysed by transcriptomics and proteomics. *J. Exp. Bot.* 57:1573-8
- Tanaka S, Kerfeld CA, Sawaya MR, Cai F, Heinhorst S, Cannon GC, Yeates TO (2008). Atomic-level models of the bacterial carboxysome shell. *Science* 319:1083-6
- Temple SJ, Bagga S, Sengupta-Gopalan C (1998). Down-regulation of specific members of the glutamine synthetase gene family in alfalfa by antisense RNA technology. *Plant. Mol. Biol.* 37:535-47
- Thiel T, Poo H (1989). Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bacteriol.* 171: 5743-6
- Thomas GH, Mullins JG, Merrick M (2000). Membrane topology of the Mep/Amt family of ammonium transporters. *Mol. Microbiol.* 37:331-44
- Tsai Y, Sawaya MR, Yeates TO (2009). Analysis of lattice-translocation disorder in the layered hexagonal structure of carboxysome shell protein CsoS1C. *Acta Crystallogr.* D65:980-8

- Tsuprun VL, Samsonidze TG, Radukina NA, Pushkin AV, Evstigneeva ZG, Kretovich WL (1980). Electron microscopy of glutamine synthetase from pea leaf chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 626:1-4
- Unno H, Uchida T, Sugawara H, Kurisu G, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H, Hase T, Kusunoki M (2006). Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J. Biol. Chem.* 281:29287-96
- Valladares A, Montesinos ML, Herrero A, Flores E (2002). An ABC-type, high-affinity urea permease identified in cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 43:703-15
- Valladares A, Muro-Pastor AM, Herrero A, Flores E (2004). The NtcA-dependent P1 promoter is utilized for *glnA* expression in N₂-fixing heterocysts of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 186:7337-43
- van den Heuvel RH, Curti B, Vanoni MA, Mattevi A (2004). Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 669-81
- van Rooyen JM, Abratt VR, Sewell BT (2006). Three-dimensional structure of a type III glutamine synthetase by single-particle reconstruction. *J. Mol. Biol.* 361:796-810
- Vanoni MA, Curti B (2008). Structure-function studies of glutamate synthases: a class of self-regulated iron-sulfur flavoenzymes essential for nitrogen assimilation. *IUBMB Life.* 60:287-300
- Vázquez-Bermúdez MF, Flores E, Herrero A (2002a). Analysis of binding sites for the nitrogen-control transcription factor NtcA in the promoters of *Synechococcus* nitrogen-regulated genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1578:95-8
- Vázquez-Bermúdez MF, Paz-Yepes J, Herrero A, Flores E (2002b). The NtcA-activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Microbiology* 148:861-9
- Vega-Palas MA, Madueño F, Herrero A, Flores E (1990). Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 172:643-7
- Vioque A (1992). Analysis of the gene encoding the RNA subunits of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic. Acids. Res.* 20:6331-7
- Wang J, Kamtekar S, Berman AJ, Steitz TA (2005a). Correction of X-ray intensities from single crystals containing lattice-translocation defects. *Acta Crystallogr.* D61:67-74

- Wang J, Rho SH, Park HH, Eom SH (2005b). Correction of X-ray intensities from an HsIV-HsIU co-crystal containing lattice-translocation defects. *Acta Crystallogr.* D61:932-41
- Wang Q, Li H, Post AF (2000). Nitrate assimilation genes of the marine diazotrophic, filamentous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain WH9601. *J. Bacteriol.* 182:1764-7
- Woese CR (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-71
- Wolk CP, Thomas J, Shaffer PW, Austin SM, Galonsky A (1976). Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 251:5027-34
- Wolk CP, Vonshak A, Kehoe P, Elhai J (1984). Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1561-5
- Woolfolk CA, Shapiro B, Stadtman ER (1966). Regulation of glutamine synthetase. I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 116:177-92
- Woolfolk CA, Stadtman ER (1967). Regulation of glutamine synthetase. 3. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 118:736-55
- Yanchunas J, Dabrowski MJ, Schurke P, Atkins WM (1994). Supramolecular self-assembly of *Escherichia coli* glutamine synthetase: characterization of dodecamer stacking and high order association. *Biochemistry* 33:14949-56
- Ziegler K, Stephan DP, Pistorius EK, Ruppel HG, Lockau W (2001). A mutant of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 lacking cyanophycin synthetase: growth properties and ultrastructural aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 196:13-8
- Zhu X, Xu X, Wilson IA (2008). Structure determination of the 1918 H1N1 neuraminidase from a crystal with lattice-translocation defects. *Acta Crystallogr.* D64:843-50

