UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 154 número 260 del libro
correspondiente.
Sevilla, 22 SET. 1993
El Jefe del Negociado de Tesis,

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en el Dpto. Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Facultad de Biología de esta Universidad desde el día 28-9-93
hasta el día 15-10-93
Sevilla 15 de Octubre de 1993
EL DIRECTOR DE

ISOCITRATO DESHIDROGENASA DE CIANOBACTERIAS: PURIFICACION, CARACTERIZACION Y CLONACION DEL GEN *icd*

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

Sevilla, Noviembre de 1992

Director:

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

R. 12743

TD
298

BIOQUIMICA VEGETAL
Y BIOLOGIA MOLECU
TD
298

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Dña María Isabel Muro-Pastor

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- X Consulta en depósito.
- X Préstamo interbibliotecario.
- X Reproducción parcial.
- X Reproducción total.
- X Tipo de Usuarios.
- X Otros términos.

Firmado:

Sevilla, a 9 de Marzo de 1995

A mi madre

A mi hermana Alicia y a José Carlos, sin duda los que mas me han ayudado siempre en todo.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla e Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Al Director del centro, el Prof. Miguel García Guerrero y al resto de los miembros del mismo les agradezco su acogida durante estos años y al Dr. F. Javier Florencio el haberme permitido formar parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. F. Javier Florencio le agradezco especialmente su constante aportación de ideas así como su continuo estímulo durante el desarrollo de este trabajo. El apoyo incondicional y la confianza que siempre me ha manifestado han sido fundamentales en los momentos más críticos de la realización del trabajo. Deseo agradecerle igualmente todo lo que humana y científicamente he aprendido de su trato diario a lo largo de estos años.

A los miembros de nuestra «comunidad científica»: Sebastián Chávez, José Carlos Reyes y Paco Navarro, les agradezco el haberme proporcionado un ambiente grato de trabajo, así como su contribución en la obtención de parte de los resultados aquí presentados. Al Dr. Sebastián Chávez le agradezco concretamente el haber sido «mi hermano mayor» y su fundamental aportación a mi formación teórica y práctica.

A mis compañeros de trabajo, becarios, protobecarios etc. les agradezco todo lo que a lo largo de estos años han compartido conmigo y especialmente a Mª Cruz, Jesús, Ignacio, Rocío, Antonio, Mª Luz y J. Enrique el haberme levantado el ánimo en numerosas ocasiones y el que con su compañía me hayan hecho agradable el trabajo en el laboratorio.

A los Dres. Enrique Flores y Antonia Herrero les agradezco el trato afectuoso y el apoyo que siempre me han dispensado así como su contribución a mi formación científica. Quisiera recordar en este sentido a la Dra. García de la Vega, con quien di mis primeros pasos en el laboratorio. Al Dr. Agustín Vioque le agradezco sus sabios consejos y el que me permitiera utilizar la genoteca de Anabaena sp. PCC 7120, fundamental en la obtención de parte de los resultados aquí presentados. Al Dr. Pedro Candau su trato cordial y su amable respuesta a mis preguntas.

Al Prof. Pierre Gadal le agradezco el haberme aceptado en su grupo de investigación, durante una estancia corta en el Laboratoire de Physiologie Végétale Moléculaire de Orsay, Francia. Al Dr. Jean Vidal, Evelyne Bismuth, Susana Gálvez y Binh Nguyen-quoc les agradezco su acogida y ayuda, que hicieron fructífera mi estancia en su laboratorio. Al Dr. Vidal le agradezco especialmente su comprensión y su inestimable colaboración en la obtención del antisuero empleado en este trabajo.

A Antonia, Pepa, Nela y Reyes les agradezco su trato cordial y su colaboración en los asuntos burocráticos, y especialmente a Nela el haber resuelto la mayoría de ellos.

A Lourdes Garnica le agradezco el haberme transmitido el interés por la biología así como su apoyo y amistad.

A mis amigos Julio, Manolo, Marcos, Chema, Carolina y Belén gracias por vuestra compañía.

A mis hermanos Alicia, Rocío y Quique os agradezco vuestra ayuda y vuestra comprensión.

Por último quiero agradecer muy especialmente a mi madre sus innumerables esfuerzos y sacrificios que me han permitido llevar a cabo mis estudios en Ciencias.

Este trabajo ha sido financiado mediante ayudas a la investigación concedidas por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y la Junta de Andalucía y mediante una beca del Plan de Formación de Profesorado y Personal Investigador (MEC).

INDICE

INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DETABLAS	x
ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUCCION	1
1.1. LAS CIANOBACTERIAS	3
1.1.1. Características generales de las cianobacterias	4
1.1.2. Aportación de esqueletos carbonados para la asimilación de amonio en cianobacterias. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos.	4
1.2. LAS ISOCITRATO DESHIDROGENASAS	7
1.2.1. Características generales de las isocitrato deshidrogenasas	7
1.2.2. Tipos de isocitrato deshidrogenasas y distribución	8
1.2.2.1. NAD-isocitrato deshidrogenasas	9
1.2.2.2. NADP-isocitrato deshidrogenasas	10
1.2.3. Función de las isocitrato deshidrogenasas en los distintos organismos	11
1.2.4. Regulación de la NADP-IDH de *Escherichia coli*	13
1.2.5. La isocitrato deshidrogenasa en cianobacterias	15
1.3. OBJETIVOS DE ESTE ESTUDIO Y ORGANISMOS EMPLEADOS	16
2. MATERIALES Y METODOS	19
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	21
2.1.1. Cianobacterias	21
2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas	21
2.1.1.2. Cultivo de cianobacterias en medio líquido	21
2.1.1.3. Cultivo de cianobacterias en medio sólido	24
2.1.1.4. Curvas de crecimiento	24
2.1.2. *Escherichia coli*	25
2.1.2.1. Estirpes de *E. coli* utilizadas	25
2.1.2.2. Cultivo de *E. coli*	25
2.1.3. Métodos de recogida de células	27
2.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NADP-IDH	28
2.3. METODOS DE PURIFICACION Y ANALISIS DE PROTEINAS	28
2.3.1. Preparación de extractos celulares	28
2.3.2. Técnicas cromatográficas	29
2.3.2.1. Cromatografía de intercambio iónico	29
2.3.2.2. Cromatografía en gel de Red-agarosa	29
2.3.2.3. Cromatografía en gel de Fenil-Sefarosa	30

2.3.2.4. Cromatoenfoque. 30
2.3.2.5. Cromatografía de filtración en gel 30
2.3.3. Electroforesis de proteínas 31
2.3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes 31
2.3.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS 31
2.3.3.3. Tinción de proteína en geles de poliacrilamida 32
2.3.3.4. Detección de actividad isocitrato deshidrogenasa en geles de poliacrilamida 32
2.3.3.5. Isoelectroenfoque 33
2.3.4. Técnicas inmunológicas 33
2.3.4.1. Obtención de antisuero de conejo anti-NADP-IDH de *Synechocystis* sp. PCC 6803 33
2.3.4.2. Inmunoprecipitación de actividad IDH con antisuero anti-NADP-IDH 34
2.3.4.3. Detección de IDH en geles de poliacrilamida mediante Western blot 34
2.3.5. Concentración de proteínas por ultrafiltración 35
2.3.6. Eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones proteicas 35
2.3.7. Determinación del espectro de dicroísmo circular 36
2.3.8. Determinación de la secuencia NH_2-terminal de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 36
2.4. METODOS DE MANIPULACION Y ANALISIS DE ADN Y ARN *in vitro* 36
2.4.1. Plásmidos y genoteca utilizados 36
2.4.2. Aislamiento y análisis de ADN y ARN 36
2.4.2.1. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico de *E. coli* 36
2.4.2.2. Aislamiento de ADN total de cianobacterias 38
2.4.2.3. Aislamiento de ARN total de cianobacterias 38
2.4.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa 39
2.4.2.5. Electroforesis de ARN en geles de agarosa 39
2.4.2.6. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa 40
2.4.2.7. Transferencia de ADN a filtros de nylon 40
2.4.2.8. Transferencia de ARN a filtros de nylon 40
2.4.2.9. Detección de secuencias de ADN mediante hibridación con sondas radiactivas 40
2.4.2.10. Detección de ARN_m mediante hibridación con sondas de ADN radiactivas 41
2.4.2.11. Detección de secuencias de ADN plasmídico de *E. coli in situ* mediante hibridacióncon sondas radiactivas 41
2.4.3. Manipulaciones enzimáticas del ADN 42
2.4.3.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción 42

2.4.3.2. Defosforilación de plásmidos con fosfatasa alcalina 42
2.4.3.3. Obtención de extremos romos a partir de fragmentos de ADN con extremos protuberantes 43
2.4.3.4. Ligación de fragmentos de ADN 43
2.4.3.5. Marcaje radiactivo de fragmentos de ADN 43
2.4.4. Secuenciación de ADN 43
2.4.4.1. Obtención de deleciones seriadas de fragmentos de ADN mediante digestión con exonucleasa III 43
2.4.4.2. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea-poliacrilamida. Autorradiografía de geles 44
2.5. METODOS DE TRANSFERENCIA DE ADN 45
2.5.1. Transferencia de ADN a *E. coli* mediante transformación 45
2.5.2. Transferencia de ADN a *Synechocystis* mediante transformación 46
2.5.3. Transferencia de ADN a *Anabaena* mediante conjugación con *E. coli*. Obtención de mutantes *icd* de *Anabaena* 46
2.6. OTROS METODOS ANALITICOS 47
2.6.1. Determinación de clorofila 47
2.6.2. Determinación de proteína 48
2.6.2.1. Determinación de proteína en células enteras 48
2.6.2.2. Determinación de proteína en preparaciones libres de células 48
2.6.3. Cuantificación de ADN 48
2.6.4. Determinaciones espectrofotométricas 48
2.6.5. Medidas de pH 49
2.6.6. Medidas de intensidad luminosa 49
2.6.7. Medidas de flujos gaseosos 49
2.6.8. Determinación de la concentración salina 49
2.7. TRATAMIENTO INFORMATICO DE SECUENCIAS DE ADN Y PROTEINAS 49

3. RESULTADOS 51

3.1. PURIFICACION DE LA NADP-IDH DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 53
3.1.1. Cromatografía en DEAE-celulosa 53
3.1.2. Cromatografía en Red-agarosa 1 53
3.1.3. Cromatografía en Red-agarosa 2 54
3.1.4. Cromatografía en Fenil-Sefarosa 55
3.2. PURIFICACION DE LA NADP-IDH DE *Anabaena* sp. PCC 7120 58
3.3. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA NADP-IDH DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 58
3.3.1. Tamaño y estructura molecular 58

3.3.1.1. Determinación de la masa molecular en condiciones desnaturalizantes 60
3.3.1.1. Determinación de la masa molecular en condiciones nativas 60
3.3.2. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad 61
3.3.3. Punto isoeléctrico 62
3.3.4. Espectro de dicroísmo circular 62
3.3.5. Secuenciación del extremo amino terminal de la proteína 63
3.4. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA NADP-IDH DE *Anabaena* sp. PCC 7120 64
3.4.1. Tamaño y estructura molecular 64
3.4.1.1. Determinación de la masa molecular en condiciones desnaturalizantes 64
3.4.1.2. Determinación de la masa molecular en condiciones no desnaturalizantes 65
3.4.2. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad 65
3.4.3. Punto isoeléctrico 67
3.5. COMPARACION FISICOQUIMICA DE LAS DOS NADP-IDHs PURIFICADAS 67
3.6. CARACTERIZACION CINETICA DE LA NADP-IDH DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 69
3.6.1. Efecto del pH 70
3.6.2. Constantes de Michaelis-Menten (K_m) 70
3.6.3. Efecto de diversos metabolitos sobre la NADP-IDH 71
3.7. CARACTERIZACION CINETICA DE LA NADP-IDH DE *Anabaena* sp. PCC 7120 72
3.7.1. Efecto del pH 70
3.7.2. Constantes de Michaelis-Menten (K_m) 74
3.7.3. Ensayo de diferentes cationes como cofactores de la IDH 75
3.7.4. Efecto de diversos metabolitos sobre la NADP-IDH 76
3.8. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES Y DE LA FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LOS NIVELES DE LA ACTIVIDAD NADP-IDH DE *Synechocystis* 80
3.8.1. Niveles de actividad NADP-IDH a lo largo del crecimiento en diferentes condiciones de cultivo 80
3.8.2. Influencia de la oscuridad y de la ausencia de CO_2 sobre la actividad NADP-IDH 82
3.8.3. Influencia de la ausencia de fuente nitrogenada sobre la actividad y la cantidad de NADP-IDH presente en *Synechocystis* 82
3.9. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA

NADP-IDH DE *Anabaena* 84
3.10. CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA NADP-IDH (*icd*) DE *Anabaena* 86
3.10.1. Clonación y expresión en *E. coli* del gen *icd* de *Anabaena* 86
3.10.2. Localización del gen *icd* dentro del fragmento de ADN clonado 91
3.10.3. Secuenciación y análisis del inserto de pMA3 que contiene el gen *icd* 92
3.11. CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA NADP-IDH (*icd*) DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 96
3.11.1. Detección de hibridación heteróloga entre el gen *icd* de *Anabaena* y el ADN genómico de *Synechocystis* 96
3.11.2. Clonación del gen *icd* de *Synechocystis* mediante el aislamiento de fragmentos de ADN que presentan hibridación con el gen *icd* de *Anabaena* 96
3.11.3. Localización del gen *icd* de *Synechocystis* en los fragmentos clonados y secuenciación de los mismos 99
3.12. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS GENES *icd* DE *Anabaena* y *Synechocystis*, COMPARACION CON OTROS GENES DE ISOCITRATO DESHIDROGENASAS 103
3.12.1. Alineamiento de las secuencias y similitud entre las diferentes IDHs 103
3.12.2. Análisis comparativo de las NADP-IDHs de *Anabaena* y *Synechocystis* a partir de sus secuencias 107
3.13. INFLUENCIA DE LA AUSENCIA DE FUENTE NITROGENADA SOBRE LA CANTIDAD DE ARN_m DEL GEN *icd* PRESENTE EN *Synechocystis* 109
3.14. GENERACION DE MUTANTES *icd* DE *Anabaena* sp. PCC 7120 Y CARACTERIZACION DE LOS MISMOS 110
3.14.1. Construcción de plásmidos con una versión inactivada del gen *icd* y transferencia de los mismos a *Anabaena* mediante conjugación 111
3.14.2. Análisis de la estructura cromosómica de la estirpe MA1 114
3.14.3. Estudio del proceso de segregación y el crecimiento de la estirpe MA1 en diferentes medios de cultivo 116
3.15. GENERACION DE MUTANTES *icd* DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 122
3.15.1. Construcción de plásmidos portadores de versiones inactivadas del gen *icd* y transferencia de los mismos a *Synechocystis* mediante transformación 122
3.15.2. Análisis de la estructura cromosómica de las estirpes mutantes obtenidas 124
3.15.3. Actividad NADP-IDH de las estirpes mutantes obtenidas 126

4. DISCUSION 127

4.1. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS NADP-IDHs DE *Synechocystis* 6803 Y *Anabaena* 7120 129
4.2. CLONACION Y ANALISIS DEL GEN *icd* DE *Synechocystis* 6803 Y *Anabaena* 7120 132
4.3. PAPEL FISIOLOGICO DE LA IDH DE *Synechocystis* 6803 Y *Anabaena* 7120 137

5. CONCLUSIONES 143

6. BIBLIOGRAFIA 147

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Esquema de las principales rutas metabólicas de asimilación de carbono y nitrógeno en cianobacterias.	6
FIGURA 2.	Complejo del metal-isocitrato en el sitio activo de la IDH.	8
FIGURA 3.	Ciclos de Krebs y del glioxilato que operan en *E. coli*.	14
FIGURA 4.	Imágenes de las cianobacterias empleadas en este trabajo al microscopio óptico utilizando la técnica de contraste de fases.	17
FIGURA 5.	Perfil de elución de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 en cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.	54
FIGURA 6.	Perfil de elución de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 en cromatografía de Red-agarosa.	55
FIGURA 7.	Perfil de elución de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 en cromatografía hidrofóbica de Fenil-sefarosa.	56
FIGURA 8.	Patrones electroforéticos de proteínas a lo largo de la purificación de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803.	57
FIGURA 9.	Patrones electroforéticos de proteínas a lo largo de la purificación de la NADP-IDH de *Anabaena* 7120.	59
FIGURA 10.	Determinación de la masa molecular de la IDH de *Synechocystis* 6803 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.	60
FIGURA 11.	Determinación de la masa molecular de la IDH de *Synechocystis* 6803 en estado nativo mediante cromatografía de filtración en gel.	61
FIGURA 12.	Inactivación térmica de la isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* 6803.	62
FIGURA 13.	Determinación del pI de las NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 mediante isoelectroenfoque.	63
FIGURA 14.	Espectro de dicroísmo circular de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803.	64
FIGURA 15.	Determinación de la masa molecular de la IDH de *Anabaena* 7120 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.	65
FIGURA 16.	Determinación de la masa molecular de la IDH de *Anabaena* 7120 en estado nativo mediante cromatografía de filtración en gel.	66
FIGURA 17.	Inactivación térmica de la isocitrato deshidrogenasa de *Anabaena* 7120.	66
FIGURA 18.	Movilidad electroforética en condiciones no desnaturalizantes de las IDHs purificadas de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120.	68
FIGURA 19.	Curvas de inmunotitulación de las NADP-IDHs purificadas de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120.	69
FIGURA 20.	Efecto del pH sobre la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803.	70

FIGURA 21. Inhibición no competitiva de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 por 2-oxoglutarato (A) y ADP (B). 73
FIGURA 22. Efecto del pH sobre la actividad NADP-IDH de *Anabaena* 7120. 74
FIGURA 23. Efecto del Mg^{2+} sobre la actividad NADP-IDH de *Anabaena* 7120. Representación de Hofstee. 76
FIGURA 24. Inhibición competitiva de la NADP-IDH de *Anabaena* 7120 por oxalacetato + glioxilato (A) y por NADPH (B). 79
FIGURA 25. Evolución de la actividad NADP-IDH en células de *Synechocystis* 6803 cultivadas fotoautotróficamente con amonio o con nitrato como fuente de nitrógeno. 80
FIGURA 26. Evolución de la actividad NADP-IDH en células de *Synechocystis* 6803 cultivadas mixotróficamente con amonio o con nitrato como fuente de nitrógeno. 81
FIGURA 27. Influencia de la ausencia de fuente nitrogenada sobre la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803. 83
FIGURA 28. Cuantificación mediante Western blot de la NADP-IDH presente en células de *Synechocystis* 6803 sometidas a hambre de nitrógeno. 84
FIGURA 29. Cuantificación mediante Western blot de la NADP-IDH presente en células de *Anabaena* 7120 cultivadas en diferentes fuentes de nitrógeno. 85
FIGURA 30. Esquema del proceso de clonación del gen *icd* de *Anabaena* 7120 por complementación de la estirpe DEK 2004 de *E. coli*, auxótrofa para el glutamato. 87
FIGURA 31. Mapa de restricción del inserto de ADN de *Anabaena* 7120 contenido en el plásmido pMA1, así como de los subclones derivados del mismo. 88
FIGURA 32. (A) Movilidad electroforetica, en condiciones no desnaturalizantes, de la actividad NADP-IDH en extractos crudos de clones de *E. coli* que expresan el gen *icd* de *Anabaena* 7120 y de un extracto crudo de esta cianobacteria. (B) Tinción de proteinas con azul de Coomassie de las muestras de extractos crudos cuya actividad NADP-IDH se muestra en A. 89
FIGURA 33. Movilidad electroforética, en condiciones no desnaturalizantes, de la actividad NADP-IDH de *Anabaena* y *E. coli*. 90
FIGURA 34. Inmunotitulación de la actividad NADP-IDH de *Anabaena* y *E. coli* con anti-IDH de *Synechocystis* 6803. 91
FIGURA 35. Plásmidos conteniendo deleciones seriadas del inserto del plásmido pMA3 obtenidos mediante digestión con exonucleasa III. 92
FIGURA 36. Estrategia seguida para la secuenciación del fragmento de ADN de *Anabaena* 7120 que contiene el gen *icd*. 93
FIGURA 37. Análisis de las posibles fases de lectura abierta existentes en el

fragmento de ADN de *Anabaena* 7120 que contiene el gen *icd*. 94
FIGURA 38. Secuencia nucleotídica del fragmento de ADN de *Anabaena* que contiene el gen *icd*. 95
FIGURA 39. Hibridación de ADN total de *Synechocystis* 6803 con una sonda del gen *icd* de *Anabaena*. 97
FIGURA 40. Esquema del proceso de clonación de fragmentos de ADN cromosómico mediante construcción de una subgenoteca. 98
FIGURA 41. Mapa de restricción de los insertos de ADN de *Synechocystis* contenidos en los plásmidos pMS1 y pMS2. 99
FIGURA 42. Análisis de las posibles fases de lectura abierta existentes en los fragmentos de ADN de *Synechocystis* 6803 secuenciados. 100
FIGURA 43. Secuencia nucleotídica de los fragmentos de ADN de *Synechocystis* que contienen el gen *icd*. 102
FIGURA 44. Alineamiento de secuencias de isocitrato deshidrogenasas. 104
FIGURA 45. Arbol evolutivo de las isocitrato deshidrogenasas. 107
FIGURA 46. Perfiles de hidrofobicidad de las NADP-IDHs de *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *E. coli*. 108
FIGURA 47. Hibridación de ARN total de *Synechocystis* 6803 con una sonda de ADN interna al gen *icd* de este mismo organismo. 110
FIGURA 48. Esquema del proceso de construcción de los plásmidos empleados en la generación de mutantes *icd* de *Anabaena* 7120. 112
FIGURA 49. Esquema del proceso de mutagénesis empleado en *Anabaena* 7120 utilizando la letalidad condicional del gen *sacB* de *B. subtilis* para esta cianobacteria. 113
FIGURA 50. Estructura cromosómica de la estirpe MA1 de *Anabaena* sp. PCC 7120. 115
FIGURA 51. Cuantificación mediante Western blot de la NADP-IDH presente en la estirpe MA1 cultivada en diferentes condiciones nutricionales. 117
FIGURA 52. Curvas de crecimiento de las estirpes AMP2 y MA1 en diferentes condiciones de cultivo. 120
FIGURA 53. Imagen de los filamentos de las estirpes MA1 (A) y AMP2 (B) al microscopio óptico utilizando la técnica de campo claro. 121
FIGURA 54. Esquema del proceso de construcción de los plásmidos empleados en la generación de mutantes *icd* de *Synechocystis* 6803. 123
FIGURA 55. Estructura cromosómica de las estirpes mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803. 124
FIGURA 56. Esquema de las principales rutas metabólicas del heterocisto y donación de electrones a la nitrogenasa. 141

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo.	21
TABLA 2.	Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo.	25
TABLA 3.	Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.	37
TABLA 4.	Purificación de la NADP-isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803.	57
TABLA 5.	Purificación de la NADP-isocitrato deshidrogenasa de *Anabaena* sp. PCC 7120.	59
TABLA 6.	Parámetros fisicoquímicos de las IDHs de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120.	67
TABLA 7.	Constantes de Michaelis-Menten (K_m) de la isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803.	71
TABLA 8.	Efecto de diversos metabolitos sobre la actividad isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803.	72
TABLA 9.	Constantes de Michaelis-Menten (K_m) de la isocitrato deshidrogenasa de *Anabaena* sp. PCC 7120.	75
TABLA 10.	Ensayo de diferentes cationes mono y divalentes como cofactores de la IDH de *Anabaena* sp. PCC 7120.	77
TABLA 11.	Efecto de diversos metabolitos sobre la actividad isocitrato deshidrogenasa de *Anabaena* sp. PCC 7120.	78
TABLA 12.	Influencia de la oscuridad y la ausencia de CO_2 sobre la actividad NADP-IDH de *Synechocystis*.	82
TABLA 13.	Actividad NADP-IDH en estirpes de *E. coli* que expresan el gen *icd* de *Anabaena* 7120.	88
TABLA 14.	Identidades entre las secuencias de aminoácidos de las isocitrato deshidrogenasas.	106
TABLA 15.	Actividad NADP-IDH de la estirpe MA1 en diferentes medios de cultivo.	117
TABLA 16.	Actividad NADP-IDH de las estirpes AMP2 y MA1 en diferentes medios de cultivo.	118
TABLA 17.	Actividad NADP-IDH de las estirpes mutantes y silvestre de *Synechocystis*.	126

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

Ax	Absorbancia (a una longitud de onda de x nm)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
Apr	Resistencia a la ampicilina
ARN	Acido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
bisacrilamida	N, N',-bis-metilén-acrilamida
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
Ci	Curio
Cmr	Resistencia al cloranfenicol
CoA	Coenzima A
CS	Citrato sintasa
dCTP	Desoxicitidín-5'-trifosfato
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Acido etilén-diamino-tetraacético
etidio	3,8-diamino-6-etil-5-fenil fenantridio
FNR	Ferredoxina NADP oxidorreductasa
FPLC	Rápida cromatografía líquida de proteínas
g	Aceleración de la gravedad terrestre
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
h	Hora
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IMDH	Isopropilmalato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil-b-D-tiogalactopiranósido
kb	Miles de pares de bases
Ki	Constante de inhibición enzimática
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
min	Minuto
MOPS	Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MTT	Bromura de 3-(4, 5-Dimetil-tiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NAD-IDH	Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado

NADP-IDH	Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
NmR	Resistencia a la neomicina (sulfato)
ORF	Zona de lectura abierta
pb	Pares de bases
PCC	Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
pI	Punto isoeléctrico
PMS	Fenazina metosulfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p/v	Relación peso/volumen
prot.	Proteína
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Laurilsulfato sódico
SmR	Resistencia a la estreptomicina
SmS	Sensibilidad a la estreptomicina
SpR	Resistencia a la espectinomicina
SpS	Sensibilidad a la espectinomicina
sacR	Resistencia a la sacarosa
sacS	Sensibilidad a la sacarosa
Tcr	Resistencia a la tetraciclina
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletiléndiamina
TES	Acido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
U	Unidad de actividad enzimática
UV	Luz ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranósido

Bases nitrogenadas

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timina

Aminoácidos

A	Ala	alanina	L	Leu	leucina
R	Arg	arginina	K	Lys	lisina

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

1. INTRODUCCION

1.1. LAS CIANOBACTERIAS

1.1.1. Características generales de las cianobacterias

Las cianobacterias constituyen un amplio grupo de procariotas fotosintéticos y al igual que las proclorofitas y las plantas superiores llevan a cabo fotosíntesis oxigénica (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Su aparato fotosintético es muy similar, tanto en el aspecto funcional como en el estructural, al localizado en los cloroplastos de algas y plantas superiores. Las cianobacterias presentan sin embargo pigmentos antena alternativos denominados ficobiliproteínas, que comparten con las algas rojas y carecen por otra parte de clorofila *b* (Sherman *et al.*, 1987). En la actualidad se acepta una relación evolutiva entre las cianobacterias, las proclorofitas y los cloroplastos (Morden y Golden, 1991), este hecho hace de las cianobacterias organismos modelo en estudios de la fotosíntesis.

Dentro de las eubacterias las cianobacterias se encuadran, en función de la estructura y composición de su envuelta celular, en las bacterias Gram (-) (Woese, 1987).

La mayoría de las cianobacterias son fotoautótrofas estrictas, sin embargo algunas de ellas pueden utilizar sustratos orgánicos, bien en mixotrofía, bien en fotoheterotrofía (a la luz pero con el flujo fotosintético no cíclico inhibido), bien en condiciones de absoluta heterotrofía (Rippka *et al.*, 1979).

Dado su caracter fotosintético, las cianobacterias son capaces de utilizar la energía luminosa para generar ATP y poder reductor y asimilar con ellos compuestos inorgánicos de carbono, nitrógeno y azufre.

La fijación del CO_2 se lleva a cabo en estos organismos principalmente mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato, si bien existe una segunda vía de incorporación de CO_2 a través de la fosfoenol piruvato carboxilasa, como se ha demostrado utilizando $^{14}CO_2$ y comprobando su incorporación en aspartato o glutamato (Weathers y Allen, 1978).

Respecto a la fuente de nitrógeno, la generalidad de las cianobacterias son capaces de utilizar el nitrato y el amonio para su crecimiento pero algunas de ellas presentan la capacidad adicional de fijar dinitrógeno (Rippka *et al.*, 1979). Dado que la enzima nitrogenasa, encargada de esta fijación, es extremadamente sensible al oxígeno, para evitar la inactivación de la misma, los procesos de fijación de dinitrógeno y fotosíntesis oxigénica no suelen llevarse a cabo simultáneamente en la misma célula. En algunas cianobacterias la fijación se lleva a cabo en células especializadas denominadas heterocistos donde no tiene lugar desprendimiento de oxígeno fotosintético (Wolk, 1982). En algunas otras cianobacterias se ha observado una separación temporal de los procesos de fijación de dinitrógeno y fotosíntesis oxigénica (Mitsui *et al.*, 1986).

Desde el punto de vista morfológico, las cianobacterias se dividen en dos tipos fundamentales: unicelulares, clasificadas en las secciones I y II según

presenten división por fisión binaria o múltiple, y las filamentosas pertenecientes a las secciones III, IV y V según la clasificación taxonómica mas aceptada (Rippka et al., 1979). La sección III engloba a las cianobacterias filamentosas no formadoras de heterocistos y las secciones IV y V a las que si desarrollan estas células especializadas en la fijación de dinitrógeno, en respuesta a la deficiencia de nitrógeno. De estas cinco secciones, sólo las II, IV y V son sólidas desde el punto de vista filogenético (Giovannoni *et al.*, 1988).

1.1.2. Aportación de esqueletos carbonados para la asimilación de amonio en cianobacterias. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

Las cianobacterias, al igual que algunos organismos metilotrofos y quimiolitotrofos, pertenecen a una categoría de procariotas que presentan un ciclo incompleto de los ácidos tricarboxílicos (Pearce *et al.*, 1969; Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Esta circunstancia incapacita a la generalidad de las cianobacterias para crecer en la oscuridad a expensas de los sustratos normalmente oxidados a través de este ciclo en otros organismos. La carencia de las enzimas 2-oxoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA sintetasa es la responsable de la ausencia de un ciclo de Krebs completo en cianobacterias (Pearce *et al.*, 1969). Alternativamente, la degradación de compuestos orgánicos, azúcares fundamentalmente, se lleva a cabo en cianobacterias a través de la ruta oxidativa de las pentosas-fosfato (Smith, 1982).

Las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que si están presentes en estos organismos, tienen por consiguiente un papel biosintético en la formación de aminoácidos (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). La operatividad de esta ruta metabólica requiere la función anaplerótica de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, la cual es esencial en la síntesis de precursores de aminoácidos pertenecientes a la familia del aspartato y el glutamato y de tetrapirroles (Smith, 1982). Estos dos aminoácidos, sintetizados a partir de oxalacetato y 2-oxoglutarato respectivamente, son los donadores primarios de grupos α-amino en las reacciones de transaminación.

Como se ha mencionado anteriormente, las cianobacterias son capaces de utilizar diferentes formas inorgánicas de nitrógeno como el nitrato, el nitrito, el dinitrógeno o el amonio. La incorporación de todas ellas en los diferentes componentes celulares nitrogenados tiene lugar a partir de la forma mas reducida, amonio, para lo cual son necesarias diferentes etapas reductivas catalizadas por la nitrato y la nitrito reductasa o la nitrogenasa respectivamente.

La asimilación del amonio se lleva a cabo de manera general en cianobacterias mediante la acción secuencial de la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa que constituyen la denominada ruta GS-GOGAT (Meeks *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1978). En este proceso la formación neta de una molécula de glutamato a partir de una de amonio y otra de 2-oxoglutarato requiere una molécula de ATP y dos equivalentes de poder reductor.

El requerimiento de ferredoxina reducida para la actividad de la nitrato y la nitrito reductasa y la glutamato sintasa (GOGAT), hace de la asimilación de amonio en cianobacterias un proceso típicamente fotosintético (Candau *et al.*, 1976; Marqués *et al.*, 1992).

El aporte de 2-oxoglutarato, esqueleto carbonado necesario para la síntesis de glutamato por la ruta GS-GOGAT, relaciona directamente la asimilación de nitrógeno con el metabolismo del carbono y mas concretamente con los cetoácidos provenientes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

Con respecto a las interacciones C/N, el efecto que la asimilación de nitrato o de amonio ejerce sobre el flujo de carbono y el recambio de aminoácidos, ha sido estudiado en varias cianobacterias (Lawrie *et al.*, 1976; Coronil *et al.*, 1993; Ohmori *et al.*, 1989). La asimilación de nitrógeno estimula en todos los casos el flujo de carbono hacia ácidos orgánicos y aminoácidos en detrimento de la incorporación del carbono fijado fotosintéticamente a carbohidratos. Se produce un aumento de la biosíntesis de aminoácidos *de novo* en equilibrio con su utilización, de forma que el balance de aminoácidos permanece inalterado aumentando sin embargo su recambio (Coronil *et al.*, 1993).

Mediante experimentos de incorporación de ^{14}C en los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos se ha comprobado que el marcaje de citrato y 2-oxoglutarato es superior que el observado en malato y oxalacetato (Lawrie *et al.*, 1976). Este flujo preferencial de carbono por la rama del ciclo cuyo producto final es el 2-oxoglutarato, es consistente con el hecho de que la síntesis de glutamato y glutamina a partir de este cetoácido y a través de la ruta GS-GOGAT constituye la reacción aminante primaria y el núcleo central en la asimilación y distribución del nitrógeno en cianobacterias.

La figura 1 muestra la estrecha relación existente entre la ruta de los ácidos tricarboxílicos y la ruta GS-GOGAT de asimilación de amonio en cianobacterias.

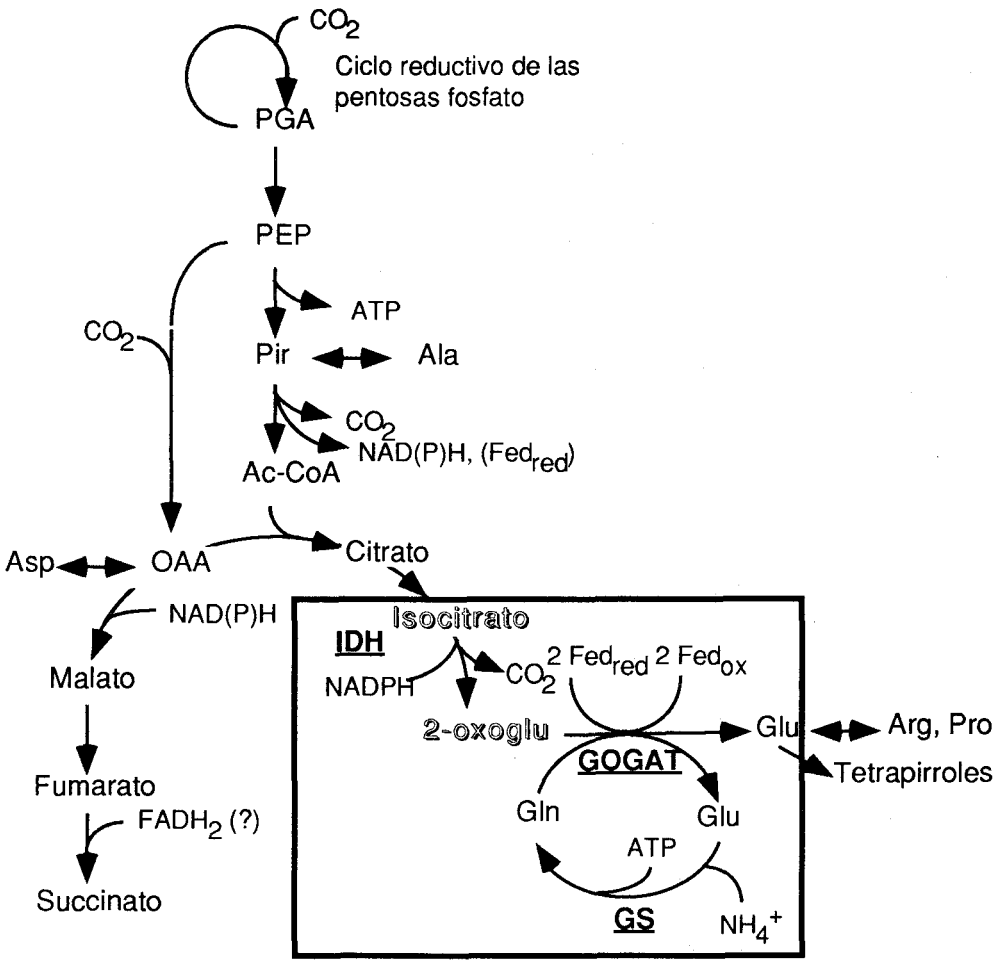


FIGURA 1. Esquema de las principales rutas metabólicas de asimilación de carbono y nitrógeno en cianobacterias.

Se señalan mediante enmarcado las reacciones de la IDH y la ruta GS-GOGAT, resaltando la relación existente entre el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la asimilación de amonio.

1.2. LAS ISOCITRATO DESHIDROGENASAS

1.2.1. Características generales de las isocitrato deshidrogenasas

Las isocitrato deshidrogenasas catalizan la descarboxilación oxidativa del isocitrato hasta 2-oxoglutarato a expensas de reducción de piridín nucleótidos. Según su especificidad por NAD o NADP, se distinguen las NAD-isocitrato deshidrogenasas (NAD-IDH, EC 1.1.1.41.) y las NADP-isocitrato deshidrogenasas (NADP-IDH, EC 1.1.1.42).

Las NAD-IDHs catalizan reacciones irreversibles si bien existen algunos casos excepcionales en los que esta reacción puede ser reversible, el equilibrio se encuentra altamente desplazado hacia la descarboxilación. Las NADP-IDH catalizan sin embargo una reacción reversible (Villafranca y Colman 1972; Satoh y Nakamura, 1984).

El mecanismo de acción ha sido determinado para la NADP-IDH de *E. coli* (Hurley *et al.*, 1991), y la oxidación del isocitrato se cree que ocurre en dos etapas, en la primera el isocitrato se oxida hasta oxalosuccinato por eliminación de un protón del grupo hidroxilo que se transfiere a un residuo de aspártico (Asp-283) y la reducción de $NADP^+$ hasta NADPH, en una segunda etapa el grupo ß-carboxilo del oxalosuccinato se libera como CO_2 y la molécula resultante se protona para dar lugar a 2-oxoglutarato, a expensas de un residuo de lisina o de tirosina (Tyr-160, Lys-230). En el caso de la NAD-IDH el mecanismo no se ha estudiado exhaustivamente si bien es similar al de la NADP-IDH en algunos aspectos (Popják, 1970).

Todas las isocitrato deshidrogenasas son dependientes de la presencia de cationes divalentes como Mg^{2+} o Mn^{2+} para su actividad. De hecho el complejo metal-isocitrato ha sido propuesto como el auténtico sustrato de la NADP-IDH de diferentes fuentes (Farrell, 1980; Seeling y Colman, 1978), y en los casos en los que se ha realizado un estudio estructural por cristalografía de rayos X, se ha comprobado la interacción directa de la enzima con este complejo formado por el isocitrato y el ión metálico (Dean y Koshland, 1990; Hurley *et al.*, 1990) (figura 2).

Las isocitrato deshidrogenasas pertenecen según estas características a una clase de deshidrogenasas descarboxilativas dependientes de iones metálicos que incluye la enzima homóloga isopropilmalato deshidrogenasa (IMDH) y la enzima málica, todas ellas tienen sustratos similares estructuralmente y catalizan reacciones equivalentes, que conllevan la deshidrogenación del carbono α del sustrato para formar un grupo carbonilo a partir de un grupo hidroxilo y la descarboxilación del carbono ß. Algunos de los residuos postulados como reactivos en el caso de la IDH como la Tyr-160 y la Lys-230 se encuentran conservados en la IMDH, enzima que presenta una alta homología de secuencia con la isocitrato deshidrogenasa (Thorsness y Koshland, 1987).

La especificidad de las IDHs por sus coenzimas, NAD o NADP es en general

bastante alta aunque existen casos de IDHs bacterianas que pueden utilizar ambos tipos de piridin nucleótidos como cofactor. (Eguchi *et al.*, 1989; Danson y Wood, 1984; Leyland y Kelly, 1991).

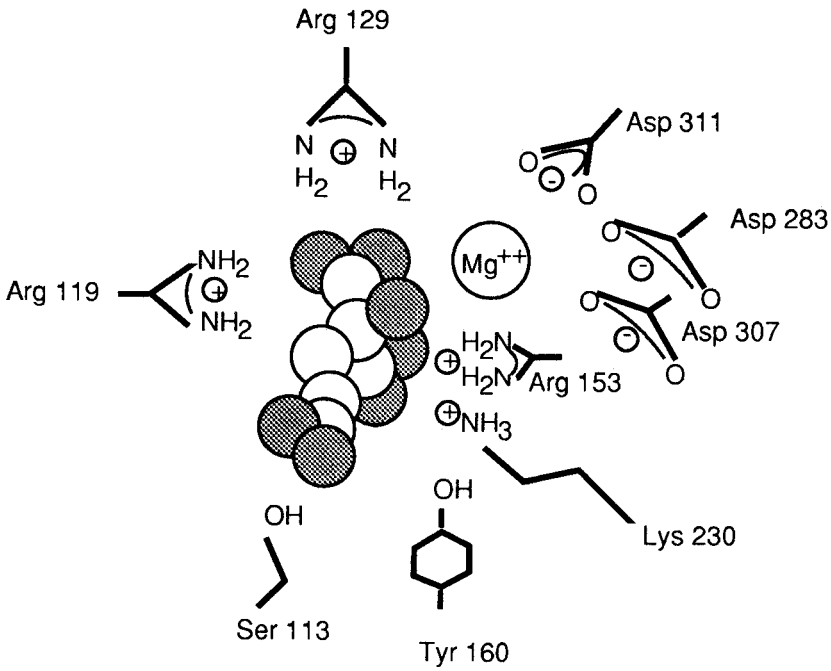


FIGURA 2. Complejo del metal-isocitrato en el sitio activo de la IDH.
Se muestran las interacciones electrostáticas responsables de la unión del complejo Mg2+-isocitrato al sitio activo de la IDH. Los residuos implicados en dichas interacciones en el caso de la enzima de *E. coli*, altamente conservados en el resto de las IDHs secuenciadas, se numeran en la figura. Es de especial interés la interacción con el sustrato del residuo Ser-113 ya que como se describe mas adelante (apartado 1.2.4.) la fosforilación de este residuo provoca la inactivación de la enzima. Las esferas blancas representan los átomos de carbono de la molécula de isocitrato y las grises los de oxígeno.

1.2.2. Tipos de isocitrato deshidrogenasas y distribución

Las isocitrato deshidrogenasas están presentes en todos los organismos vivos pudiéndose distinguir dos grandes grupos y un tercer grupo minoritario,

atendiendo a sus características estructurales, cinéticas y regulatorias. Esta clasificación coincide con las enzimas específicas de NAD (NAD-IDHs), de NADP (NADP-IDHs) o con doble especificidad NAD/NADP siendo este último grupo muy restringido.

Los distintos organismos pueden presentar una o mas enzimas con actividad isocitrato deshidrogenasa y en los casos en los que existen isoenzimas estas pueden pertenecer a un único tipo o a diferentes tipos. En los organismos eucarióticos esta diversidad puede hacerse extensiva a los diferentes compartimentos celulares y los distintos tejidos y órganos.

1.2.2.1. NAD-isocitrato deshidrogenasas.

Las NAD-IDHs se encuentran restringidas en las células eucarióticas a las mitocondrias y han sido purificadas y caracterizadas de varias fuentes (Barnes *et al.*, 1971; Giorgio *et al.*, 1970; Wadano *et al.*, 1989; McIntosh y Oliver, 1992). En algunas bacterias de diferentes grupos se ha descrito también la presencia de este tipo de isocitrato deshidrogenasa como única enzima con esta actividad en dichos organismos (Greenfield y Claus, 1969; Hampton y Hanson, 1969).

La NAD-IDH es una enzima octamérica con una masa molecular en torno a 300 kDa y puede dar lugar a agregados de mayor masa molecular o a oligómeros de menor masa molecular, dependiendo del grado de asociación de las subunidades. Los monómeros, de masa molecular entre 35-40 kDa según las distintas fuentes, pueden ser idénticos o ligeramente diferentes en cuanto a su tamaño como es el caso de la enzima de *Saccharomyces cerevisiae*, con una estructura heteromultimérica y subunidades de 40 kDa (IDH1) y 39 kDa (IDH2).

En cuanto a sus parámetros cinéticos, las NAD-IDHs presentan valores de pH óptimo en torno a 7 y muestran un comportamiento cinético típico de Michaelis-Menten respecto al NAD, con valores de K_m entre 150 y 780 μM. Respecto al isocitrato sin embargo el comportamiento de las NAD-IDHs es sigmoidal con valores de $S_{0,5}$ entre 140 y 690 μM, el grado de alosterismo depende en algunos casos de las concentraciones de citrato y parece estar relacionado con reasociaciones de las subunidades de la enzima en presencia de citrato (Cox y Davies, 1969; McIntosh y Olier, 1992).