ANEXOS

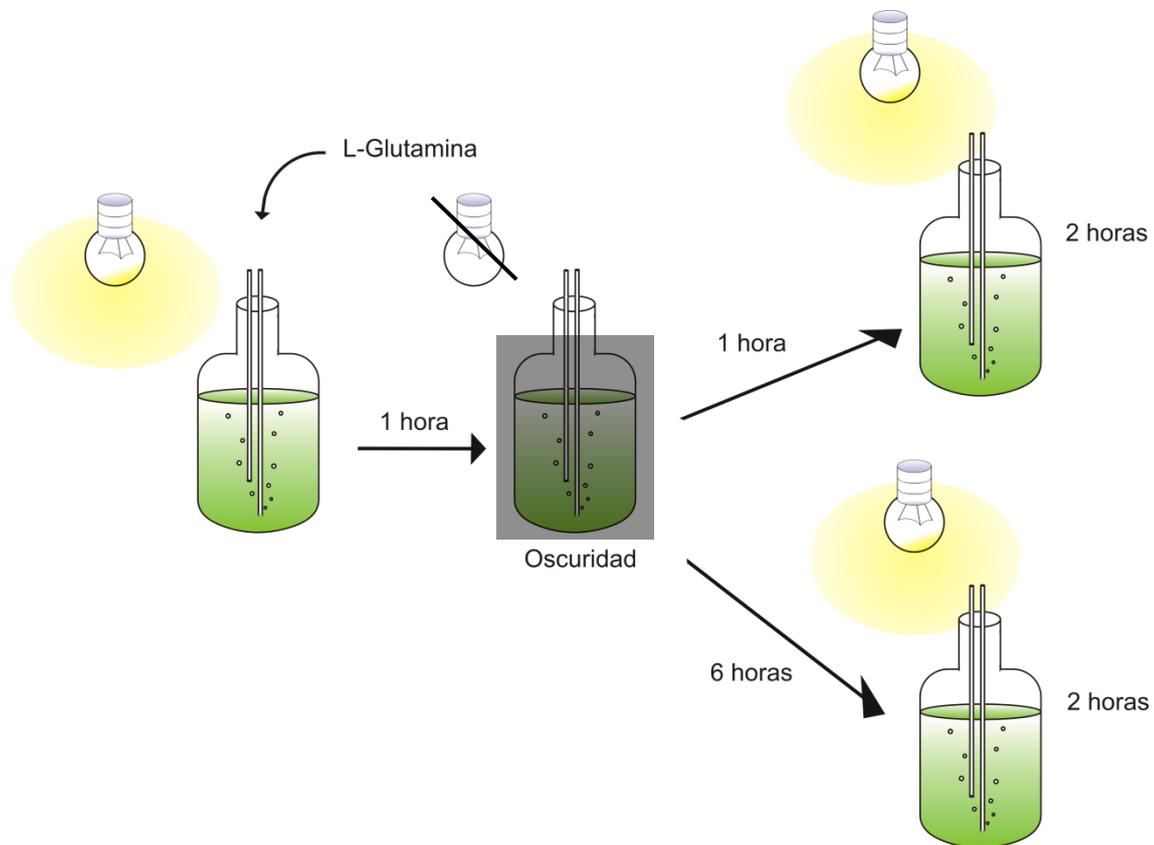
ANEXO 2



Anexo 2. Esquema de la metodología utilizada para el estudio de la estabilidad de IF17 exógeno en extractos crudos de células de la estirpe SLIF ($\Delta gifA\Delta gifB$) en diferentes pH.

Inactivación y reactivación *in vitro* de la GS presente en extractos crudos de la estirpe SLIF de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con proteína pura IF17 o IF17-ABC, a pH 7 o pH 8.5. Se obtuvo el extracto crudo de la estirpe SLIF cultivada en medio BG11C en condiciones estándar en fase exponencial de crecimiento. Este extracto fue dividido en dos alícuotas, una de ellas se mantuvo al pH original (pH 7) y la segunda se equilibró a pH 8.5. A cada una de las alícuotas se le añadió una cantidad fija de proteína pura IF17 ó IF17-ABC. La cantidad de proteína utilizada fue la necesaria para alcanzar el mismo grado de inactivación de la GSI con ambas versiones de IF17. Por último, las alícuotas se incubaron durante 8 horas a temperatura ambiente y se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar la actividad GS y analizar la acumulación de IF y la interacción de éste con la GSI mediante ensayos de Western blot.

ANEXO 3



Anexo 3. Metodología utilizada para analizar el efecto de la glutamina y la oscuridad en la actividad GS de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y las estirpes SIF y LIF, carentes de IF7 e IF17, respectivamente.

Se cultivaron células de *Synechocystis* silvestre y mutantes en un medio BG11C al que se le añadió L-glutamina hasta una concentración de 1 mM. Después de una hora, fueron sometidas a un periodo de oscuridad (1 hora en el caso de la reactivación rápida; o 6 horas en el caso de la reactivación lenta). Tras este periodo, se reiluminaron los cultivos. Se tomaron muestras a distintos tiempos a lo largo de toda la cinética para su análisis posterior.