La NAD-IDH es una enzima alostérica y este fenómeno ha sido ampliamente estudiado, el AMP y el NAD son activadores de la enzima de levaduras, la unión del AMP aumenta la afinidad de la enzima por el isocitrato (Hathaway y Atkinson, 1963), en otros casos el activador es el ADP en lugar del AMP (Cohen y Colman, 1972). El NADH ejerce por su parte un papel inhibidor en muchas de las NAD-IDHs estudiadas (Coultate y Dennis, 1969; Tezuka y Laties, 1983).

La estimulación por AMP y ADP así como la modulación por diversos metabolitos y la cinética sigmoidal respecto al isocitrato hacen de la NAD-IDH una enzima potencialmente regulada del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

1.2.2.2. NADP-isocitrato deshidrogenasas.

Las NADP-IDHs están presentes en la mayoría de las bacterias y en los organismos eucarióticos se pueden encontrar isoenzimas NADP-dependientes en la mitocondria, el cloroplasto o el citosol.

La mayoría de las NADP-IDHs tanto procarióticas como eucarióticas son enzimas diméricas con subunidades idénticas de masa molecular entre 40-60 kDa. Existe un segundo tipo de NADP-IDH monomérica, de masa molecular entre 55-80 kDa, encontrado sólo en el hongo *Aspergillus niger* (Meixner-Monori *et al.*, 1986) y en las bacterias *Vibrio* sp. ABE (isoenzima II) (Ishii *et al.*, 1987), *Azotobacter vinelandii* (Barrera y Jurtshuk, 1970), *Rhodomicrobium vanniellii* (Leyland y Kelly, 1991), *Sulfolobus acidocaldarius* (Danson y Wood, 1984) y *Thermus thermophilus* (Eguchi *et al.*, 1989). En el caso de las tres últimas bacterias, las IDHs monoméricas presentan actividad dependiente de NAD o NADP constituyendo el pequeño grupo de IDHs con doble especificidad de cofactor que ha sido mencionado anteriormente. Todas las enzimas pertenecientes a este grupo presentan una especificidad entre 400 y 800 veces superior por NADP que por NAD.

Los valores de pH óptimo de las NADP-IDHs son en general mas alcalinos que los que presentan las NAD-IDHs y se encuentran en torno a 8,5 en la mayoría de los casos. El comportamiento cinético de estas IDHs es típico de Michaelis-Menten respecto a los sustratos y las constantes de afinidad calculadas (6,4-77 μM para el isocitrato y 4,4-54 μM para el NADP) son sensiblemente menores que las que muestran las NAD-IDHs.

Las NADP-IDHs no se encuentran sometidas a mecanismos de control alostérico si bien se han descrito y caracterizado varios inhibidores de estas enzimas. Nucleótidos como el ADP o el ATP inhiben la NADP-IDH de diversas fuentes aunque en ocasiones la inhibición observada *in vitro* puede ser debida a un efecto quelante del nucleótido sobre los iones metálicos necesarios para la actividad (Meixner-Monori *et al.*, 1986). El NADPH actúa por otra parte como inhibidor competitivo respecto al NADP. La mayoría de las NADP-IDHs procarióticas se inhiben fuertemente cuando el oxalacetato y el glioxilato se encuentran simultaneamente presentes en la mezcla de reacción, esta inhibición es competitiva respecto al isocitrato y parece ser debida al producto de condensación de los dos cetoácidos (oxalomalato). La significación fisiológica de este fenómeno es cuestionable ya que se produce incluso en sistemas carentes del ciclo del glioxilato (Farrell, 1980; Omran y Dennis, 1971), descartándose una posible función reguladora de los ciclos del glioxilato y de los ácidos tricarboxílicos.

A diferencia de lo que ocurre con las NAD-IDHs, las NADP-IDHs no muestran un esquema consistente de regulación respecto a la carga energética de la célula, aunque existen fenómenos regulatorios específicos en algunas de las enzimas estudiadas. La NADP-IDH de *Escherichia coli* se encuentra finamente

regulada mediante un mecanismo de modificación covalente por fosforilación que se describe en el apartado 1.2.4.

El número de IDHs estudiadas bioquímicamente es muy superior al de los genes clonados y secuenciados, sin embargo se dispone ya de la secuencia de las dos subunidades IDH1 e IDH2 de la NAD-IDH de *Saccharomyces cerevisiae* (Cupp y McAlister-Henn, 1991 y 1992) así como de dos secuencias de NADP-IDHs procarióticas (Thorness y Koshland, 1987; Miyazaki *et al.*, 1992) y cinco eucarióticas (Shorrosh y Dixon, 1992; Haselbeck y McAlister-Henn, 1991; Udvardi *et al.*, 1993; Haselbeck *et al.*, 1992 y Huh *et al.*, 1993). La comparación de dichas secuencias, que se analizará mas adelante junto con las secuencias aportadas en este trabajo, ha permitido comprobar la alta homología existente especialmente entre las NADP-IDHs eucarióticas.

1.2.3. Función de las isocitrato deshidrogenasas en los distintos organismos

En bacterias, donde es habitual la presencia de una única enzima con actividad IDH, esta es dependiente normalmente de NADP y desempeña su función catalizando una de las etapas del ciclo de Krebs. Este hecho se ha confirmado mediante la obtención de mutantes, como es el caso en *Escherichia coli* (Thorsness y Koshland, 1987) o en *Rhizobium meliloti* (McDermott y Kahn, 1992) donde se ha observado un fenotipo auxótrofo para glutamato en las estirpes carentes de actividad IDH. Asimismo el papel que la NADP-IDH de *E. coli* lleva a cabo durante el metabolismo aeróbico es apoyado por ser una de las enzimas que responde a los mecanismos de control global dependientes de la disponibilidad de oxígeno (Inchi y Lin, 1988).

En la bacteria psychrofila *Vibrio* sp. estirpe ABE-1, en la que han sido descritas dos isoenzimas con actividad NADP-IDH, la mutación de una de ellas no conlleva sin embargo ninguna característica fenotípica diferencial, en cuanto al crecimiento y los requerimientos nutricionales, respecto a la estirpe silvestre (Fukunaga *et al.*, 1988).

Las estirpes de *Rhizobium* carentes de NADP-IDH forman nódulos inefectivos en el establecimiento de la simbiosis y son incapaces de fijar dinitrógeno. Aunque hasta el momento no se haya dilucidado la razón última de este fenotipo, se han realizado diversas especulaciones que implican el requerimiento de 2-oxoglutarato o de glutamato para la fijación simbiótica de dinitrógeno llevada a cabo por esta bacteria (McDermott y Kahn, 1992).

En la bacteria fijadora de dinitrógeno *Azotobacter vinelandii* se ha caracterizado una NADP-IDH especialmente activa y se ha especulado con la posible relación entre la presencia de esta enzima, inusualmente activa, y la capacidad de este organismo para fijar dinitrógeno (Barrera y Jurtshuk, 1970). En otras especies del género *Azotobacter*, se han observado incrementos de la actividad NADP-IDH concomitantes con la transición de los cultivos realizados en quimiostato

desde condiciones de limitación de oxígeno hasta condiciones aeróbicas y limitación de nitrógeno (Jackson y Dawes, 1976). Al ser las bacterias de este género aerobias estrictas, la regulación de las actividades del ciclo de los ácidos tricarboxílicos puede no estar relacionada con los típicos fenomenos regulatorios que en las bacterias aeróbicas facultativas responden a la disponibilidad de oxígeno, sino mas bien con el mecanismo respiratorio de protección de la nitrogenasa característico de este género.

En los organismos eucarióticos la presencia habitual de isoenzimas con actividad IDH en los distintos compartimentos celulares, dificulta la asignación de papeles fisiológicos a las mismas. La disponibilidad de mutantes es una circunstancia decisiva a la hora de analizar los diferentes sistemas y atribuir funciones a las distintas enzimas.

Las NAD-IDHs, restringidas en las células eucarióticas a las mitocondrias, están claramente implicadas en la producción de energía y constituyen una etapa importante en el control de la ruta de los ácidos tricarboxílicos. Tanto la localización subcelular de este tipo de IDHs como sus propiedades alostéricas, descritas en el apartado 1.2.2.1., apoyan la función fundamentalmente energética de estas enzimas.

Las NADP-IDHs se encuentran distribuídas tanto en mitocondrias como en cloroplastos y citosol y sus implicaciones fisiológicas no se han determinado completamente. En general se atribuye a estas enzimas un papel en el suministro de NADPH y 2-oxoglutarato para fines biosintéticos (Gonzalez-Villaseñor y Powers, 1986; Chen *et al.*, 1988), sin embargo el NADPH puede participar, a través del sistema de la transhidrogenasa, en la producción de ATP por la cadena de transporte electrónico.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* constituye el sistema mejor conocido respecto a la función de las isoenzimas de isocitrato deshidrogenasa, ya que se dispone de estirpes mutantes de dos de las tres enzimas con actividad IDH descritas en este organismo (Cupp y McAlister-Henn, 1991; Cupp y McAlister-Henn 1992; Haselbeck y McAlister-Henn 1991). En concreto se han obtenido mutantes de la NAD-IDH y la NADP-IDH mitocondriales. El análisis fenotípico de los mutantes carentes de actividad dependiente de NAD permite atribuir a la NAD-IDH un papel esencial en la función oxidativa del ciclo de Krebs, ya que estas estirpes presentan reducidas tasas de crecimiento cuando utilizan fuentes no fermentables de carbono como lactato o glicerol y son incapaces de crecer con acetato. Este fenotipo ha sido ya descrito en mutantes de otras enzimas del ciclo de Krebs. Sin embargo, la prototrofía para glutamato observada implica que algunas de las isoenzimas dependientes de NADP (citosólica o mitocondrial) compensa la carencia de NAD-IDH en la ruta de síntesis del glutamato.

Las isoenzimas dependientes de NADP se expresan en este organismo de forma diferencial en función de la fuente de carbono utilizada por el mismo. Los mutantes de la NADP-IDH mitocondrial son incapaces de crecer en fuentes de

carbono diferentes de glucosa y esto parece ser debido a un requerimiento de NADPH para rutas biosintéticas, que no puede ser suplido por la actividad NAD-IDH en la mitocondria. La competencia de las dos isoenzimas mitocondriales por el isocitrato, dadas sus diferentes características cinéticas y regulatorias, puede tener significación en las transiciones entre metabolismo catabólico y anabólico.

En los eucariotas superiores las actividades dependientes de NADP se expresan de forma diferencial según los tejidos y órganos, y constituyen diferentes isoenzimas probablemente codificadas por distintos genes (Chen *et al.*, 1989; Haselbeck y McAlister-Henn 1991).

En plantas superiores se ha descrito la existencia de cuatro enzimas con actividad IDH, siendo estos organismos por tanto los que presentan una mayor complejidad en el sistema de isoenzimas con actividad isocitrato deshidrogenasa. Si bien los diferentes papeles metabólicos de las distintas isoenzimas distan mucho de estar establecidos, algunas conclusiones se han podido obtener al respecto. La mayor controversia es referente a las tres isoenzimas dependientes de NADP, en este sentido se considera que tanto la NADP-IDH citosólica como la cloroplástica pueden llevar a cabo el aporte de 2-oxoglutarato requerido para la asimilación de amonio, sin embargo la relativa contribución de cada una de ellas a la producción del esqueleto carbonado no se ha determinado completamente (Chen y Gadal, 1990). A la NADP-IDH mitocondrial se atribuye un papel fundamentalmente relacionado con la producción de NADPH necesario en varias rutas anabólicas.

1.2.4. Regulación de la NADP-IDH de *Escherichia coli*

La isocitrato deshidrogenasa de *E. coli* se regula mediante un mecanismo de fosforilación/defosforilación. Este sistema es extremadamente sensible y capaz de adaptar al organismo en respuesta a los cambios, tanto externos como internos, de una gran variedad de compuestos carbonados.

El ciclo de fosforilación controla el flujo de isocitrato a través de la ruta del glioxilato. Esta ruta, presente en plantas y en microorganismos, es esencial para el crecimiento en algunas fuentes de carbono como el acetato o los ácidos grasos ya que permite la conversión de acetil-CoA en intermediarios metabólicos, evitando la pérdida de carbono por liberación de CO_2 que se produce en el ciclo de Krebs (figura 3). La regulación fina de la cantidad de actividad IDH de la célula es necesaria para permitir la metabolización del isocitrato por la ruta del glioxilato a través de la isocitrato liasa (IL), ya que la constante de afinidad de esta enzima por el sustrato (600 μM) es muy superior a la que presenta la IDH (8 μM) (LaPorte e Ikeda, 1991; LaPorte 1993).

La IDH se inactiva mediante la fosforilación de un residuo de serina que se encuentra situado en el sitio activo (Ser-113), la introducción de la carga negativa

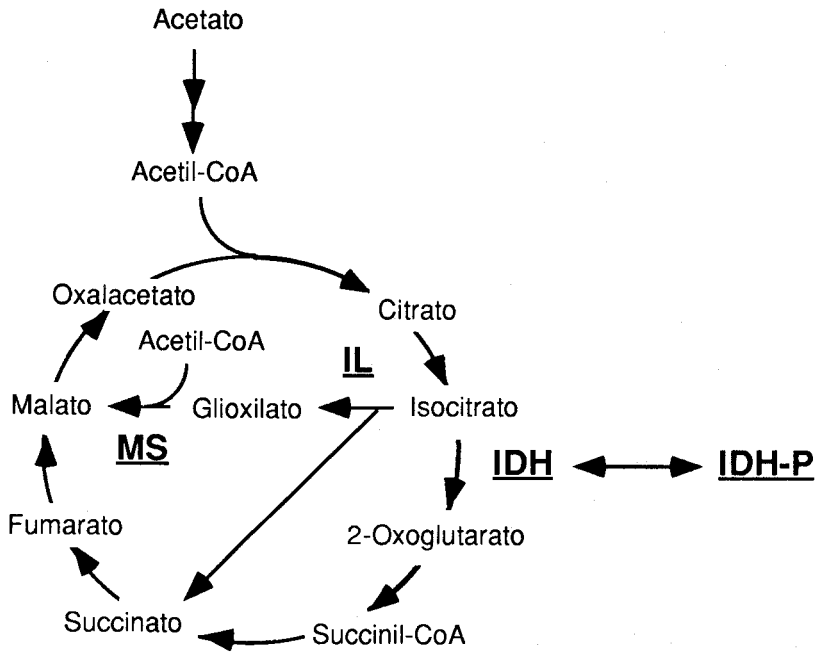


FIGURA 3. Ciclos de Krebs y del glioxilato que operan en *E. coli*.
El ciclo del glioxilato, especialmente importante durante el crecimiento en acetato, se lleva a cabo mediante la acción de la isocitrato liasa (IL) y la malato sintasa (MS). IDH e IDH-P indican las formas defosforilada y fosforilada de la isocitrato deshidrogenasa, respectivamente.

del fosfato es la responsable de dicha inactivación impidiendo la unión del isocitrato por repulsión electrostática (Thorsness y Koshland, 1987; Dean y Koshland 1990).

La fosforilación de la NADP-IDH de *E. coli* a nivel de su sitio activo fue el primer mecanismo de modificación covalente por fosforilación que se describió en procariotas (Garnak y Reeves, 1979). Este sistema difiere sensiblemente de los mecanismos de fosforilación que ya se conocían previamente para enzimas eucarióticas como la glicógeno fosforilasa, en este caso la fosforilación de un residuo de serina alejado del sitio activo provoca un cambio conformacional de la enzima alterando su actividad (Sprang *et al.*, 1988), por el contrario la fosforilación de la IDH no provoca grandes cambios conformacionales en la misma, constituyendo un tipo especial de modificacion de actividad enzimática por fosforilación (Hurley *et al.*, 1989; Hurley *et al.*, 1990).

Una única enzima bifuncional denominada IDH kinasa/fosfatasa cataliza la fosforilación y defosforilación de la IDH (LaPorte y Koshland, 1982). Las actividades kinasa y fosfatasa parecen tener lugar en el mismo sitio activo de dicha enzima (Stueland *et al.*, 1989). Las estirpes mutantes de esta enzima bifuncional son incapaces de crecer en acetato como fuente de carbono, donde es imprescindible la operatividad del ciclo del glioxilato, la inactivación de la IDH permite en estas circunstancias que se alcancen los niveles de isocitrato necesarios para la actividad de la isocitrato liasa, dada la baja afinidad de esta enzima por el sustrato.

Si bien el ciclo del glioxilato permite durante el crecimiento en acetato que se mantengan los niveles de intermediarios metabólicos, éste es menos eficiente que el ciclo de Krebs en la obtención de energía, el isocitrato debe por tanto ser canalizado a través de una u otra ruta en función del estado energético de la célula, de ahí que el sistema de regulación y concretamente la IDH kinasa/fosfatasa responda a los niveles de diversos metabolitos como el isocitrato, el 3-fosfoglicerato o el AMP, testando de este modo las necesidades energéticas y biosintéticas de la célula. Se postula que los distintos efectores de la enzima reguladora se unen a un dominio regulador de la misma que controla un equilibrio conformacional entre una forma con actividad fosfatasa y otra con actividad kinasa.

La especial sensibilidad del mecanismo de regulación es debida a varios factores que confluyen en el sistema amplificando la respuesta. Algunos de estos factores son la gran diferencia de afinidad de las dos enzimas que compiten por el isocitrato, la IDH y la IL, así como los efectos opuestos que algunos metabolitos tienen sobre la actividad kinasa y fosfatasa de la proteína reguladora.

1.2.5. La isocitrato deshidrogenasa en cianobacterias

La isocitrato deshidrogenasa, como enzima implicada directamente en la producción de 2-oxoglutarato, representa en cianobacterias la etapa final de una de las ramas del ciclo incompleto de los ácidos tricarboxílicos. El 2-oxoglutarato producido tras la descarboxilación oxidativa del isocitrato es el esqueleto carbonado necesario para la asimilación del amonio por la ruta GS-GOGAT.

Las enzimas de la ruta GS-GOGAT han sido objeto de numerosos estudios en cianobacterias, tanto desde el punto de vista estructural como funcional así como de regulación (Florencio y Ramos, 1985; Orr *et al.*, 1981; Mérida *et al.*, 1990; Mérida *et al.*, 1991; Marqués *et al.*, 1992). Sin embargo los datos existentes en la literatura acerca de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en cianobacterias son muy escasos, y se limitan en su mayoría a determinaciones de actividades enzimáticas (Pearce *et al.*, 1969; Neuer y Bothe, 1982), no habiéndose realizado hasta el momento estudios exhaustivos de la mayoría de estas enzimas.

La isocitrato deshidrogenasa ha sido quizás la enzima mas estudiada de la ruta al ser la etapa final de la misma. En todas las cianobacterias en las que se ha estudiado se ha descrito la existencia de una única enzima con actividad isocitrato

deshidrogenasa, estrictamente dependiente de NADP y de cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) para su funcionalidad (Friga y Farkas, 1981; Papen *et al.*, 1983).

La NADP-isocitrato deshidrogenasa ha sido parcialmente purificada a partir de la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Friga y Farkas, 1981) mientras que los estudios realizados con cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, de los géneros *Anabaena* y *Nostoc*, se han llevado a cabo utilizando extractos crudos de estas cianobacterias (Papen *et al.*, 1983; Karni y Tel-or, 1983; Neuer *et al.*, 1983). Tanto en células vegetativas como en heterocistos de la cianobacteria *Nostoc muscorum* se ha detectado actividad NADP-IDH, a diferencia de lo descrito en el caso de *Anabaena cylindrica* donde dicha actividad se ha encontrado en extractos procedentes de heterocistos y no de células vegetativas (Papen *et al.*, 1983).

En cianobacterias la IDH desempeña su papel fisiológico en la aportación de 2-oxoglutarato como esqueleto carbonado necesario para la asimilación del amonio (Pearce *et al.*, 1969). Esta función, característica de la IDH en la generalidad de los organismos, es común en todas las cianobacterias y en todas las condiciones de cultivo. Sin embargo, en las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno formadoras de heterocistos una función específica adicional ha sido propuesta para la NADP-IDH, considerando esta enzima como posible donadora de poder reductor en forma de NADPH, que sería canalizado hasta la nitrogenasa a través de la Ferredoxina:NADP oxidorreductasa (Neuer *et al.*, 1983; Karni y Tel-or, 1983; Bothe y Neuer, 1988).

El NADPH es producido en el heterocisto en las reacciones de deshidrogenación de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, mediante la acción de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH), y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos mediante la isocitrato deshidrogenasa. En el caso de la cianobacteria *Nostoc muscorum* se ha descrito que la IDH es mas activa que la G6PDH en la reducción de NADP en base a su menor grado de inhibición por NADPH (Karni y Tel-or, 1983), apoyando este hecho el papel de la IDH como donadora de poder reductor para la actividad nitrogenasa, si bien dicha función dista mucho de estar comprobada.

1.3. OBJETIVOS DE ESTE ESTUDIO Y ORGANISMOS EMPLEADOS

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de la isocitrato deshidrogenasa de cianobacterias, con objeto de contribuir al conocimiento de las enzimas del metabolismo del carbono en estos organismos y concretamente de la enzima que aporta el esqueleto carbonado para la asimilación del amonio. La IDH representa la conexión de las rutas metabólicas del carbono y el nitrógeno.

Se han elegido dos cianobacterias para realizar este estudio: *Synechocystis* sp. PCC 6803 (abreviaremos en adelante como *Synechocystis* 6803) y *Anabaena* sp. PCC 7120 (*Anabaena* 7120) (figura 4).

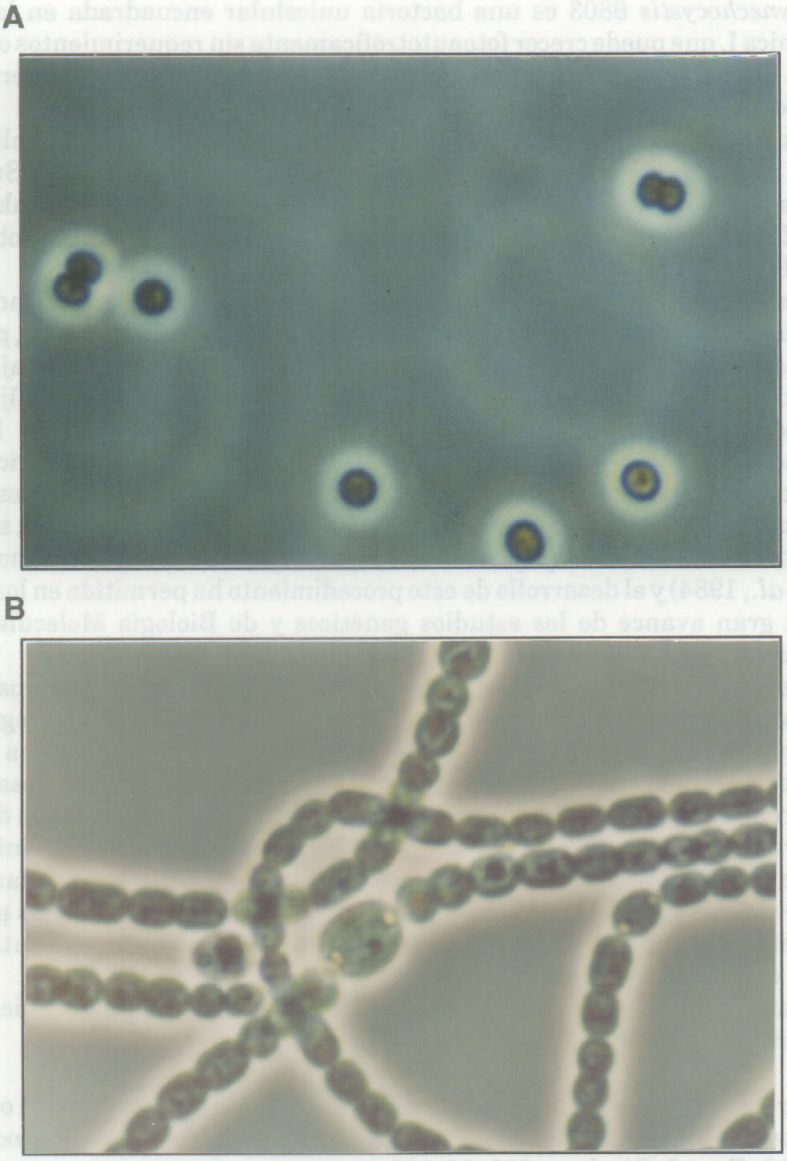


FIGURA 4. Imágenes de las cianobacterias empleadas en este trabajo al microscopio óptico utilizando la técnica de contraste de fases.
(A) *Synechocystis* sp. PCC 6803 (x2500).
(B) *Anabaena* sp. PCC 7120 (x1680), se aprecian células diferenciadas dotadas de corpúsculos polares, heterocistos, especializadas en la fijación de nitrógeno.

Synechocystis 6803 es una bacteria unicelular encuadrada en la sección taxonómica I, que puede crecer fotoautotróficamente sin requerimientos orgánicos (Rippka *et al.*, 1979) y también en condiciones mixotróficas y heterotróficas (Anderson y McIntosh, 1991).

Como otras cianobacterias *Synechocystis* 6803 es altamente poliploide y posee en torno a doce copias cromosómicas por célula (Labarre *et al.*, 1989). Su natural capacidad para ser transformada con ADN foráneo (Grigorieva y Shestakov 1982) y mutada de forma dirigida (Williams, 1988) la hacen una de las cianobacterias mas utilizadas para los estudios genéticos y de Biología Molecular.

Este organismo ha sido objeto además de varios estudios relacionados con el metabolismo del nitrógeno y mas concretamente con la ruta GS-GOGAT, por lo que parecía adecuado para los objetivos que nos proponíamos en este trabajo.

Por otra parte *Anabaena* 7120 es una cianobacteria filamentosa fijadora de dinitrógeno y formadora de heterocistos perteneciente a la sección IV de la clasificación de Rippka *et al.*, siendo un organismo fotoautotrófico estricto.

La transferencia de ADN foráneo a esta estirpe, al igual que al resto de las cianobacterias filamentosas en las que este proceso se ha llevado a cabo, se realiza mediante un sistema de conjugación interespecífica desde *E. coli* a la cianobacteria (Wolk *et al.*, 1984) y el desarrollo de este procedimiento ha permitido en los últimos años un gran avance de los estudios genéticos y de Biología Molecular de las cianobacterias filamentosas.

La generación de mutantes en *Anabaena* se ve dificultada al igual que en *Synechocystis* por la poliploidía ya que se requieren largos periodos de segregación hasta obtener la homogeneidad de todos los cromosomas de una misma célula.

Se ha elegido esta estirpe como modelo de cianobacteria filamentosa fijadora de dinitrógeno, que permitiera estudiar el posible papel de la IDH como donadora de poder reductor para la nitrogenasa durante el proceso de fijación de dinitrógeno.

Se describe a continuación la purificación y caracterización de las NADP-IDHs de estas dos cianobacterias así como la clonación y análisis de los genes *icd* que codifican para estas enzimas. Se ha realizado asimismo la mutagénesis dirigida de los correspondientes genes *icd* en ambas cianobacterias.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo se han publicado o se encuentran en vías de publicación:

M.I. Muro-Pastor and F. J. Florencio (1992) Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 203, 99-105.

M.I. Muro-Pastor and F. J. Florencio. NADP-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120: Purification and characterization of the enzyme, and cloning, sequence and disruption of the *icd* gene. Enviado para su publicación en *Biochemical Journal.*

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1. Cianobacterias

2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas.

El presente trabajo se ha centrado en dos cianobacterias, *Synechocystis* sp. PCC 6803, organismo unicelular heterótrofo facultativo perteneciente a la sección I de la clasificación taxonómica de las cianobacterias propuesta por Rippka *et al.* (1979), y *Anabaena* sp. PCC 7120, cianobacteria filamentosa fijadora de dinitrógeno perteneciente a la sección IV de la clasificación mencionada.

La estirpe SFCΩ5 de *Synechocystis* 6803 se utilizó en los experimentos genéticos con objeto de poder eventualmente estabilizar en ella construcciones de ADN en forma plasmídica. Esta estirpe es además inmóvil, lo que permite la formación de colonias nítidas en medio sólido.

La estirpe AMP2 de *Anabaena* 7120 se utilizó como organismo control resistente a neomicina y silvestre respecto al gen *icd* estudiado en este trabajo.

Todas las estirpes empleadas se relacionan en la tabla 1.

Tabla 1. Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo.

Estirpe[a]	Características	Referencia
Synechocystis sp.		
PCC 6803	Silvestre	Rippka *et al.*, 1979
SFCΩ5	PCC 6803 inmóvil/ pFCΩ5, Sm^r	Chauvat *et al.*, 1988
Anabaena sp.		
PCC 7120	Silvestre	Rippka *et al.*, 1979
AMP2[b]	PCC 7120, *nucA*:: Nm^r	Muro-Pastor *et al.*, 1992

[a] PCC, Colección de Cultivos del Instituto Pasteur (Francia).
[b] **La estirpe AMP2 es silvestre respecto al gen *icd*.**

2.1.1.2. Cultivo de cianobacterias en medio líquido.

Las células de *Synechocystis* 6803 utilizadas para la purificación de la NADP-IDH (apartado 3.1) se cultivaron en el medio sintético descrito por Herdman

et al., (1973), con amonio como fuente de nitrógeno, cuya composición es la siguiente:

NH_4Cl	15 mM
K_2HPO_4	12 mM
$NaHCO_3$	10 mM
$MgSO_4$	0,30 mM
$CaCl_2$	0,25 mM
Na_2CO_3	0,19 mM
H_3BO_3	46 µM
$MnCl_2$	9,1 µM
Na_2-EDTA	2,7 µM
Na_2MoO_4	1,6 µM
$ZnSO_4$	0,8 µM
$CuSO_4$	0,3 µM
$CoCl_2$	0,2 µM

A cada litro de medio de cultivo se le añadieron 0,5 ml de una solución de hierro-citrato preparada disolviendo 6 g de ácido cítrico hexahidratado y 3 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ en 250 ml de agua. El medio con todos sus componentes a excepción del fosfato, el bicarbonato, y el hierro-citrato, se colocó en el correspondiente frasco de cultivo, tapado con algodón graso atravesado por una o dos varillas de vidrio huecas a cuyo extremo se conectó un tubo de goma cerrado con pinzas. La esterilización se llevó a cabo en un autoclave Selecta (España) modelo P durante 20 min a 1 atm de sobrepresión y 121 °C de temperatura. Las soluciones de fosfato y bicarbonato y de hierro-citrato se esterilizaron separadamente para evitar la precipitación de las sales, y se añadieron, una vez frías, en condiciones de esterilidad.

Los medios empleados para el cultivo de *Anabaena* 7120 y *Synechocystis* 6803 (excepto cuando se cultivaba con fines de purificación enzimática) se basan en el denominado BG11 (Rippka *et al.*, 1979), cuya composición es la siguiente:

$NaNO_3$	17,6 mM
$MgSO_4$	0,30 mM
$CaCl_2$	0,24 mM
Na_2CO_3	0,20 mM
K_2HPO_4	0,20 mM
H_3BO_3	46 µM
Acido cítrico	28,5 µM
Citrato férrico-amónico (17% Fe)	6 mg/l
$MnCl_2$	9,1 µM
Na_2-EDTA	2,4 µM

Na_2MoO_4	1,6 µM
$ZnSO_4$	0,8 µM
$CuSO_4$	0,3 µM
$CoCl_2$	0,2 µM

La denominación $BG11_0$ hace referencia al medio BG11 suprimiendo el contenido en $NaNO_3$. Opcionalmente los medios BG11 y $BG11_0$ se suplementaban con $NaHCO_3$ 12 mM denominándose entonces BG11C y $BG11_0C$, respectivamente.

Los cultivos utilizados en los experimentos con *Synechocystis* descritos en el apartado 3.8 se realizaron en medio BG11C, cuando la fuente de nitrógeno fue el amonio, se sustituyó el $NaNO_3$ por NH_4Cl a una concentración de 15 mM. En este último caso se añadió tampón TES-NaOH (pH 7,5), a una concentración final de 30 mM. Para los experimentos llevados a cabo en ausencia de nitrógeno combinado se utilizó el medio $BG11_0C$. Los cultivos crecidos en condiciones mixotróficas se realizaron en medio BG11C suplementado con glucosa al 2% (p/v). Los medios conteniendo todos sus componentes excepto el tampón TES-NaOH y/o la glucosa en su caso, se colocaron en los correspondientes frascos de vidrio, preparados como se ha descrito anteriormente, excepto en el caso de los cultivos mixotróficos, que se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de volumen doble al del medio contenido y tapados con algodón graso. La solución de glucosa se esterilizó separadamente para evitar su degradación, y la del tampón TES-NaOH por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con poros de 0,22 µm de diámetro (Millipore, Puerto Rico) o filtros Acrodisc (Gelman, 0,2 µm de diámetro de poro).

Cuando las células se sometieron a tratamientos de ausencia de fuente nitrogenada, tras ser cultivadas en medio BG11C, fueron recogidas por centrifugación como se describe en el apartado 2.1.3 y resuspendidas en medio $BG11_0C$.

Las condiciones de ausencia de CO_2 se consiguieron eliminando del medio el Na_2CO_3 y el $NaHCO_3$ y burbujeando aire al que se le eliminó el CO_2 al hacerlo pasar a través de una solución saturada de hidróxido bárico (agua de barita).

Cuando se sometió un cultivo a tratamiento de oscuridad, esta se logró mediante el total recubrimiento del recipiente de cultivo con papel de aluminio.

Las estirpes mutantes MS1, MS2, MS3 y MS7 se cultivaron en medio BG11C conteniendo 50 µg/ml de cloranfenicol.

Las células de *Anabaena* utilizadas para la purificación (apartado 3.2) se cultivaron en medio $BG11_0$ contenido en frascos de vidrio de 10 ó 20 l dotados de varillas de vidrio como se ha descrito anteriormente.

Los cultivos utilizados en los experimentos descritos en el apartado 3.9 se realizaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad, conteniendo 50 ml de medio $BG11_0$, BG11 o BG11 en el que se sustituía el $NaNO_3$ por NH_4Cl a una concentración de 10 mM. En este último caso se añadió tampón TES-NaOH (pH 7,5), a una concentración final de 20 mM.

Las estirpes mutantes AMP2 y MA1 se cultivaron de forma similar a como se ha descrito para los experimentos del apartado 3.9 pero suplementando los medios con 10 µg/ml de neomicina previamente filtrada a través de membranas de nitrocelulosa con poros de 0,22 µm de diámetro (Millipore, Puerto Rico) o filtros Acrodisc (Gelman, 0,2 µm de diámetro de poro). En los casos en los que se indica se añadió a los cultivos L-prolina 3 mM, L-glutamato 0,5 mM ó 2-oxoglutarato 5 mM filtrados en las mismas condiciones que la neomicina. Los cultivos con 2-oxoglutarato se tamponaron en todos los casos con TES-NaOH (pH 7,5) 10 mM.

El crecimiento de los cultivos tuvo lugar en condiciones termostatizadas a 35 °C en el caso de *Synechocystis* y 30 °C en el caso de *Anabaena*. La iluminación fue continua de 125 µE/m^2 s, suministrada por paneles de tubos fluorescentes de luz blanca (Sylvania daylight F20w/D o similares). Los matraces Erlenmeyer se incubaron a 150 rpm en incubadores orbitales New Brunswick Scientific (EE.UU.) modelo G27 o Gallenkamp (Gran Bretaña) modelo INR.401.010W. Los medios contenidos en frascos dotados de varilla se agitaron mediante burbujeo continuo de una mezcla de CO_2 al 5% en aire en el caso de *Synechocystis* y aire en el caso de *Anabaena*.

2.1.1.3. Cultivo de cianobacterias en medio sólido.

Para el cultivo de *Synechocystis* en medio sólido se utilizó medio BG11C gelificado con agar al 1% (p/v). El agar (Bacto-Agar Difco) se esterilizó termobáricamente como se ha descrito anteriormente, de forma separada al resto del medio de cultivo. Las estirpes MS1, MS2, MS3, y MS7 se cultivaron igual que el silvestre pero en presencia de 75 µg/ml de cloranfenicol.

Las células de *Anabaena* se cultivaron en medio sólido $BG11_0$ en el caso de la estirpe silvestre y BG11 suplementado con neomicina 25 y 100 µg/ml en el caso de las estirpes AMP2 y MA1 respectivamente. Para la selección de colonias resistentes a sacarosa (apartado 2.5.3), el medio se suplementó con sacarosa al 5% (p/v) previamente filtrada.

Una vez mezclados todos los componentes y antes de gelificar, el medio se vertió en cajas de Petri a razón de 35 a 40 ml por caja. Las condiciones de iluminación fueron las mismas que las descritas para los cultivos líquidos.

2.1.1.4. Curvas de crecimiento.

En los experimentos destinados a estimar la tasa de crecimiento de una determinada estirpe de *Anabaena*, los cultivos se iniciaban a una densidad celular correspondiente a 0,4 µg de clorofila/ml y a distintos tiempos de incubación en condiciones de cultivo, se tomaban muestras de 200 µl de la suspensión y se determinaba la concentración de proteína de la misma como se describe en el apartado 2.6.2.1.

2.1.2. *Escherichia coli*

2.1.2.1. Estirpes de *E. coli* utilizadas.

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

2.1.2.2. Cultivo de *E. coli*.

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

Estirpe	Características	Referencia
DH5α	F^-, *endA*1, *hsdR*17 (mK^+,rK^-), *supE*44, *thi*-1, *recA*1, *gyrA*96, *relA*1, D*lac*U169 (f80d-*lacZ*DM15)	Hanahan, 1983
MC1061	*hsdR*, *mcrB*, *araD*139 D(*araABC-leu*)7679 D*lac*X74, *galU*, *galK* *rpsL*, *thi*	Meissner *et al.* 1987
HB101	*supE*44, *hsdS*20, (r^-m^-) *recA*13, *ara*-14, *proA*2 *lacY*1, *galK*2, *rpsL*20 *xyl*-5, *mtl*-1, *mcrB*	Boyer y Roulland -Dussoix, 1969
EB106	*icd*-11, *dadR*1, *trpA*62 *trpE*61, *tna*-5, I^-	Apostolakos *et al.* 1982
DEK2004	*icd*, *trp*, *recA*	Thorsness y Koshland, Jr. 1987

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

NaCl	10 g/l
Bactotriptona	10 g/l

Extracto de levadura	5 g/l

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

Cuando los cultivos iban a ser empleados para aislamiento de plásmidos, las células se cultivaron en el medio denominado Terrific (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente:

Extracto de levadura	24 g/l
Bactotriptona	12 g/l
Tampón fosfato potásico 1 M (pH 7,6)	100 ml/l
Glicerol	5 ml/l

El tampón fosfato y el medio se esterilizaron en autoclave por separado y se mezclaron posteriormente.

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

Bactotriptona	20 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 mM
$MgCl_2$	10 mM
$MgSO_4$	10 mM
KCl	2,5 mM

Las sales de magnesio se esterilizaron separadamente por filtración. El resto del medio se esterilizó en autoclave como ya se ha descrito. Una vez frío se añadieron los otros componentes.

El medio mínimo utilizado para el cultivo de los diferentes transformantes de las estirpes DEK 2004 y EB 106 de *E. coli* fue el MOPS (Neidhardt *et al.*, 1974), cuya composición es la siguiente:

Concentrado 10x:

MOPS-KOH 1 M (pH 7,4)	400 ml/l
Tricina-KOH 1 M (pH 7,4)	40 ml/l
$FeSO_4$ 0,01 M	10 ml/l
NH_4Cl 1,9 M	50 ml/l
K_2SO_4 0,276 M	10 ml/l
$CaCl_2$ 0,5 mM	10 ml/l
$MgCl_2$ 0,528 M	10 ml/l

NaCl 5 M	100 ml/l
Micronutrientes	10 ml/l

Micronutrientes:

$(NH_4)_6(MO_7)_{24}$	3 µM
H_3BO_3	0,4 mM
$CoCl_2$	30 µM
$CuSO_4$	10 µM
$MnCl_2$	80 µM
$ZnSO_4$	10 µM

Medio completo:

Concentrado 10 x	100 ml/l
K_2HPO_4 0,132 M	10 ml/l
Glucosa 50% (p/v)	10 ml/l

El concentrado 10x, la glucosa y el fosfato se esterilizaban separadamente en autoclave y se mezclaban una vez fríos. El medio en forma sólida se prepara añadiendo agar 1,5% (p/v).

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

Ampicilina	100 µg/ml
Kanamicina	50 µg/ml
Cloranfenicol	25 µg/ml
Espectinomicina	100 µg/ml
Estreptomicina	25 µg/ml

En el caso del medio MOPS se utilizó Ampicilina 40 µg/ml.

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

2.1.3. Métodos de recogida de células

Cuando el volumen de células a recoger era menor de tres litros, la recogida se llevó a cabo por centrifugación, bien en microcentrífuga Eppendorf (10.000 x *g*, 10 min), bien en centrífuga de mesa Heraeus (2.500 x *g*, 5 min) o en centrífuga

refrigerada Sorvall (EE.UU.) modelos RC2-B y RC5-C (7.000 x *g*, 10 min), según el volumen del cultivo. En caso de cantidades superiores, se utilizó un sistema de centrifugación en flujo continuo Szent-Gyorgyi-Blum (Sorvall, EE.UU.) a 18.000 x *g* y 4 °C.

2.2. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD NADP-IDH

La actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa (EC 1.1.1.42) se ensayaba *in vitro* a 30 °C. Para ello, se seguía espectrofotométricamente a 340 nm la reducción de NADP a NADPH dependiente de isocitrato. La mezcla de ensayo contenía, además de una cantidad adecuada de la preparación enzimática, 50 mM de tampón fosfato potásico (pH 7,5), 3 mM de $MgCl_2$, 1 mM de isocitrato y 0,4 mM de NADP en un volumen final de 1 ml. La reacción se iniciaba por la adición de isocitrato, tras realizar un control de la reducción de NADP en ausencia de isocitrato. Una unidad (U) de actividad NADP-IDH se define como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 µmol de NADP por minuto en estas condiciones de ensayo.

2.3. METODOS DE PURIFICACION Y ANALISIS DE PROTEINAS

2.3.1. Preparación de extractos celulares

Para la purificación de NADP-IDH a partir de células de *Synechocystis* 6803 o de *Anabaena* 7120 se siguió un procedimiento similar en la obtención de los extractos crudos. Entre 60 y 70 g (peso fresco) de células provenientes de 70 litros de cultivo, crecidas y recogidas como ya se ha descrito y conservadas a -20 °C, se descongelaron sobre hielo. Posteriormente se resuspendieron en tampón Tris/HCl 30 mM (pH 7,5) conteniendo 2 mM de 2-mercaptoetanol (tampón estándar). En el caso de las células de *Anabaena* el tampón estándar se suplementó con 5% v/v de glicerol, 5 mM de $MgCl_2$ y 1 mM de citrato sódico. La suspensión celular con un volumen aproximado de 170 ml se suplementó con fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 100 mM (en isopropanol) hasta una concentración final de 1 mM, a continuación se sometió a tratamiento con ultrasonidos durante 20 periodos de 30 s en el caso de *Synechocystis* y 10 periodos de la misma duración en el caso de *Anabaena*. Los periodos de rotura se alternaron con otros tantos de igual duración en los que cesó el tratamiento con objeto de evitar un excesivo calentamiento de la suspensión. La frecuencia de los ultrasonidos, producidos por un sonicador Branson (Reino Unido) modelo B12, fue de 20 KHz, y su potencia de 75 W. Una vez concluido el tratamiento de rotura, la suspensión celular se sometió a centrifugación durante 15 min a 15.000 x *g*. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo libre de células utilizado en las purificaciones a gran escala.

Los extractos crudos de células de *Synechocystis* o de *Anabaena* destinados a determinaciones de actividad enzimática, se realizaron mediante dos

procedimientos alternativos dependiendo del volumen del cultivo y de la densidad celular del mismo. Si se partía de 500 ml de cultivo o más, tras recoger las células por centrifugación, se resuspendían en 5 ml de tampón estándar, se suplementaban con PMSF y se sometían al tratamiento con ultrasonidos anteriormente descrito durante un periodo de 1 min en el caso de *Synechocystis* y 30 s en caso de *Anabaena*. Una vez centrifugada la suspensión se obtenía el extracto crudo libre de células. Si se partía de volumenes menores de cultivo o de células procedentes de cultivos en fases iniciales de crecimiento, como era el caso de los experimentos descritos en los apartados 3.8, 3.9 y 3.14.3, las células una vez recogidas por centrifugación se resuspendían en 0,5 ml de tampón estándar, se añadía PMSF y se sometían a congelación con nitrógeno líquido triturándose en un mortero hasta reducirlas a polvo antes de llegar a descongelarse. Una vez descongelada, la preparación se sometía a centrifugación tal como se ha descrito anteriormente para obtener el extracto crudo libre de células.

Los extractos de *E. coli* para determinaciones de actividad NADP-IDH se llevaron a cabo por tratamiento con ultrasonidos (20 KHz, 75 W) de una suspensión celular obtenida al resuspender las células provenientes de 50 ml de cultivo en fase estacionaria en 5 ml de tampón estándar. La suspensión se suplementó con PMSF antes del tratamiento de rotura y el extracto crudo se obtuvo centrifugando la suspensión una vez tratada con ultrasonidos como se ha descrito para los extractos de cianobacterias.