ANEXO 1

```

IF171h Thermos.      MTMKTTLTYRGVQYDVVPPAVLTEATDVVAKYRGWNVHCTHAVNPPAQPV-RDLIYRGVAYRTGAEAVNTTATAAANTAS-EVNMPALDNQLSRVILYHHQVIKNREQSLLTRMIAQMGLP-AAAGHYWNQIQGKIKPHIWTSYDRSPATMS 152
IF172h Thermos.      ---MTTLTYRGVQYNVVPAINTQATDVVAKYRGSTYRVSPAMQPTEESL-KVMTYRGVKYQKGKPPAGVPAARLADPVAS-VP--PMATVNEMARSLAMAHHEMIKSREQTLLARMATAIGLP-VSAAHYWQQIQGKVNPALAASYNRSYVALS 147
IF17h S. JA-3-3Ab    ---MELSYRGVGYTHSPATVTVSPGKVGGRYGLDWRFRHLSKPVVLPTKLDLLYRGAYRSEAAAAPAQTVQTAEAPAP---GRSHVLDELARRLMMGHQRAIRVRQQAMLVRGTERVGLQ-ANVRNFWNRIQGKVHPTFRLTYDRSRVSMS 146
IF17h S. JA-2-3Ba    ---MALFYRGVDYTPSSATAAVSPGKVGGRYGLDWRFRHLSKPVVLPTNLDLLYRGVAHHLKAAEGPAQPVQTAEASAPVAANGRSHVLDELSRRLMMSHQRLIRIRQQSMLRGTEQIGLH-VNVRNFWNRIQGKVHPTFRLNYDRSRVSMS 150
IF17 PCC 6803        ---MQLSYRGVKYDYNPPKVETEVLGLACSYRGLDYRFRRTTTKNVIQPNVNLYRGVSFN--PAQDLQPELYTANKKVEVAAAPSQISFQDRVRARLHSKTQAIKKRQSLLVRLAEEIGLSGDQAVNSAVRIQGKVLANFRSDYASQGVAMS 149
IF7 PCC 6803         -----MSTQQQARALMMRHHQFIKNRQSMLSRAAAEIGV--EAEKDFWTTVQGKPQSSFRTYDRSNASLS 65
IF7h Cyanothec     -----MSTQQQARALMMRHHQMVKNRQSMLGRAASEIGV--DVETDYWTTIQGKPCSGFRSYDRSNAAMS 65
IF71h Lyngbya      -----MGTEDQARALMMRHHLIKNRQSMLNRTADEVGL--EAG-NYWNHIQGKPHPTFSQNYDRSNASMS 64
IF72h Lyngbya      -----MGTQDQARSLMMRHHMMVKNRQQAMLNRVADEVGI--EVG-DYHSTIQGKPTESFRSYDRSHASMS 64
IF7h PCC 7120        -----MSIQEKSRAIMMROYQQVKNRQSMLMRSAQELGLPAEELSHYWNPTQGKIDPTTRTYGRSNASMS 67
IF7h Nodularia     -----MSIQDRTRALAMROYQQVKNRQSMLMRAAQELGLP-EELAEYWSPLQGKIDPTTRTYESSHASMS 66
IF7h N.punctiforme  -----MVMSIADKSRALMVREHQQVKNRQSMLMRAAQELGLP-EEVSHYWNPIQGKVDASSRMIYGSHASMS 68
IF7h PCC 6301        -----MNTTTQSRELVMRHQQAIKNRQSMLGRANVDIGMPLSQMRHYNGTIQGKVHSDFRAAYDRSGAALS 67

```

Anexo 1. Alineamiento de proteínas homólogas a IF7 e IF17.

Los residuos conservados en 7 ó más secuencias homólogas a IF7 y a la zona carboxilo terminal de IF17, ambas de *Synechocystis* sp. PCC 6803, están marcados en rojo. Igualmente, los residuos conservados en 3 o más secuencias homólogas a la zona amino terminal de IF17 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 están marcados en rojo. Consideramos conservados los aminoácidos idénticos o los cambios isoleucina/leucina, glutamato/aspartato, arginina/lisina y serina/treonina. Los residuos idénticos en todas las secuencias están sombreados en gris. IF17: proteínas homólogas a IF17 de *Synechocystis*, denominada aquí como IF17 PCC 6803; IF7: proteínas homólogas a IF7 de *Synechocystis*, denominada aquí como IF7 PCC 6803; *Thermos.*, *Thermosynechococcus elongatus*; *S. JA-3-3Ab* y *JA-3-3Ba*, *Synechococcus JA-3-3Ab* y *JA-3-3Ba*, respectivamente; PCC 7120, *Anabaena* sp. PCC 7120; *N. punctiforme*, *Nostoc punctiforme*; PCC 6301, *Synechococcus elongatus* sp. PCC 6301.