2.3.2. Técnicas cromatográficas

2.3.2.1. Cromatografía de intercambio iónico.

Se empleó DEAE-celulosa microgranular DE-52 Whatman (Gran Bretaña) equilibrada inicialmente con tampón concentrado, Tris/HCl 0,5 M (pH 7,5) y reequilibrada posteriormente en la columna con el tampón adecuado. La columna utilizada fue de vidrio conteniendo un lecho de 3,5 cm de diámetro y empaquetada hasta 15 cm de altura. Los gases disueltos en las suspensiones de DEAE-celulosa se eliminaron por succión antes de montar las columnas, mediante una bomba de vacío Millipore modelo XX5522050 (EE.UU.). El flujo de aplicación de las muestras y el de los solventes de lavado y elución se reguló por medio de bombas peristálticas LKB tipo Perpex 10.200 de cabezas reductoras intercambiables. Las fracciones del eluato se recogieron automáticamente con colectores LKB modelo Ultrorac 7.000 o Pharmacia modelo Frac-100 (Suecia).

2.3.2.2. Cromatografía en gel de Red-agarosa.

En el caso de la cromatografía utilizada como segundo paso de purificación de la NADP-IDH (apartado 3.1.2.), se usó una columna de vidrio calibrado modelo

K26/40 de Pharmacia (Suecia), conteniendo un lecho de Reactive Red-120 agarosa Sigma (EE.UU.), de 2,5 cm de diámetro y 10 cm de altura, equilibrado con tampón estándar (8 volúmenes). La segunda cromatografía en Red-agarosa del proceso de purificación, descrita en el apartado 3.1.3, se llevó a cabo en una columna de vidrio Bio-Rad (EE.UU.) modelo Econo-Column Standard de 1 cm de diámetro y 10 cm de altura equilibrada con tampón estándar. Las condiciones generales de cromatografía fueron las descritas para la de intercambio iónico en el apartado anterior. Para su reutilización el gel se lavó con 2 volúmenes de una solución de urea 6 M y KCl 1 M y posteriormente se equilibró con tampón estándar.

2.3.2.3. Cromatografía en gel de Fenil-Sefarosa.

Se empleó una columna de vidrio Bio-Rad (EE.UU.) modelo Econo-Column Standard de 1 cm de diámetro y 10 cm de altura, equilibrada con 1 M de sulfato amónico en tampón estándar. Para su reutilización el gel se lavó con 2 volúmenes de una solución de etilenglicol al 70% y se equilibró a continuacion con tampón estándar y 1 M de sulfato amónico en el mismo tampón antes de la aplicación de la muestra. Las condiciones generales de cromatografía fueron las ya descritas en los apartados anteriores.

2.3.2.4. Cromatoenfoque.

Se utilizó una columna de vidrio calibrado modelo C 10/20 de Pharmacia (Suecia), conteniendo un lecho de Polybuffer Exchanger 94 de la misma marca, de 1 cm de diámetro y 20 cm de altura, limitado en su parte superior por un émbolo AC10 y equilibrado con 15 volúmenes de tampón imidazol-HCl 25 mM (pH 7,4). La muestra de 3 ml se aplicó mediante un sistema de jeringa acoplada a la columna. La elución se realizó con Polybuffer 74 a un flujo de 35 ml/h. Se recogieron fracciones de 1 ml y tras medir el pH de las mismas se ensayó la actividad enzimática. Para su reutilización el gel se lavó con 1 M NaCl y se equilibró de nuevo.

2.3.2.5. Cromatografía de filtración en gel.

Se utilizó una columna de vidrio calibrado K16/40 Pharmacia (Suecia) conteniendo un lecho de 1,6 x 32 cm de Sephacryl S-300 Superfine de la misma marca limitado en su parte superior por una cestilla de aplicación de muestras. La columna se equilibró con tampón Tris/HCl 25 mM (pH 7,5) suplementado con 0,15 M de NaCl. Las muestras, 0,4 ml, se aplicaron directamente con pipeta sobre la cestilla tras haber llevado el menisco del eluyente hasta el límite superior del lecho. Una vez que la muestra había penetrado, la columna se volvía a llenar con el eluyente y la cromatografía descendente se desarrollaba a un flujo de 28 ml/h

proporcionado por succión mediante una bomba peristáltica LKB 10.200 (Suecia) conectada a la salida de la columna. Se recogieron fracciones de 0,5 ml de forma automática, determinándose el volumen exacto de elución de cada muestra (V_e) por el peso del líquido correspondiente. El volumen vacío (V_0) se estimó como el volumen de elución de una muestra conteniendo azul dextrano al 1% y el volumen total (V_t) como el de una muestra de ferricianuro al 0,02%.

La masa molecular de las NADP-IDHs en condiciones nativas se determinó siguiendo el método de Andrews (1965), representando la K_{av} (V_e-V_0/V_t-V_0) en función del logaritmo de la masa molecular. Las proteínas utilizadas como marcadores y los valores considerados como sus masas moleculares fueron: quimotripsinógeno (25 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), Aldolasa (158 kDa) y tiroglobulina (660 kDa).

2.3.3. Electroforesis de proteínas

2.3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes.

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en placa se realizaron en geles de poliacrilamida al 6,2% de acrilamida, según el sistema discontinuo descrito por Laemmli (1970), utilizando un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad (EE.UU.) y según las instrucciones del fabricante. Los geles se prepararon mezclando 2,08 ml de una solución de acrilamida al 29,2% y N', N'-Bis-metilen-acrilamida al 0,8%, 2,5 ml de tampón Tris/HCl 1,5 M (pH 8,8), 5,37 ml de agua destilada, 50µl de persulfato amónico al 10% y 5 µl de TEMED (N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamina). Los gases disueltos se eliminaron mediante vacío antes de añadir el persulfato y el TEMED para desencadenar la polimerización, que se realizó a temperatura ambiente. Una vez polimerizados, los geles se recubren con una pequeña capa de 1-2 cm de altura de gel de empaquetamiento conteniendo 4% de acrilamida en Tris/HCl 0,125 M pH 6,8 polimerizado con persulfato amónico al 0,05% y TEMED al 0,001% (v/v). El grosor de los geles utilizados fue de 0,75 mm. Una vez aplicadas, las muestras conteniendo glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,01% como marcador del frente de electroforesis, se sometieron a una diferencia de potencial eléctrico de 200 V hasta que el colorante alcanzó el extremo inferior de la placa (unos 50 min). El tampón de electrodo usado fue Tris 25 mM/glicina 192 mM (pH 8,3). El proceso de electroforesis se llevó a cabo a 4 °C.

2.3.3.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

La electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo de forma similar a la realizada en condiciones nativas (apartado 2.3.3.1) con las siguientes salvedades: tanto el gel de separación como el de empaquetamiento, así como el tampón de electrodo, contenían laurilsulfato sódico al 0,1%; la

concentración de acrilamida fue del 12% en los geles de separación; las muestras se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga, que contenía: tampón Tris/HCl 0,125 M (pH 6,8), glicerol al 20%, SDS al 4%, 2-mercaptoetanol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,0025%, todo ello en agua destilada. La desnaturalización de las muestras se llevó a cabo calentando a 100 °C durante 4 min y la electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente.

Se utilizaron como patrones de masas moleculares las siguientes proteínas suministradas por Bio-Rad (EE.UU.): 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). Para la determinación de las masas moleculares, se representó el logaritmo de las masas moleculares de las proteínas patrón frente a la movilidad electroforética relativa de cada proteína respecto al frente de electroforesis, obteniéndose una curva patrón.

2.3.3.3. Tinción de proteína en geles de poliacrilamida.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se visualizaban sumergiendo los geles en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,1%, ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 40% (v/v) en agua. Tras 15 min de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaron varias veces con una solución de metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) en agua. Una vez concluído este tratamiento las proteínas aparecían como bandas de color azul. Los geles se conservaban en ácido acético al 10% (v/v) en agua.

2.3.3.4. Detección de actividad isocitrato deshidrogenasa en geles de poliacrilamida.

La actividad NADP-IDH se detectó en los geles siguiendo dos procedimientos alternativos; aparición de bandas fluorescentes, al iluminar con luz ultravioleta, debidas a la reducción del NADP o bien reducción de sales de tetrazolio por NADPH y aparición de bandas coloreadas.

Una vez finalizada la electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, los geles se incubaban durante 10 min en una solución que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción descrita en el apartado 2.2. excepto el isocitrato. Transcurrido este tiempo, los geles se situaban en un transiluminador de luz ultravioleta modelo Macro Vue, LKB (Suecia) y se añadía el isocitrato a la concentración de ensayo. Mediante un equipo Polaroid modelo MP-4 (EE.UU.) provisto de un filtro de color naranja delante del objetivo, se tomaron fotografías conforme aparecían las bandas fluorescentes dependientes de la adición de isocitrato. Este procedimiento no era adecuado en el caso de que las muestras analizadas fueran extractos crudos de cianobacterias debido a que la fluorescencia del NADPH formado en la reacción se veía enmascarada por la procedente de los

pigmentos fotosintéticos.

El procedimiento alternativo basado en la reducción de sales de tetrazolio se llevó a cabo de forma similar pero añadiendo a la mezcla de reacción 0,5 mg/ml de MTT (Bromuro de 3-(4, 5-Dimetil-tiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio) y 0,1 mg/ml de PMS (Fenazina metasulfato). Tras la adición posterior del isocitrato se observaron bandas de actividad de color rojizo.

Cuando se trataba de la actividad NADP-IDH de *E. coli* el método de detección se modificó ligeramente; la concentración de acrilamida de los geles se elevó al 10%, la mezcla de reacción contenía 200 mM Tris/HCl (pH 7,9), 0,4 mM NADP, 15 mM $MgCl_2$, 8 mM de isocitrato y las mismas concentraciones descritas anteriormente de MTT y PMS. La actividad IDH de cianobacterias se detectaba igualmente con esta mezcla de ensayo.

2.3.3.5. Isoelectroenfoque.

La determinación de puntos isoeléctricos mediante isoelectroenfoque se llevó a cabo con un sistema de minigel de poliacrilamida vertical descrito por Robertson *et al.* (1987).

Se utilizó un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad (EE.UU.) con geles del 5% de acrilamida, 1,5 mm de grosor y rango de pH 2,5-6,5. Este rango de pH se consiguió empleando una mezcla de anfolitos de rango 2,5-5 y 4-6,5. La solución ánodo fue 25 mM ácido cítrico (pH 1,7) y la cátodo 25 mM NaOH (pH 12,8). Las muestras se dializaron como se describe en el apartado 2.3.6 y la electroforesis se desarrolló a 4 °C con voltaje constante durante 1,5 h a 200 V y 1,5 h a 400 V. Una vez finalizada la misma, el gel se incubó en una solución de ácido tricloroacético al 10% durante 10 min y posteriormente durante 12 h en una solución del mismo compuesto al 1% para eliminar los anfolitos incluidos en el gel. A continuación las proteínas se visualizaron con azul de Coomassie como se describe en el apartado 2.3.3.3 Las proteínas marcadoras y sus puntos isoeléctricos eran: anhidrasa carbónica humana B (6,57), anhidrasa carbónica bovina B (5,85), ß-lactoglobulina A (5,13), inhibidor de tripsina de soja (4,55), glucosa oxidasa (4,15), amiloglucosidasa (3,50) y pepsinógeno (2,80). El cálculo de los puntos isoeléctricos de las NADP-IDHs de cianobacterias se llevó a cabo representando los valores de pI de las proteínas marcadoras frente a la movilidad electroforética relativa de cada proteína respecto al frente de electroforesis, obteniéndose una curva patrón.

2.3.4. Técnicas inmunológicas

2.3.4.1. Obtención de antisuero de conejo anti-NADP-IDH de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

La obtención del antisuero se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Vidal *et al.* (1980). Aproximadamente 0,6 mg de NADP-IDH de *Synechocystis*

6803 purificada hasta homogeneidad como se describe en el apartado 3.1. se diluyó hasta 1 ml con tampón Tris/HCl 50 mM (pH 6,8) y se mezcló con una cantidad igual de adyuvante completo de Freund. Se homogeneizó la suspensión hasta conseguir una emulsión densa y uniforme y se inyectó en varios puntos del cuerpo de un conejo de forma subcutánea. Transcurridos treinta y cinco días de esta primera inyección se realizaron dos nuevas inyecciones intravenosas en días consecutivos con 0,2 mg cada una de enzima purificada diluida con tampón Tris/HCl 50 mM (pH 6,8). A los cinco días de la última inyección de antígeno se realizó la extracción de sangre al conejo a partir de la cual se obtuvieron 20 ml de suero inmune.

El suero se sometió a precipitación con sulfato amónico hasta una saturación del 33% con agitación suave a 4 °C, la suspensión se mantuvo a esta temperatura durante 12 h y posteriormente se centrifugó a 12.000 x *g* durante 30 min. El sedimento se resuspendió en tampón PBS (NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM y Na_2HPO_4 8,1 mM, pH 7,6) y se sometió a un proceso de cromatografía en columna de proteina A-sefarosa. La columna se equilibró con PBS 50 mM (pH 7,6) y a continuación se introdujo la muestra que se hizo pasar repetidas veces por la matriz a fin de conseguir que quedaran adheridas el mayor número posible de inmunoglobulinas G. Se lavó la columna con el mismo tampón y se eluyó con una solución de ácido cítrico 0,2 M (pH 2,6). Se determinó la absorbancia a 280 nm de las fracciones recogidas y se mezclaron aquellas fracciones que presentaban absorbancia a 280 nm superior a 1. Dichas fracciones se sometieron a precipitación salina con sulfato amónico hasta una saturación del 33% de forma similar a la descrita anteriormente. La preparación obtenida constituyó el antisuero anti-NADP-IDH utilizado en este trabajo.

2.3.4.2. Inmunoprecipitación de actividad IDH con antisuero anti-NADP-IDH.

Cantidades crecientes de antisuero de conejo obtenido contra la NADP-IDH de *Synechocytis* sp. PCC 6803 como se describe en el apartado anterior, se incubaban durante 30 min a 30 °C y a continuación durante 12 h a 4 °C con muestras de NADP-IDH purificada de *Synechocystis* 6803 o *Anabaena* 7120 o con extractos crudos de células de *E. coli* transformadas con plásmidos a partir de los cuales se sobreexpresa la IDH de *Anabaena* 7120 (pMA3) o de *E. coli*. (pTK513). Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaban a 14.000 x *g* y el grado de inmunoprecipitación se calculaba midiendo la actividad IDH en los sobrenadantes.

2.3.4.3. Detección de IDH en geles de poliacrilamida mediante Western blot.

La NADP-IDH de muestras sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes se detectaba mediante inmunorreacción con los anticuerpos anti-IDH obtenidos como se describe en el apartado 2.3.4.1. Una vez concluída la

electroforesis, las proteínas se transferían a membranas de nitrocelulosa Bio-Rad (EE.UU.) de 0,45 µm de diámetro de poro, en un aparato Mini Trans-blot suministrado por Bio-Rad (EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo a temperatura ambiente durante dos horas a 250 mA de intensidad constante y utilizando como tampón de electrodo una solución de Tris 25 mM-Glicina 192 mM (pH 8,3) y metanol al 20% (v/v). El proceso de transferencia se siguió mediante el empleo de patrones preteñidos de masa molecular en la electroforesis. Seguidamente la membrana se incubó durante dos horas en una solución bloqueante de leche desnatada en polvo Molico-Sveltesse de Nestlé (España) al 5% y azida sódica al 0,02% en tampón TBS (Tris/HCl 15 mM, pH 7,4 y 0,2 M de NaCl). A continuación se incubó la membrana con el antisuero anti-IDH diluido (1:500) en solución de bloqueo durante 15-20 h a temperatura ambiente y agitación constante. Se sometió la membrana a cuatro lavados de 15 min cada uno en tampón TBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (v/v) y se incubó la misma con una solución de anticuerpos (inmunoglobulina G) de oveja anti-inmunoglobulina G de conejo, conjugados con peroxidasa de rábano Sigma (EE.UU.) diluidos (1:1.000) en solución de lavado durante dos horas a temperatura ambiente y agitación constante. A continuación se repitió el proceso de lavado descrito anteriormente y se reveló la actividad peroxidasa sumergiendo la membrana en una solución de cloronaftol (30 mg en 10 ml de metanol), H_2O_2 (250 µl 3% p/v) y TBS (50 ml). La membrana se mantuvo en oscuridad hasta la aparición de las bandas que corresponden a la actividad peroxidasa del anticuerpo conjugado.

2.3.5. Concentración de proteínas por ultrafiltración

La concentración de proteínas se realizó por centrifugación a 4 °C durante 15-30 min a 4.500 x *g* utilizando aparatos Centricón 30, suministrados por Amicon (EE.UU.) o microconcentradores Microsep 30K suministrados por Filtrón, siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso. Se empleó una centrifuga refrigerada RC5C Sorvall (EE.UU.) y un rotor SS34.

2.3.6. Eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones proteicas

Las muestras de alta concentración salina destinadas a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes o a isoelectroenfoque se dializaron sobre membranas de microdiálisis tipo VS, de 0,025 µm de tamaño de poro, suministradas por Millipore (Irlanda), que se situaban durante varias horas flotando en cajas de Petri conteniendo 50 ml de tampón estándar.

2.3.7. Determinación del espectro de dicroísmo circular

El espectro de dicroísmo circular de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 se llevó a cabo usando un dicrógrafo marca V (Jovin y Yvon) a 25 °C. El análisis del contenido en estructura secundaria a partir de este espectro se realizó por el método de Yang *et al.* (1986).

2.3.8. Determinación de la secuencia NH_2-terminal de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803

La secuenciación se realizó mediante la degradación automática de Edman. La muestra (0,1-1 nmol), desnaturalizada con fenilisotiocianato, se aplicó en una membrana de fibra de vidrio y la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo en un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 470 A conectado a un analizador de aminoácidos.

2.4. METODOS DE MANIPULACION Y ANALISIS DE ADN Y ARN *in vitro*

2.4.1. Plásmidos y genoteca utilizados

En la tabla 3 se relacionan los plásmidos utilizados no construidos en este trabajo, así como sus características mas notables.

La genoteca de ADN de *Anabaena* sp. PCC 7120 que se empleó para clonar el gen *icd* está construída en el vector pBluescriptII SK(+) utilizando la estirpe de *E. coli* MC1061 *mcrB* (Linden *et al.*, 1993). Dicha estirpe carece del sistema de restricción *mcr*, capaz de degradar ADN que esté metilado en los residuos de citosina (Raleigh *et al.*, 1988).

2.4.2. Aislamiento y análisis de ADN y ARN

2.4.2.1. Aislamiento y purificación de ADN plasmídico de *E. coli*

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

Tabla 3. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pBluescriptII SK(+)	Ap^r, *ori*F1,ColE1*ori*, *lacZ*	Stratagene
pRL161	Ap^r, Km^r, derivado de pBR322 *npt* (de Tn5)	Elhai y Wolk, no publicado.
pRL171	Ap^r, Cm^r, derivado de pBR322 gen *cat* de RSF1010	Elhai y Wolk, 1988a
pTK513	Ap^r, derivado de pEMBL18 *icd* (*E. coli*)	Thorness y Koshland, Jr 1987
pRL277	Sm^r, Sp^r, vector para la selección positiva de dobles recombinantes en *Anabaena*, *sacB* (*B. subtilis*)	Cai y Wolk, 1993
pRL443	Ap^r, Tc^r, mutante espontáneo de RP4 plásmido conjugativo de amplio espectro capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1.	Datta *et al.*, 1971
pRL528	Cm^r, derivado de ColK portador de *mob* y genes de metilasas de sitios *Ava*I y *Eco*47 II (isoesquizómero de *Ava*II)	Elhai y Wolk, 1988b

hervido en presencia de Tritón X-100 y se realizó igualmente según Sambrook *et al.*, (1989). El aislamiento de ADN plasmídico para experimentos de secuenciación se llevó a cabo mediante el método de lisis alcalina seguido de un proceso de desproteinización con fenol.

Para la obtención de ADN que iba a ser sometido a digestión con exonucleasa III de *E. coli* (apartado 2.4.4.1) se empleaba el procedimiento de lisis alcalina seguido de tratamiento con ARNasa A de páncreas bovino Boehringer Mannheim (Alemania) a una concentración final de 20 µg/ml y precipitación con polietilenglicol (Ausubel *et al.*, 1989).

2.4.2.2. Aislamiento de ADN total de cianobacterias.

Para el aislamiento de ADN total de cianobacterias se empleó un método descrito por Cai y Wolk (1990) basado en la rotura de las células con perlas de vidrio. Células procedentes de 50 ml de cultivo en medio BG11 o derivados se recogieron por centrifugación a 4.000 x *g* a temperatura ambiente y se resuspendieron en 400 µl de tampón T0,1E (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5). A la suspensión celular se añadieron entonces 150 µl de perlas de vidrio estériles (0,25-0,30 mm de diámetro; Sigma, Alemania), 20µl de una solución de SDS al 10% y 450 µl de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v). La suspensión se sometió a continuación a ciclos sucesivos de 1 min de agitación vigorosa en agitador mecánico y 1 min de incubación en hielo. Este proceso se repitió diez veces en el caso de extracciones de ADN de *Synechocystis* y cinco veces en el caso de *Anabaena*. Terminado el proceso se centrifugó a 15.000 x *g* 15 min a 4 °C y se sometió el sobrenadante a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y cloroformo. El ADN se precipitó a continuación con 2,5 volúmenes de etanol absoluto en presencia de acetato sódico a una concentración final de 0,3 M (pH 5,2), el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón T0,1E. Cuando se quiso eliminar el contenido de ARN, se realizó un tratamiento con ARNasa A de páncreas bovino Boehringer Mannheim (Alemania) a una concentración final de 20 µg/ml seguido de extracción con fenol:cloroformo.

Para las extracciones de ADN de *Synechocystis* antes de proceder al aislamiento de ADN se añadió a los cultivos penicilina-G a una concentración final de 100 µg/ml durante 14 h.

Antes de ser utilizadas, las perlas de vidrio se sometieron a un tratamiento con ácido nítrico durante 12 h seguido de numerosos lavados con agua destilada. Tras ello, las perlas se esterilizaron en autoclave y se secaron.

2.4.2.3. Aislamiento de ARN total de cianobacterias.

Para el aislamiento de ARN total de cianobacterias se empleó el método descrito por Mohamed y Jansson (1989), basado en el uso de fenol caliente, con ligeras modificaciones (Reyes, J.C., comunicación personal). Células procedentes de 50 ml de cultivo en medio BG11 o derivados se recogieron por centrifugación a 6.000 x *g* durante 5 min a 4 °C y se resuspendieron en 1 ml de solución de resuspensión (sacarosa 0,3 M, acetato sódico 10 mM, pH 4,5). La suspensión celular se centrifugó a continuación a 12.000 x *g* durante 30 s y se resuspendió en 250 µl de la solución de resuspensión añadiéndose entonces 75 µl de Na_2-EDTA 250 mM. Esta preparación se vertió en un mortero que contenía nitrógeno líquido y se sometió a trituración, añadiéndose a continuación 375 µl de tampón de lisis [SDS 2% (p/v), acetato sódico 10 mM pH 4,5]. Se incubó a 65 °C durante 3 min y se añadieron 700 µl de fenol a esta misma temperatura.incubándose a 65 °C otros 3

min. La preparación se centrifugó a continuación a 12.000 x *g* durante 5 min a 4 °C y la extracción con fenol caliente se repitió dos veces. Se realizó a continuación otra extracción con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). El ARN se precipitó añadiendo 1/5 del volumen de la preparación de ClLi 10 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. El contenido de ADN se eliminó mediante tratamiento con ADNasa I suministrada por Boehringer Mannheim (Alemania) y siguiendo lo descrito por Ausubel *et al.* (1989). Las soluciones usadas en la extracción se trataron con dietil pirocarbonato 0,1% (v/v). El ARN se concervó en alícuotas a - 20 °C.

2.4.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 0,6-0,7% preparados en tampones TBE1/2 (45 mM de Tris-borato y 1 mM de EDTA, pH 8,0) o TAE (40 mM de Tris-acetato y 10 mM de EDTA, pH 7,7). Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos GNA-100 o GNA-200 suministrados por Pharmacia (Suecia). A cada muestra se añadió 1/10 del volumen de tampón de carga (0,25% p/v de azul de bromofenol, 0,25% p/v de xileno-cianol FF y 30% v/v de glicerol en agua). Cuando se deseaba eliminar el ARN de las muestras se trataban estas con ARNasa A de páncreas bovino a una concentración final de 20 µg/ml.

Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se emplearon como marcadores los fragmentos provenientes de la digestión del fago λ con *Hin*D III o con *Hin*D III y *Eco* R I.

Tras la electroforesis los geles, que incluían bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml, se sometieron a iluminación con luz ultravioleta de 302 nm, utilizándose para ello un transiluminador LKB (Suecia) modelo Macro Vue, y se fotografiaron con un equipo Polaroid (EE.UU.) modelo MP-4, disponiéndose un filtro de color naranja delante del objetivo.

2.4.2.5. Electroforesis de ARN en geles de agarosa.

Se llevó a cabo según Sambrook et al. (1989), utilizando geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehido al 1,9% y preparados en tampón MOPS (MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 0,5 mM). Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos GNA-100 o GNA-200 suministrados por Pharmacia (Suecia). Las muestras con un volumen final de 20,5 µl contenían: 5µl (15 µg) de ARN, 1 µl de tampón MOPS 10x, 3,5 µl de formaldehido, 10 µl de formamida desionizada, y 1 µl de bromuro de etidio (0,5 mg/ml). La electroforesis se desarrolló a 65 V durante 1,5 h.

Tras la electroforesis los geles, que incluían bromuro de etidio en las muestras, se fotografiaron como se describe en el apartado 2.4.2.4. para las electroforesis de ADN.

2.4.2.6. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Se empleó un método basado en la solubilización de la agarosa con ioduro sódico y adsorción de los fragmentos de ADN a perlas de vidrio. Tras desarrollar la electroforesis utilizando tampón TAE se llevó a cabo el proceso de extracción utilizando los productos suministrados bajo la denominación Geneclean™ (BIO 101 Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.2.7. Transferencia de ADN a filtros de nylon.

Una vez que el ADN se había sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0,6%, se transfirió a filtros de nylon Zeta-Probe suministrados por Bio-Rad (EE.UU.) utilizándose para ello un aparato de transferencia por vacío TransVacTE80 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.), y siguiendo las instrucciones del fabricante. El gel se sumergió previamente durante 15 min con agitación suave en una solución 0,25 N de HCl para depurinizar parcialmente el ADN, tras lo cual se lavó con agua destilada y se transfirió durante una hora a una solución desnaturalizante de 0,5 N de NaOH y 1,5 M de NaCl manteniéndose en agitación suave. Se procedió a continuación a la transferencia, terminada la cual se horneó el filtro durante dos horas a 80 °C.

2.4.2.8. Transferencia de ARN a filtros de nylon.

Una vez que el ARN se había sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se transfirió a filtros de nylon HybondTM-N+ (Amersham) utilizándose para ello un aparato de transferencia por vacío TransVacTE80 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.), y siguiendo las instrucciones del fabricante. El gel se sometió previamente a dos períodos de lavado durante 15 min en agua destilada a 65 °C para eliminar el formaldehido, equilibrándose a continuación en tampón SSPE 10x (NaCl 3,6 M, fosfato sódico 0,2 M, EDTA 20 mM, pH 7,7). La transferencia se llevó a cabo durante 4 h y a continuación el filtro se depositó sobre papel Watman 3MM (Millipore) (EE.UU.) embebido en una solución de NaOH 50 mM durante 5 min para fijar el ARN.

2.4.2.9. Detección de secuencias de ADN mediante hibridación con sondas radiactivas.

La hibridación del ADN fijado a filtros de nylon con sondas marcadas radiactivamente se llevó a cabo según Ausubel *et al.* (1989). Los filtros se prehibridaron durante 4-6 horas con una solución compuesta por: tampón fosfato potásico 25 mM pH 7, SSC 5x (el tampón SSC 1x contiene 0,15 M de NaCl y 15 mM de citrato sódico, pH 7,0), disolución de Denhardt 5x (esta disolución contiene, por

litro, 0,2 g de ficol tipo 400, 0,2 g de polivinilpirrolidona y 0,2 g de seroalbúmina bovina), ADN de esperma de salmón 50 µg/ml y SDS al 1% (p/v). Transcurrido el tiempo de prehibridación se añadió la sonda de ADN marcado radiactivamente y se llevó a cabo la hibridación durante 15 h. La temperatura de prehibridación e hibridación fue de 55 °C ó 65 °C dependiendo del grado de homología existente entre la sonda y el ADN a hibridar.

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

2.4.2.10. Detección de ARNm mediante hibridación con sondas de ADN radiactivas.

La hibridación del ARN fijado a filtros de nylon con sondas marcadas radiactivamente se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante de las membranas Hybond™-N+ (Amersham) empleadas en estos experimentos. Los filtros se prehibridaron 4-6 horas con una solución compuesta de: SSPE 5x, disolución de Denhardt 5x, formamida 50% (v/v), SDS 0,5% (p/v) y ADN de esperma de salmón 50 µg/ml. Transcurrido el tiempo de prehibridación se añadió la sonda de ADN marcado radiactivamente y se llevó a cabo la hibridación durante 15 h. La temperatura de prehibridación e hibridación fue de 42 °C.

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

2.4.2.11. Detección de secuencias de ADN plasmídico de *E. coli in situ* mediante hibridación con sondas radiactivas.

La hibridación *in situ* del ADN de colonias de *E. coli* se llevó a cabo según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Se realizaron picaduras de las colonias que se deseaba analizar en filtros de nitrocelulosa circulares (Nucleopore) (EE.UU.) situados sobre medio sólido LB en cajas de Petri. Una vez incubados a 37 °C durante 12 h los filtros se sometieron a un tratamiento de 3 min con una solución de SDS al 10% colocándolos sobre papel Watman 3MM (Millipore) (EE.UU.)

embebido en dicha solución. A continuación se realizó un tratamiento de 5 min por el mismo procedimiento con una solución desnaturalizante 0,5 N NaOH y 1,5 M NaCl seguido de neutralización de 5 min en 0,5 M Tris/HCl y 1,5 M NaCl y equilibrado en SSC 2x durante 5 min. Los filtros se secaron durante 30 min a temperatura ambiente y se hornearon 1,5 h a 80 °C.

Antes de proceder a la hibridación se realizó un proceso de prelavado a 50 °C durante 30 min en una solución de SSC 5x, SDS 0,5% y EDTA 1 mM para eliminar los restos celulares. La prehibridación e hibridación se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado anterior. Se realizaron cuatro lavados de 10 min cada uno a temperatura ambiente con SSC 2x, SDS 0,1% y un lavado de 30 min a 55 °C ó 65 °C, según se tratara de hibridación homóloga o heteróloga, con SSC 1x y SDS 0,1%. Se procedió a la autorradiografía y posterior revelado de la película en las condiciones descritas.

2.4.3. Manipulaciones enzimáticas del ADN

2.4.3.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las endonucleasas de restricción empleadas fueron suministradas por Boehringer Mannheim (Alemania) o Pharmacia (Suecia) y se utilizaron siguiendo las instrucciones indicadas por los fabricantes. Las restricciones totales se llevaron a cabo utilizando entre 0,5 y 10 U de enzima por µg de ADN a restringir y tiempos de incubación, a la temperatura recomendada, de entre 6 y 14 h. Las restricciones parciales se lograron empleando 0,3-0,6 U/µg de ADN a restringir y una hora de incubación. En los casos de restricción parcial la reacción enzimática se detuvo por adición de EDTA 10 mM y calentamiento a 70 °C durante 10 min.

Para la obtención de mapas de restricción, el ADN se sometía a digestión múltiple con las correspondientes enzimas en todas las combinaciones posibles (simples y dobles) y los fragmentos obtenidos se visualizaban tras electroforesis en geles de agarosa.

2.4.3.2. Defosforilación de plásmidos con fosfatasa alcalina.

Para la construcción de plásmidos en los que el fragmento que se clonaba en el vector pBluescript II SK+ no era portador de genes seleccionables (resistencia a antibióticos), se procedía a eliminar los extremos 5'-fosfato de dicho vector a fin de evitar la obtención de plásmidos sin inserto. Se realizaba para ello un tratamiento con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Pharmacia) (Suecia) según se describe en Sambrook *et al.* (1989). La reacción se desarrollaba a 37 °C durante 30 min y se detenía mediante incubación a 65 °C durante 45 min en presencia de 10 mM EDTA. El vector se desproteinizaba mediante extracción con fenol antes de su utilización.

2.4.3.3. Obtención de extremos romos a partir de fragmentos de ADN con extremos protuberantes.

Para obtener fragmentos de ADN con extremos romos tras digestión con enzimas que dan lugar a extremos cohesivos se realizaba tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* suministrado por Pharmacia (Suecia) y siguiendo el procedimiento descrito en Ausubel *et al.* (1989). La reacción tenía lugar a 30 °C durante 15 min y se detenía a continuación por calentamiento a 75 °C durante 10 min.

2.4.3.4. Ligación de fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN que se deseaba ligar, una vez obtenidos por restricción y tratados con fosfatasa alcalina y/o fragmento Klenow, se mezclaban en la proporción adecuada disueltos en tampón T0,1E. La reacción de ligación se llevaba a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo: 5 U de la ligasa de ADN del fago T4, suministrada por Pharmacia (Suecia) o por Boehringer Mannheim (Alemania), 0,4 mM de ATP, 10 mM de DTT, 0,1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 6,6 mM de $MgCl_2$ y 66 mM de tampón Tris/HCl (pH 7,8). La mezcla de reacción se incubaba durante 16 h a una temperatura de 12-18 °C.

2.4.3.5. Marcaje radiactivo de fragmentos de ADN.

Los fragmentos de ADN que se iban a utilizar como sondas en las hibridaciones se obtenían mediante restricción de los plásmidos adecuados y se purificaban mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción de las bandas correspondientes como se describe en el apartado 2.4.2.6. Aproximadamente 100 ng de dichos fragmentos se marcaban radiactivamente utilizando 30µCi de 5'[α-^{32}P]dCTP (3000 mCi/µmol) suministrado por New England Nuclear (Gran Bretaña). Se emplearon alternativamente dos equipos de marcaje suministrados por Boehringer Mannheim (Alemania): «Nick translation kit» o «Random primed DNA labeling kit» de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. En todos los casos el exceso de nucleótidos no incorporados se eliminaba mediante filtración de las muestras a través de columnas de Sephadex G-50 Quick Spin, suministradas también por Boehringer Mannheim.

2.4.4. Secuenciación de ADN

2.4.4.1. Obtención de deleciones seriadas de fragmentos de ADN mediante digestión con exonucleasa III.

La obtención de plásmidos delecionados en forma seriada se llevó a cabo mediante digestión con exonucleasa III de *E. coli*. Este método se basa en las propiedades de dicha enzima que es específica para ADN de doble cadena y digiere una de ellas comenzando por un extremo 5' protuberante (Henikoff, 1984). El hecho de que la enzima no actúe sobre extremos 3' protuberantes la hace idónea para realizar digestiones unidireccionales de plásmidos tratados con una enzima de restricción que genere extremos 3' protuberantes y con una segunda que genere extremos 5' protuberantes. De esta forma solo se deleciona a partir del extremo 5' protuberante, evitando así la deleción de zonas funcionalmente esenciales del vector. El ADN plasmídico empleado en este proceso se aisló por el procedimiento de lisis alcalina y se purificó por precipitación con polietilénglicol como se describe en el apartado 2.4.2.1.

Se empleó el equipo «*double-stranded* nested deletion kit» suministrado por Pharmacia (Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos (pMA3 y pMS3) se digirieron en primer lugar con la enzima que proporcionaba extremos 3' protuberantes (*Bst*X I o *Kpn* I) y a continuación con la que proporcionaba extremos 5' protuberantes (*Eco*R I, *Sal* I o *Xho* I) sometiéndose posteriormente a digestión con exonucleasa III. Se extrajeron muestras alícuotas a diferentes tiempos y los plásmidos obtenidos se trataron con nucleasa S1 generándose así extremos romos. La mitad de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa para comprobar el resultado del proceso y la otra mitad se ligó con ligasa del fago T4 para recircularizar los fragmentos obtenidos. Tras la ligación se transformó *E. coli* y se seleccionaron los clones deseados.

2.4.4.2. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea-poliacrilamida. Autorradiografía de geles.

El ADN plasmídico empleado en los experimentos de secuenciación se obtuvo mediante lisis alcalina (apartado 2.4.2.1) y posterior desproteinización con fenol. La secuenciación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sanger *et al.* en 1977, que se basa en el uso de didesoxirribonucleótidos de adenina, guanina, citosina y timina para producir paradas aleatorias durante la reacción de polimerización a partir del cebador. El nucleótido empleado para marcar radiactivamente las cadenas sintetizadas en dichas reacciones fue 5' [α-^{35}S]dATP (1.212 μCi/mmol) suministrado por New England Nuclear (Gran Bretaña). Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos comerciales «Reverse primer» y «M13-20 primer», suministrados por Boehringer Mannheim (Alemania), adecuados para secuenciar plásmidos derivados de los pBluescript II. Los reactivos y la ADN-polimerasa empleados en las reacciones fueron los incluídos en el equipo Sequenase versión 2.0, suministrado por United States Biochemical (EE.UU.). Se siguieron las instrucciones del fabricante excepto en la eliminación del hidróxido sódico utilizado para la desnaturalización del ADN molde, que se realizó por filtración a

través de columnas de Sephadex G-50 Quick Spin, suministradas por Boehringer Mannheim, previamente equilibradas en tampón T0,1E.

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

Terminada la electroforesis los geles, adheridos a la placa de vidrio de mayor tamaño gracias al empleo previo a la electroforesis de una solución adherente [ácido acético 2,5% (v/v) y «bind-silane» de LKB (Suecia) al 0,35% (v/v) en etanol], se transferían a ácido acético al 10%, donde permanecían a temperatura ambiente durante 30 min. Se eliminaba posteriormente el acético con agua y se secaban los geles a temperatura ambiente con un ventilador. La autorradiografía se realizaba con películas Kodak X-OMAT-AR, en carcasas de exposición Sigma (EE.UU.) a temperatura ambiente y el revelado de las películas empleando reactivos reveladores y fijadores suministrados por Valca (España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.5. METODOS DE TRANSFERENCIA DE ADN

2.5.1. Transferencia de ADN a *E. coli* mediante transformación

La preparación de células competentes de *E. coli* de las diferentes estirpes utilizadas se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Hanahan (1985). Las células se cultivaban en 100 ml de medio líquido SOB (apartado 2.1.2.2) con agitación vigorosa hasta alcanzar una absorbancia a 580 nm de entre 0,45 y 0,65. Tras mantener el cultivo en hielo durante 15 min las células se recogían por centrifugación a 750 x *g* durante 15 min a 4 °C y se resuspendían en 33 ml de solución RF1 fría [tampón acetato potásico 30 mM (pH 5,8); 100 mM de $RbCl_2$; 50 mM de $MnCl_2$; 10 mM de CaCl y glicerol al 15% (v/v)] esterilizada por filtración. Tras mantener la solución en hielo durante 30 min, se repitió el proceso de centrifugación anterior y se resuspendieron las células en 8 ml de solución RF2 fría [tampón MOPS-NaOH 10 mM (pH 7,0); 10 mM de RbCl; 25 mM de $CaCl_2$ y glicerol al 15% (v/v)]. Las células así preparadas se conservaron a -70 °C en alícuotas de 200 µl. La competencia de las células se comprobó transformándolas con cantidades conocidas de ADN plasmídico, obteniéndose en torno a 10^7 transformantes/µg de ADN.

Para transformar las células competentes, el ADN transformante (máximo 20 µl) se mezclaba suavemente con una alícuota de células competentes descongelada

en hielo, empleando tubos (13 x 75 mm) de poliestireno-cristal suministrado por Soria Greiner S.A. (España). Tras incubar 45 min en hielo se sometían a choque térmico de 50 s a 42 °C y se volvían a incubar en hielo durante 2 min. La suspensión se suplementaba posteriormente con 0,8 ml de medio LB o SOB y se incubaba durante una hora a 37 °C. A continuación las células se sembraban en medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes. Cuando las mezclas de transformación iban a ser sembradas en medio mínimo para los experimentos de complementación, tras la incubación a 37 °C en medio LB se lavaban con medio mínimo antes de sembrarlas en las cajas de medio selectivo.

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

2.5.2. Trasferencia de ADN a *Synechocystis* mediante transformación

La transformación de *Synechocystis* se llavó a cabo siguiendo el método descrito por Chauvat *et al.* (1986). La estirpe SFCΩ5 de *Synechocystis* 6803 se cultivó en 50 ml de medio BG11CH [BG11C suplementado con HEPES (forma ácida) al 0,143% (p/v)] a 30 °C y 200 rpm, durante tres ciclos de reinoculaciones sucesivas. Cuando el tercer cultivo de la serie alcanzó una densidad óptica a 580 nm de entre 1,0 y 1,5 las células se recogieron por centrifugación a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con BG11H resuspendiéndose a continuación en 5 ml del mismo medio. Alícuotas de 1 ml de esta suspensión se mezclaron con 1 µg de ADN transformante disuelto en 100 µl de tampón T0,1E. Las mezclas se incubaron a la luz y 30 °C durante 1,5 horas con agitación suave ocasional. Posteriormente la suspensión celular se sembró en cajas de medio BG11C que se incubaron a la luz y 30 °C. Transcurridas 20 horas se añadieron a las cajas 0,35 ml de cloranfenicol (1 mg/ml) para que una vez difundida la solución en el medio sólido la concentración de antibiótico alcanzada fuera de 10 µg/ml. Como control negativo se realizó un experimento equivalente sin añadir ADN.

2.5.3. Transferencia de ADN a *Anabaena* mediante conjugación con *E. coli*. Obtención de mutantes *icd* de *Anabaena*

La conjugación entre *E. coli* y *Anabaena* se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Elhai y Wolk (1988b). El proceso consistió en la movilización del plásmido a transferir mediante el concurso de un plásmido conjugativo (pRL443) y del plásmido auxiliar pRL528, portador del gen *mob* y de funciones de metilación de los sitios de restricción de las enzimas *Ava* I y *Ava* II presentes en *Anabaena* sp. PCC 7120. Se realizó una conjugación tripartita, en las que participaban dos

estirpes de *E. coli* (HB101 conteniendo el plásmido a transferir y el plásmido auxiliar metilador y HB101 conteniendo el plásmido conjugativo pRL443) y la estirpe receptora *Anabaena* sp. PCC 7120.

Para la obtención de mutantes *icd* de *Anabaena* se realizó una conjugación tripartita como se acaba de describir y se siguió la estrategia que se razona en el apartado 3.14. La conjugación tuvo lugar entre *E. coli* HB101 conteniendo el plásmido conjugativo pRL443, *E. coli* HB101 conteniendo el plásmido metilador pRL528 y un plásmido que portaba el gen *icd* inactivado (pRL277 NmA o pRL277 NmB) y *Anabaena* sp. PCC 7120. Tras mezclar e incubar a temperatura ambiente durante una hora las dos estirpes de *E. coli*, la suspensión resultante se mezcló a su vez con células de *Anabaena* cultivadas en medio BG11 a 30 °C. La mezcla se sembró en filtros de nitrocelulosa Nucleopore (EE.UU.) situados sobre medio BG11 sólido conteniendo 5% de LB en cajas de Petri. Se incubaron las cajas a 30 °C con baja intensidad de iluminación durante 48 h y, tras este periodo de expresión, los filtros se transfirieron a cajas de medio BG11 suplementado con 25 µg/ml de neomicina.

Tras una incubación de 25 días en estas condiciones el césped de cianobacterias sensibles al antibiótico se lisó apreciándose la aparición de colonias resistentes a neomicina que se sembraron por estrías hasta eliminar las células de *E. coli* contaminantes. Una vez libres de *E. coli*, los exconjugantes resistentes a neomicina se inocularon en medio BG11 líquido conteniendo 5 µg/ml de neomicina. Los cultivos obtenidos se recogieron por centrifugación y las células se sembraron en medio BG11 sólido conteniendo 25µg/ml de neomicina y sacarosa al 5% (p/v) y se procedió de este modo a la selección de dobles recombinantes según la estrategia que se esquematiza en la figura 49 (p. 113). Las colonias resistentes a sacarosa se picaron a medio BG11 conteniendo estreptomicina y espectinomicina a 2 µg/ml en cada caso para realizar las comprobaciones fenotípicas cuya importancia se discute en el apartado 3.14.1.

2.6. OTROS METODOS ANALITICOS

2.6.1. Determinación de clorofila

El contenido celular de clorofila *a* se determinaba espectrofotométricamente tras someter las células a una extracción de la misma con metanol siguiendo el método descrito por Mackinney en 1941. Las células contenidas en 1 ml de suspensión celular se recogían mediante centrifugación a 12.000 x *g* en una centrífuga Eppendorf y el sedimento se resuspendía en 1 ml de metanol absoluto. Alternativamente un volumen de suspensión celular no superior a 0,2 ml se diluía con metanol hasta 1 ml. Tras agitar vigorosamente durante 1 min, la preparación se centrifugaba durante 2 min a 12.000 x *g*, determinándose la concentración de clorofila en el sobrenadante en base a su absorbancia a 665 nm, y teniendo en

cuenta un coeficiente de extinción de 74,46 ng^{-1} ml cm^{-1}.

2.6.2. Determinación de proteína

2.6.2.1. Determinación de proteína en células enteras.

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

2.6.2.2. Determinación de proteína en preparaciones libres de células.

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

2.6.3. Cuantificación de ADN

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

Alternativamente, el ADN se cuantificaba en base a su absorbancia a 260 nm. La concentración de ADN de la muestra se calculaba considerando como valores de absorbancia 1,0 a 260 nm los que proporcionan soluciones de 40 µg/ml de ADN bicatenario.

2.6.4. Determinaciones espectrofotométricas

El seguimiento espectrofotométrico de las cinéticas enzimáticas se realizaba en un espectrofotómetro de diodos Hewlett Packard 8452A (Alemania) conectado a un ordenador Hewlett Packard (Francia) modelo H. P. Vectra QS/16S, o en un espectrofotómetro Pye-Unicam (Gran Bretaña) modelo SP8, dotado de salida digital y registrador incorporado. En ambos casos el portacubetas se encontraba termostatizado mediante su conexión a un flujo de agua a temperatura controlada.

Las medidas de absorbancia puntuales, de luz visible o luz ultravioleta, se realizaban en el aparato Pye-Unicam antes descrito o en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Japón). En el caso de medidas con luz ultravioleta se utilizaban

cubetas de cuarzo.

2.6.5. Medidas de pH

El pH de las disoluciones se determinaba con pH-metros Metrohm Herisau modelo 654 (Suiza) o Radiometer modelo PHM82 (Dinamarca), ambos dotados de escala digital.

2.6.6. Medidas de intensidad luminosa

La densidad de flujo de radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm), expresada en $\mu E/m^2$ s (denominada en este trabajo «intensidad luminosa»), se estimaba empleando un medidor-integrador LI-COR Inc. (EE.UU.), provisto de una célula sensora LI-188B.

2.6.7. Medidas de flujos gaseosos

Para preparar la mezcla de aire y CO_2 en las proporciones adecuadas, se utilizaban flujómetros Fisher and Porter (Gran Bretaña) modelo 1/4-20-G-5/36 para el aire y Gilmont (EE.UU.) modelo A4844 para el CO_2.

2.6.8. Determinación de la concentración salina

La concentración salina de los eluyentes de las columnas de cromatografía se determinaba mediante el uso de un conductivímetro Crison CDTM523 (España). Se realizaban rectas patrón con soluciones de concentración salina conocida.

2.7 TRATAMIENTO INFORMATICO DE SECUENCIAS DE ADN Y PROTEINAS

Para la búsqueda de fases de lectura abierta, la localización de sitios de restricción, la traducción a proteína de secuencias nucleotídicas, la determinación de la composición de aminoácidos, y la distribución de codones empleados en una fase de lectura abierta se utilizó el programa DNA-Strider en su versión 1.1, diseñado por Christian Mark (Service de Biochimie, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Francia). El programa MacMolly's Heart en su versión 3.0, desarrollado por Ursula Priedomuth y Uwe Schoneberg, Soft Gene (Alemania) y compilado por A. Hochberg (DuPont de Nemours and Co., EE.UU.), se empleó para la generación del perfil hidrofóbico de una proteína (algoritmo descrito por Kyte y Doolittle en 1982) y para la predicción de su estructura secundaria (algoritmo descrito por Garnier *et al.* en 1978).

La conexión con el Centro Informático Científico de Andalucía (CICA)

permitió la utilización del paquete informático del Genetic Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin (EE.UU.) (Devereaux *et al.*, 1984) en su versión 7.1, y el acceso mediante correo electrónico al banco de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Heidelberg (Alemania). La búsqueda de similitud de una secuencia con las contenidas en el banco de datos del EMBL se realizó utilizando la aplicación FASTA (Pearson y Lipman, 1988) contenida en el paquete GCG. El alineamiento de secuencias homólogas y la generación de árboles evolutivos se realizó utilizando el programa Pileup de este mismo paquete informático.

3. RESULTADOS

3.1 PURIFICACION DE LA NADP-IDH DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

Con objeto de realizar un estudio fisicoquímico y cinético de la isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 se procedió a la purificación de la misma.

La purificación se llevó a cabo a partir de células cultivadas con NH_4Cl como fuente de nitrógeno, recogidas mediante centrifugación y conservadas a -20 °C como se describe en Materiales y Métodos. Para una purificación estándar se utilizaron 70 g de células (peso fresco) y se rompieron por tratamiento con ultrasonidos, el lisado se centrifugó a 15.000 x*g* 20 min y el sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo.

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

El proceso se llevó a cabo a 4 °C usando como «tampón estándar» 30 mM Tris/HCl (pH 7,5) conteniendo 2 mM de 2-mercaptoetanol.

3.1.1. Cromatografía en DEAE-celulosa

El extracto crudo se adsorbió a una columna de DEAE-celulosa (3,5 cm x 15 cm) previamente equilibrada con tampón estándar. Tras lavar la columna con cuatro volumenes de lecho de este mismo tampón se llevó a cabo la elución de la enzima con un gradiente salino lineal 0-0,5 M NaCl preparado en 400 ml de tampón estándar. La actividad IDH eluyó en un solo pico a una fuerza iónica de 0,13 M NaCl como se puede observar en la figura 5. Este hecho indicaba que la actividad presente en el extracto crudo era debida muy probablemente a una única enzima. Las fracciones con alta actividad IDH obtenidas se reunieron para constituir el eluato de la DEAE-celulosa (figura 8).

Al final de esta etapa se recuperó un 84% de la actividad inicial. Si bien la purificación obtenida fue pequeña, este paso permitió una concentración de la actividad y la eliminación de componentes celulares proteicos y no proteicos que podrían interferir en las siguientes etapas de purificación.

3.1.2. Cromatografía en Red-agarosa 1

El eluato de la DEAE-celulosa obtenido en el paso anterior se diluyó hasta 50 mM NaCl con tampón estándar y se aplicó a una columna de Red-agarosa (2,5 cm x 10 cm) previamente equilibrada con este mismo tampón. La columna se lavó con cuatro volumenes de lecho y la elución se llevó a cabo con un gradiente lineal (0-0,4 M NaCl) en 240 ml de tampón estándar. Las fracciones con alta actividad IDH eluyeron entre 0,3-0,35 M NaCl (figura 6) y constituyeron el eluato de la primera cromatografía en Red-agarosa (figura 8). Como se puede observar en la

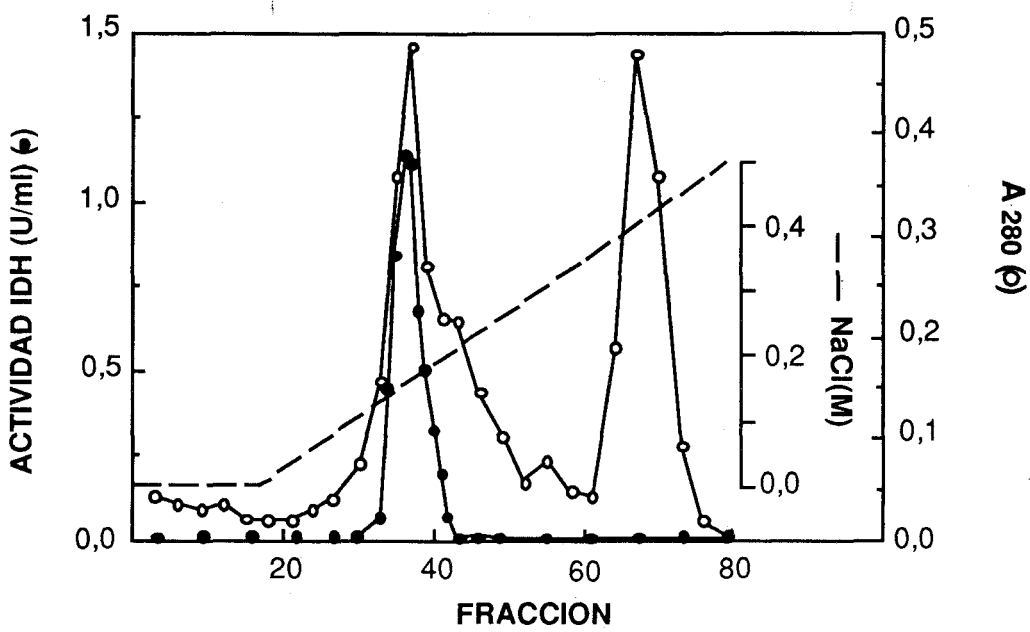


FIGURA 5. Perfil de elución de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 en cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

Las condiciones de la cromatografía se indican en el apartado 3.1.1. Se aplicó a la columna un extracto crudo conteniendo 104 U de actividad NADP-IDH.

tabla 4 en este paso de purificación se recuperó el 67% de la actividad inicial y permitió una purificación de aproximadamente 20 veces al eliminar una cantidad apreciable de proteínas, entre otras la gran mayoría de las ficocianinas, pigmentos fotosintéticos de carácter proteico.

3.1.3. Cromatografía en Red-agarosa 2

El eluato de la primera cromatografía en Red-agarosa se diluyó cuatro veces con tampón estándar y se adsorbió a una columna con la misma matriz que en el paso anterior (1 cm x 10 cm) llevándose a cabo una cromatografía de afinidad. La columna se lavó con tampón estándar y la actividad IDH se eluyó con un gradiente 0-2 mM NADP preparado en el mismo tampón conteniendo 50 mM NaCl. Las fracciones con actividad IDH eluyen a una concentración de NADP de aproximadamente 1 mM. Dada la interferencia del NADP en las medidas a 280 nm no fue posible determinar el perfil de elución de proteína de esta cromatografía espectrofotométricamente, como se llevó a cabo en los pasos anteriores. Esta

segunda cromatografía en Red-agarosa constituyó la etapa mas crítica de la purificación, dada la alta afinidad de la IDH por su sustrato, NADP, se eliminaron una gran cantidad de proteínas contaminantes que permanecieron unidas a la matriz durante el proceso de elución con el piridín nucleótido. La recuperación fue del 45% de la actividad inicial y se alcanzó una purificación de 15 veces sobre el paso anterior. Las fracciones con alta actividad IDH se reunieron para constituir el eluato de la segunda cromatografía en Red-agarosa (figura 8).

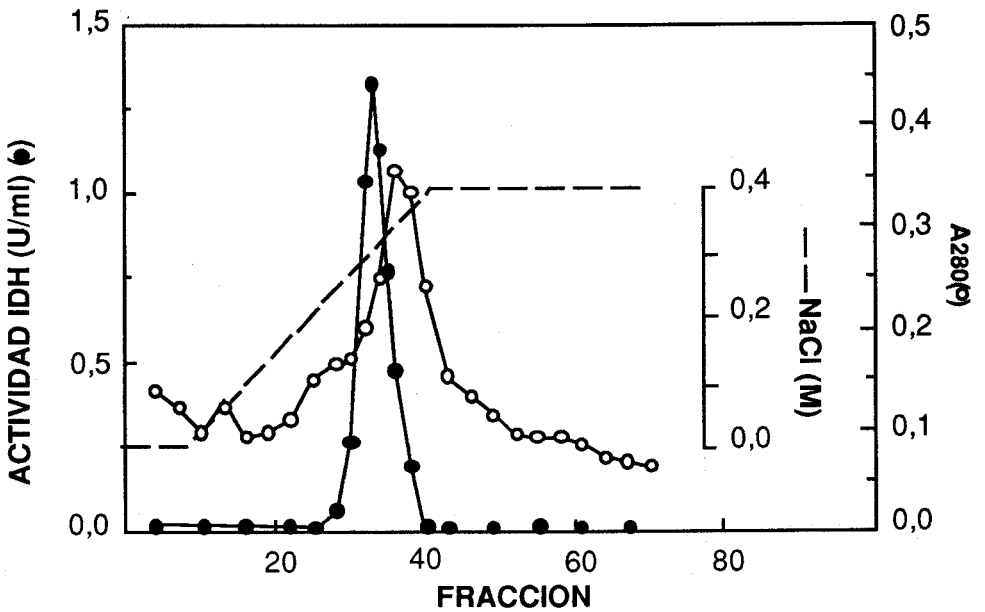


FIGURA 6. Perfil de elución de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 en cromatografía de Red-agarosa.

Las condiciones empleadas en esta cromatografía se describen en el apartado 3.1.2. Se aplicó una preparación procedente de la cromatografía en DEAE-celulosa que contenía 87 U de actividad NADP-IDH.

3.1.4. Cromatografía en Fenil-Sefarosa

El eluato obtenido en el paso anterior se equilibró a 1 M de sulfato amónico y se aplicó a una columna de Fenil-Sefarosa (1 cm x 10 cm) previamente equilibrada con tampón estándar conteniendo esta misma concentración de sulfato amónico. La columna se lavó con varios volúmenes del mismo tampón y la actividad IDH se eluyó a continuación aplicando un gradiente inverso lineal 1-0 M de sulfato amónico preparado en 70 ml de tampón estándar. Las fracciones que contenían la

IDH pura eluyeron al final de este gradiente a concentraciones de sulfato amónico próximas a cero como se puede observar en la figura 7.

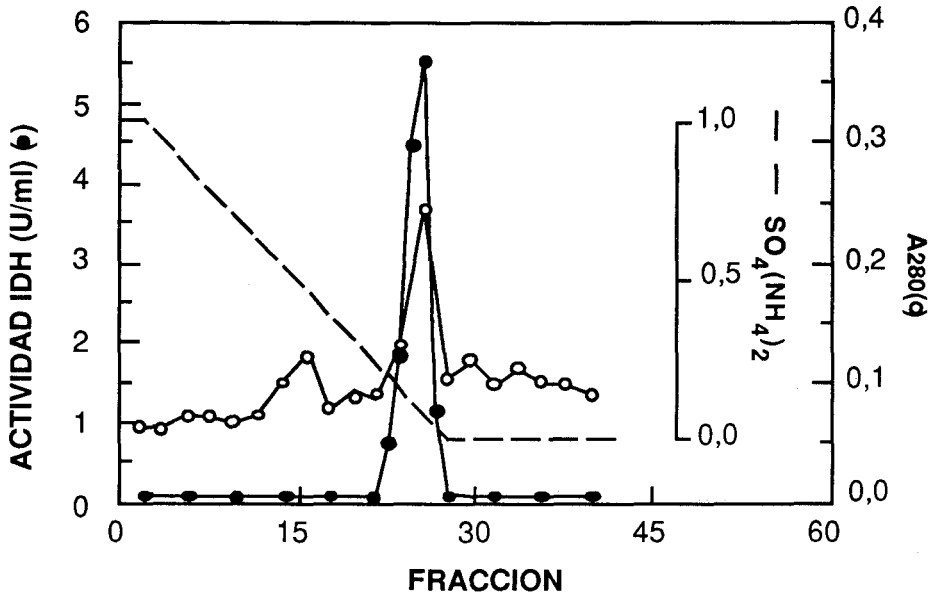


FIGURA 7. Perfil de elución de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 en cromatografía hidrofóbica de Fenil-sefarosa.

Las condiciones de esta cromatografía se describen en el apartado 3.1.4. El eluato procedente de la cromatografía de afinidad en Red-agarosa conteniendo 47 U de actividad NADP-IDH se aplicó en una columna de Fenil-sefarosa de donde se eluyó la enzima purificada.

La tabla 4 resume los resultados de una purificación típica de la isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803. La recuperación final del proceso fue del 38% y la purificación alcanzada tras las cuatro etapas descritas fue de 570 veces siendo la actividad específica de la preparación final de 15,7 U/mg proteína.

Tabla 4. Purificación de la NADP-isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803[a]

Paso de purificación	Prot. (mg)	Activ. (U)	Activ.esp. (U/mg prot.)	Rend. (%)	Purif. (veces)
Extracto crudo	3800	104	0,027	100	1
DEAE-celulosa	2666	87	0,032	84	1,2
Red 120-Agarosa 1	115	70	0,61	67	22,1
Red 120-Agarosa 2	5,1	47	9,2	45	335
Fenil-Sefarosa	2,5	40	15,7	38	570

[a] Material inicial: 70 g de peso fresco.

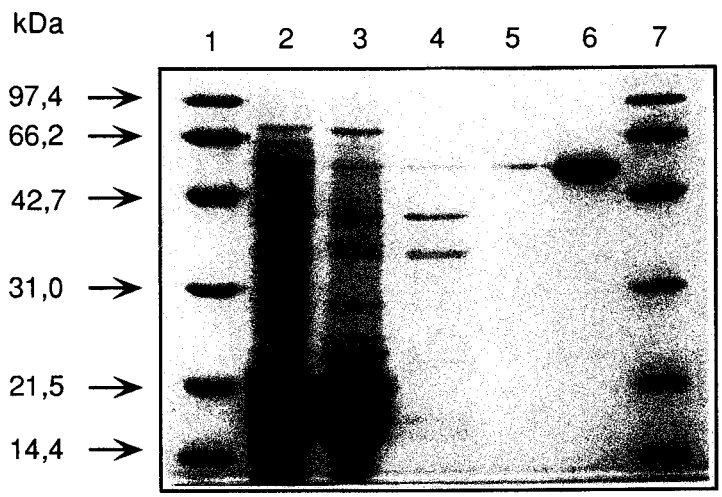


FIGURA 8. Patrones electroforéticos de proteínas a lo largo de la purificación de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803.

Se muestra el análisis por electroforesis de poliacrilamida con SDS de las muestras procedentes de cada paso de la purificación. Las condiciones de la electroforesis y de la tinción con azul de Coomassie se detallan en los apartados 2.3.3.2 y 2.3.3.3. Calles 1 y 7, marcadores de masa molecular; calle 2, extracto crudo (145 μg); calle 3, eluato de la DEAE-celulosa (140 μg); calles 4 y 5, eluatos de la primera y la segunda Red-agarosa (8 y 0,33 μg, respectivamente); calle 6, NADP-IDH purificada procedente del eluato de la Fenil-sefarosa (14 μg)

3.2 PURIFICACION DE LA NADP-IDH DE *Anabaena* sp. PCC 7120

La isocitrato deshidrogenasa de la cianobacteria filamentosa fijadora de dinitrógeno *Anabaena* sp. PCC 7120, se purificó hasta homogeneidad electroforética siguiendo un procedimiento muy similar al descrito para la IDH de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Teniendo en cuenta las determinaciones de actividad IDH realizadas previamente con extractos crudos procedentes de células de *Anabaena* cultivadas en diferentes fuentes de nitrógeno (apartado 3.9), se procedió a purificar la proteína a partir de células cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno. Para una purificación estándar se emplearon 60 g de células (peso fresco).

En este apartado se analizan únicamente las diferencias mas significativas, respecto al proceso de purificación, entre las dos enzimas estudiadas.

La IDH de *Anabaena* presentó una gran inestabilidad tanto en el extracto crudo como a lo largo del proceso de purificación. Con objeto de estabilizar la actividad se utilizó un tampón estándar modificado respecto al usado para la purificación de *Synechocystis*, que contenía varios suplementos mediante los cuales se consiguió incrementar sensiblemente el rendimiento del proceso. Se utilizó tampón Tris/HCl 30 mM (pH 7,5) suplementado con 5% (v/v) de glicerol, 2 mM de 2-mercaptoetanol, 5 mM de $MgCl_2$ y 1 mM de citrato sódico.

En la figura 9 se muestra el seguimiento en electroforesis de SDS-PAGE de las diferentes etapas de la purificación, observándose la aparente homogeneidad electroforética de la preparación enzimática procedente de la cromatografía en Fenil-Sefarosa, último paso del proceso, una vez concentradas las fracciones por ultrafiltración.

Como se puede observar en la tabla 5 el rendimiento final del proceso fue de un 25% obteniéndose una purificación de 430 veces y una actividad específica del producto final de 24.9 U/mg proteína.

3.3. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA NADP-IDH DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

3.3.1. Tamaño y estructura molecular

Como se ha indicado en la introducción, el tamaño y el número de subunidades de las IDHs suele estar muy relacionado con la función y la regulación de las mismas (Chen y Gadal, 1990). Teniendo en cuenta esto, y para determinar a que grupo de las IDHs conocidas se podía adscribir la enzima de cianobacterias se determinó el tamaño tanto de la subunidad como de la proteína nativa así como el número de subunidades de la misma.

Tabla 5. Purificación de la NADP-isocitrato deshidrogenasa de *Anabaena* sp. PCC 7120[a]

Paso de purificación	Prot. (mg)	Activ. (U)	Activ.esp. (U/mg prot.)	Rend. (%)	Purif. (veces)
Extracto crudo	7450	433	0,058	100	1
DEAE-celulosa	884	260	0,29	60	5
Red 120-Agarosa 1	47,36	131	2,76	30	48
Red 120-Agarosa 2	6,77	155	22,94	36	393
Fenil-Sefarosa	4,33	108	24,94	25	430

[a] Material inicial: 60 g de peso fresco.

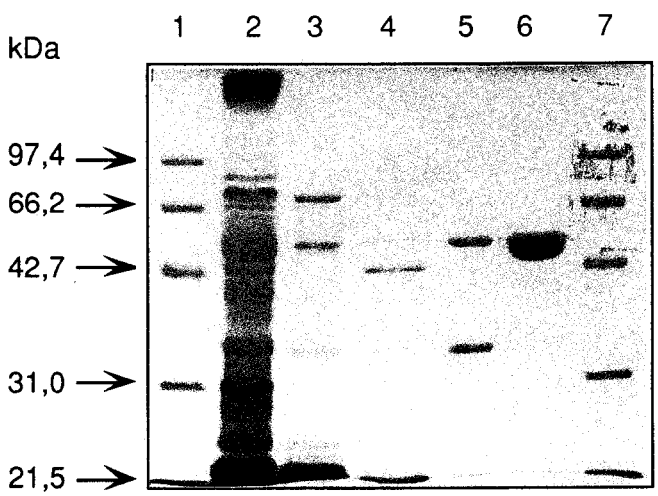


FIGURA 9. Patrones electroforéticos de proteínas a lo largo de la purificación de la NADP-IDH de *Anabaena* 7120.

Se muestra el análisis por electroforesis de poliacrilamida con SDS de las muestras procedentes de cada paso de la purificación. Las condiciones de la electroforesis y de la tinción con azul de Coomassie se detallan en los apartados 2.3.3.2 y 2.3.3.3. Calles 1 y 7, marcadores de masa molecular; calle 2, extracto crudo (280 μg); calle 3, eluato de la DEAE-celulosa (31 μg); calles 4 y 5, eluatos de la primera y la segunda Red-agarosa (2,3 y 2,5μg, respectivamente); calle 6, NADP-IDH purificada procedente del eluato de la Fenil-sefarosa (17μg).

3.3.1.1. Determinación de la masa molecular en condiciones desnaturalizantes.

El tamaño de la subunidad de la IDH de *Synechocystis* se estimó sometiendo a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS una muestra de la preparación enzimática purificada. Simultaneamente se realizó electroforesis de una mezcla de proteínas patrón de masa molecular conocida. Como se muestra en la figura 10 se calculó una masa molecular de 57 kDa para la IDH de *Synechocystis*, considerando la movilidad relativa de la enzima desnaturalizada respecto a la de las proteínas marcadoras.

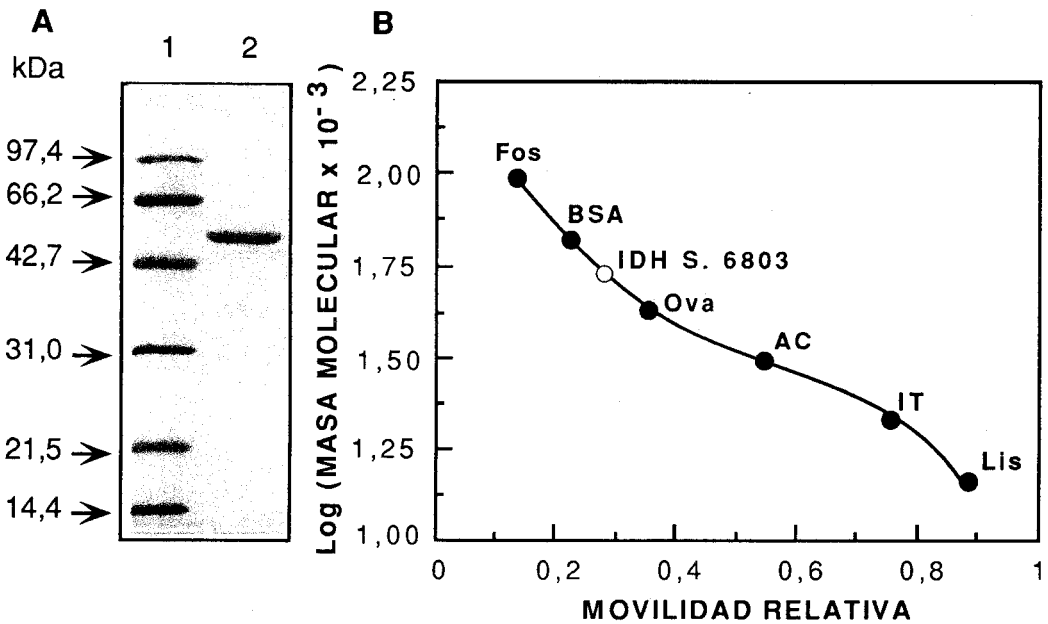


FIGURA 10. Determinación de la masa molecular de la IDH de *Synechocystis* 6803 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

(A) Las condiciones de la electroforesis son las descritas en el apartado 2.3.3.2 calle 2, IDH purificada (5 µg); calle 1, marcadores de masa molecular.

(B) Representación gráfica empleada en la determinación de la masa molecular, Fos, fosforilasa b; BSA, seroalbúmina bovina; Ova, ovoalbúmina; AC, anhidrasa carbónica; IT, inhibidor de tripsina; Lis, lisozima.

3.3.1.2. Determinación de la masa molecular en condiciones nativas.

con proteínas patrón de masas moleculares conocidas. La IDH de *Synechocystis* en estado nativo presentó una masa molecular de 106 kDa (figura 11).

Estos datos, 57 kDa para la subunidad y 106 kDa para la enzima nativa, permiten deducir una estructura dimérica de la IDH de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

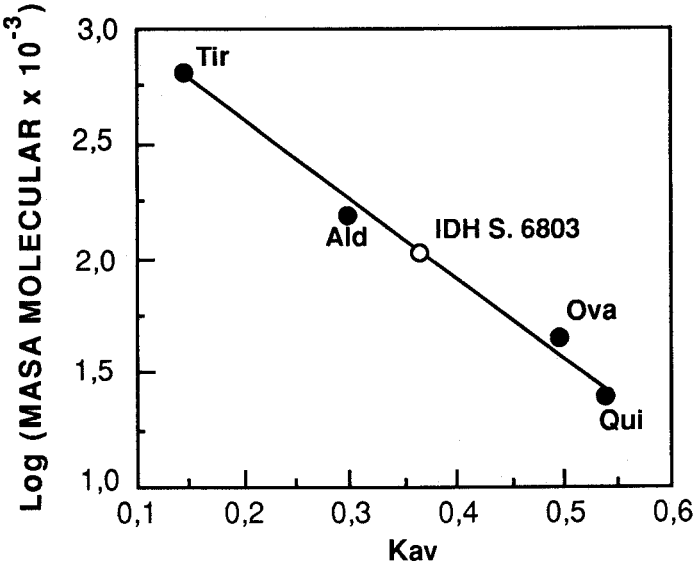


FIGURA 11. Determinación de la masa molecular de la IDH de *Synechocystis* 6803 en estado nativo mediante cromatografía de filtración en gel.

Las condiciones experimentales se describen en el apartado 2.3.2.5. Tir, tiroglobulina; Ald, Aldolasa; Ova, ovoalbúmina; Qui, quimotripsinógeno.

La masa molecular de la IDH nativa se determinó mediante filtración en gel, utilizando para ello una preparación enzimática purificada que se sometió a filtración molecular en una columna de Sephacryl S-300 previamente calibrada

3.3.2. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad

La figura 12 muestra el perfil de inactivación de la IDH de *Synechocystis* 6803 tras 20 min de incubación a las temperaturas indicadas. La temperatura

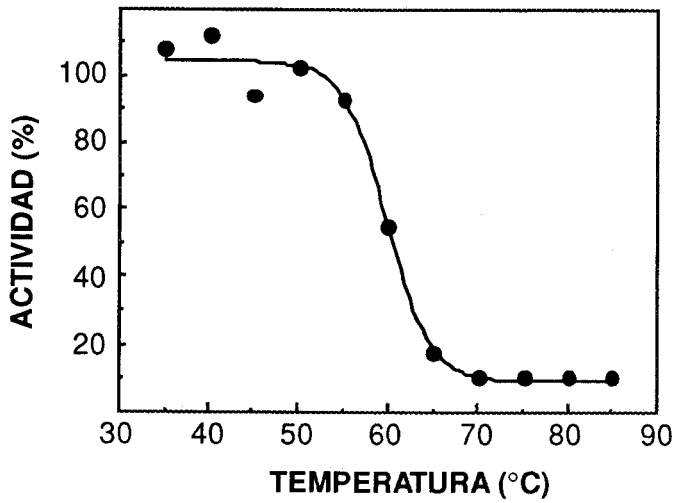


FIGURA 12. Inactivación térmica de la isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* 6803.

Se muestra el porcentaje de actividad, respecto al valor inicial, que se observó tras 20 min de incubación a la temperatura correspondiente. El 100% de actividad corresponde a 30 mU.

media de inactivación (temperatura a la que permanece el 50% de la actividad tras 20 min de calentamiento) fue de 60 °C, lo cual indica que la IDH de esta cianobacteria no es un enzima particularmente termorresistente.

3.3.3. Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico se determinó mediante isoelectroenfoque. La figura 13A muestra la migración de la IDH purificada en un gel con gradiente de pH entre 2,5 y 6,5 junto con proteínas marcadoras de pI conocido. El pI calculado por este procedimiento para la IDH de *Synechocystis* es de 4.4 (figura 13B).

3.3.4. Espectro de dicroísmo circular

La determinación del espectro de dicroísmo circular (figura 14) de la IDH de *Synechocystis* 6803 purificada permitió un acercamiento a la estructura secundaria de la proteína. La interpretación por ordenador de este espectro asignó unos porcentajes de 30 y 36% de hélice α y hoja plegada ß respectivamente a la IDH de esta cianobacteria.

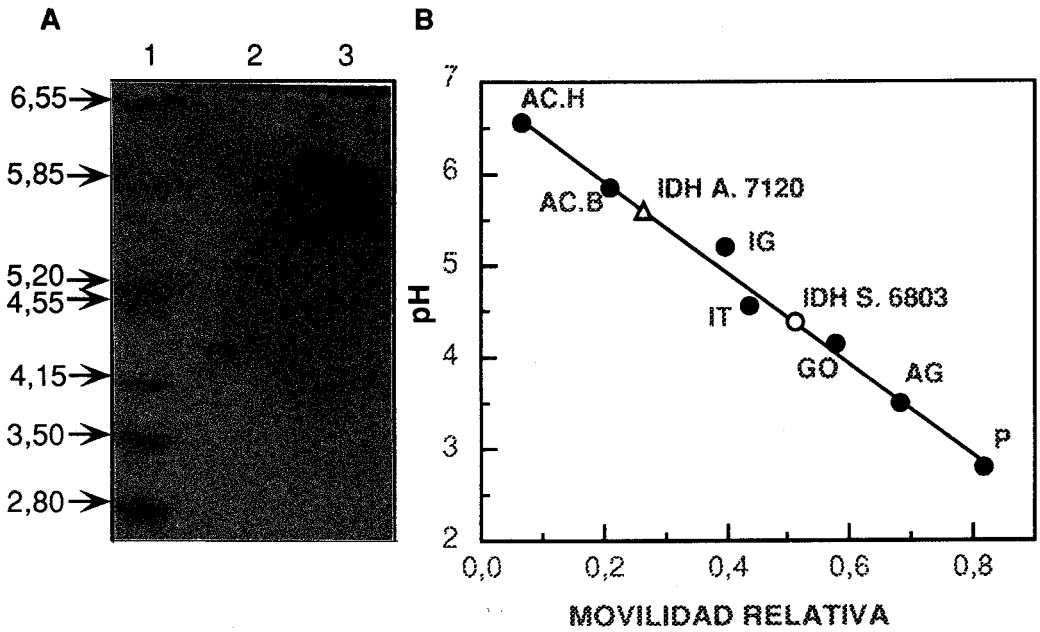


FIGURA 13. Determinación del pI de las NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 mediante isoelectroenfoque.

(A) Las condiciones experimentales de la electroforesis se detallan en el apartado 2.3.3.5, calle 3, IDH purificada de *Synechocystis* 6803; calle 2, IDH purificada de *Anabaena* 7120; calle 1, Proteínas marcadoras de pI.

(B) Representación gráfica empleada en la determinación de los pI. AC H, anhidrasa carbónica humana B; AC B, anhidrasa carbónica bovina B; IG, ß-lactoglobulina A; IT, inhibidor de tripsina de soja; GO, glucosa oxidasa; AG, amiloglucosidasa; P, pepsinógeno.

3.3.5. Secuenciación del extremo amino terminal de la proteína.

Se llevó a cabo la secuenciación de los veinte primeros residuos de la proteína purificada. La secuencia obtenida fue la siguiente:

Met-Tyr-Glu-Lys-Leu-Gln-Pro-Pro-Ser-Val-Gly-Ser-Lys-Ile-Thr-Phe-Val-Ala-Gly-Lys

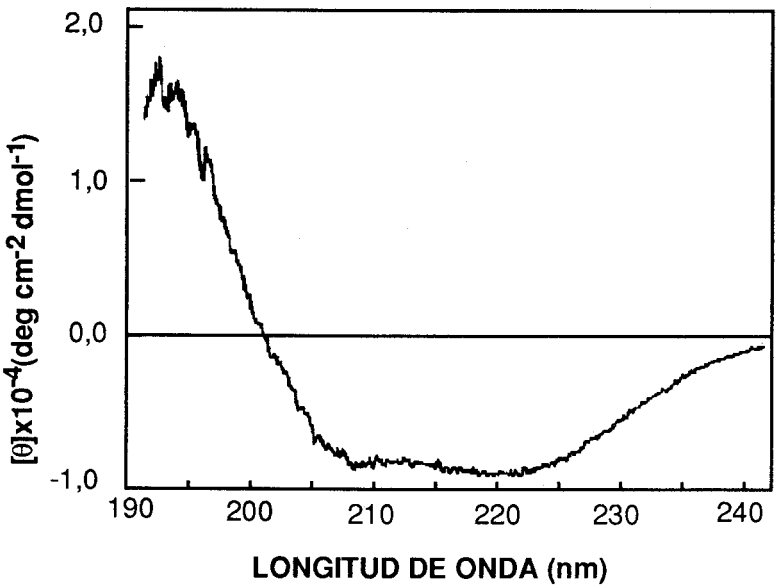


FIGURA 14. Espectro de dicroísmo circular de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803.

Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 2.3.7. Se realizó el espectro a una preparación de enzima purificada a 100 μg/ml.

3.4. CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LA NADP-IDH DE *Anabaena* sp. PCC 7120

3.4.1. Tamaño y estructura molecular

3.4.1.1. Determinación de la masa molecular en condiciones desnaturalizantes.

El tamaño de la subunidad de la IDH de *Anabaena* se estimó por el mismo procedimiento anteriormente descrito para *Synechocystis*. La figura 15 muestra la electroforesis en SDS-PAGE mediante la cual se calculó un tamaño para dicha subunidad de 57 kDa.

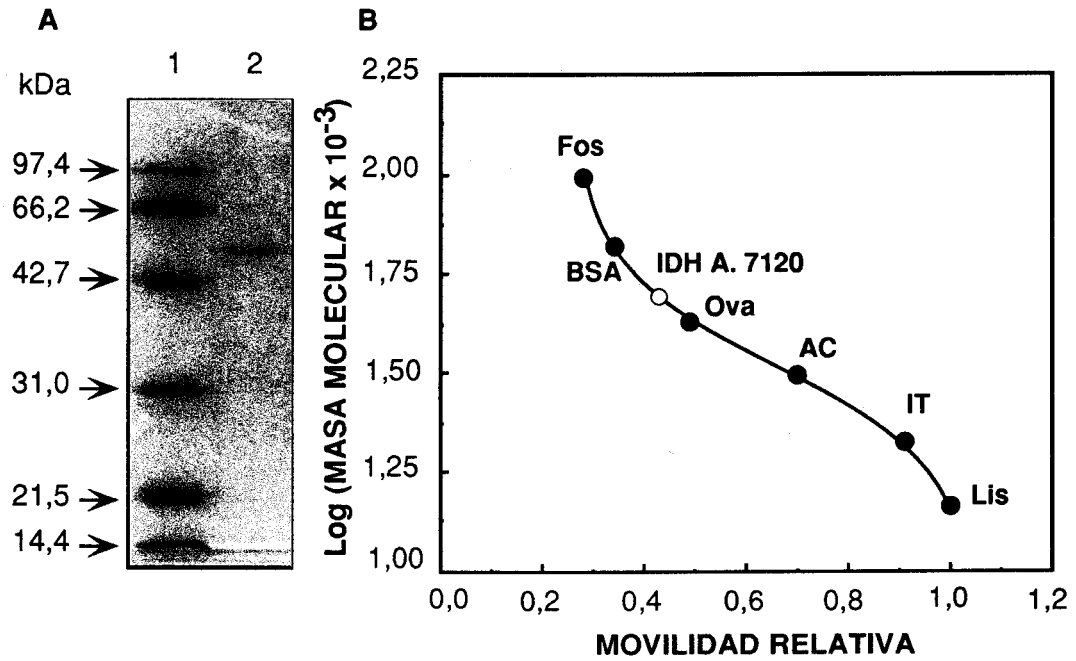


FIGURA 15. Determinación de la masa molecular de la IDH de *Anabaena* 7120 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

(A) Las condiciones de la electroforesis son las descritas en el apartado 2.3.3.2 calle 2, IDH purificada (5 μg); calle 1, marcadores de masa molecular.

(B) Representación gráfica empleada en la determinación de la masa molecular, Fos, fosforilasa b; BSA, seroalbúmina bovina; Ova, ovoalbúmina; AC, anhidrasa carbónica; IT, inhibidor de tripsina; Lis, lisozima.

3.4.1.2. Determinación de la masa molecular en condiciones no desnaturalizantes.

El tamaño de la IDH nativa de *Anabaena* se determinó por filtración en gel siguiendo el protocolo descrito para *Synechocystis*. En la figura 16 se muestra la determinación correspondiente, la masa molecular resultó ser de 102 kDa. Estos datos indican que la IDH de *Anabaena* presenta una estructura dimérica.

3.4.2. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad

La estabilidad térmica de la IDH de *Anabaena* resulto ser ligeramente menor que la que presenta la enzima de *Synechocystis*. En la figura 17 se muestra el perfil de inactivación donde se puede observar que la temperatura media de inactivación (temperatura a la que permanece el 50% de la actividad inicial tras 20 min de calentamiento) es de aproximadamente 57 °C.

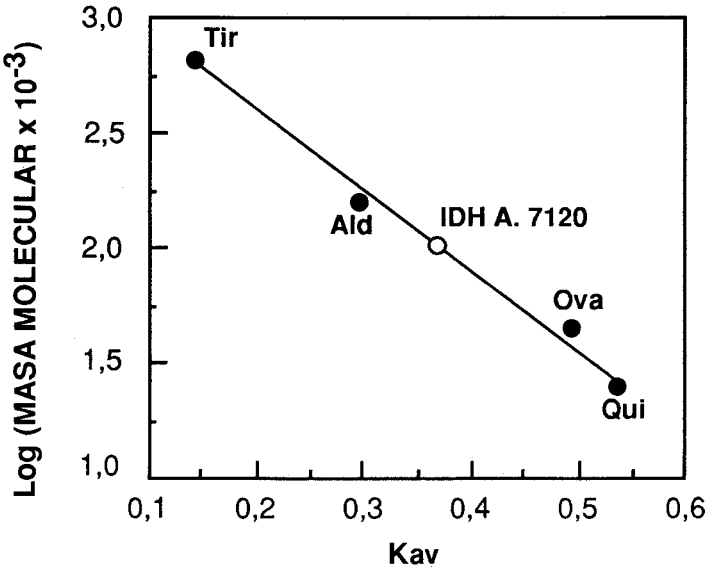


FIGURA 16. Determinación de la masa molecular de la IDH de *Anabaena* 7120 en estado nativo mediante cromatografía de filtración en gel.

Las condiciones experimentales se describen en el apartado 2.3.2.5. Tir, tiroglobulina; Ald, Aldolasa; Ova, ovoalbúmina; Qui, quimotripsinógeno.

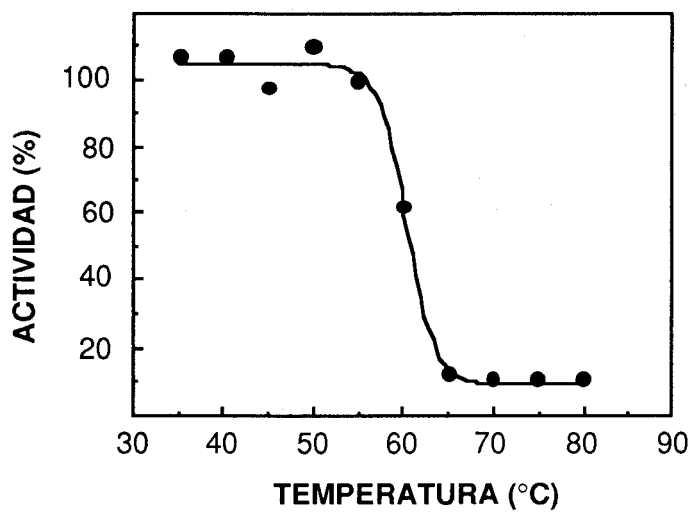


FIGURA 17. Inactivación térmica de la isocitrato deshidrogenasa de *Anabaena* 7120.

Se muestra el porcentaje de actividad, respecto al valor inicial, que se observó tras 20 min de incubación a la temperatura correspondiente. El 100% de actividad corresponde a 30 mU.

3.4.3. Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico de la IDH de *Anabaena* se determinó mediante isoelectroenfoque utilizando las mismas proteínas marcadoras de pI conocido utilizadas para el experimento análogo con *Synechocystis*. La figura 13A muestra la movilidad de las IDHs purificadas de *Anabaena* y *Synechocystis* en gel de gradiente de pH, así como el cálculo del pI que fue de 5,58 para el caso de *Anabaena*.(Fig 13 B).Este dato fue corroborado por cromatoenfoque (no mostrado).

3.5. COMPARACION FISICOQUIMICA DE LAS DOS NADP-IDHs PURIFICADAS

Los parámetros fisicoquímicos estudiados en las dos IDHs cianobacterianas purificadas permiten afirmar que ambas enzimas son muy similares respecto a su estructura y pueden clasificarse dentro del tipo dímerico definido por Chen y Gadal (1990), este tipo de IDH dimérica dependiente de NADP es el mas común entre los procariotas.

La tabla 6 resume los parámetros fisicoquímicos determinados en el estudio descrito anteriormente.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de las IDHs de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120.

Parámetro	*Synechocystis* 6803	*Anabaena* 7120
Masa molecular (kDa)		
- Nativa	106	102
- Subunidad	57	57
Número de subunidades	2	2
Temperatura de inactivación (°C)[a]	60	55-60
Punto isoeléctrico	4,4	5,5

[a] Temperatura a la que permanece el 50% de la actividad tras 20 min de calentamiento

Como se puede observar en dicha tabla, el único parámetro diferencial entre las IDHs purificadas de *Anabaena* y *Synechocystis* es el pI calculado mediante isoelectroenfoque. La enzima de *Synechocystis* mostró un pI una unidad inferior que el que presentaba la de *Anabaena* en las mismas condiciones experimentales (figura 13). Este resultado está en consonancia con la diferente movilidad electroforética que presentan ambas enzimas en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (figura 18).

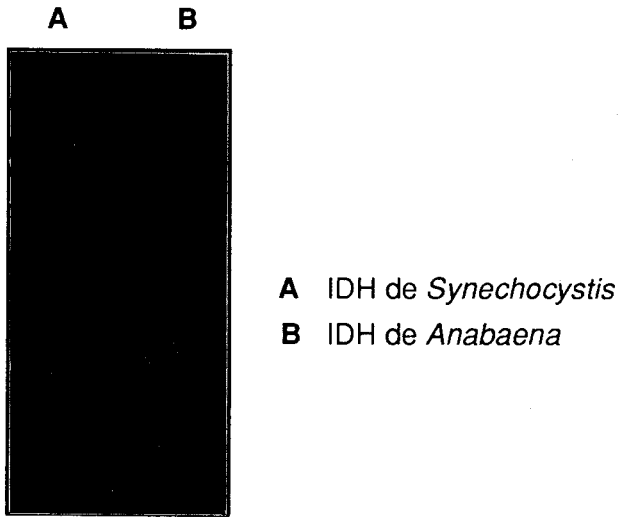


FIGURA 18. Movilidad electroforética en condiciones no desnaturalizantes de las IDHs purificadas de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120.

Tras la electroforesis (apartado 2.3.3.1) se reveló la actividad NADP-IDH, mediante detección de la fluorescencia emitida por el NADPH producido como se describe en el apartado 2.3.3.4.

Desde el punto de vista inmunológico ambas enzimas son también similares como se puede deducir a partir de las curvas de inmunotitulación comparativas (figura 19). En estos ensayos se utilizó antisuero obtenido contra la NADP-IDH purificada de *Synechocystis* para inmunoprecipitar las NADP-IDHs purificadas procedentes de ambas cianobacterias, observándose la inmunorreacción cruzada que presentan ambas proteínas.

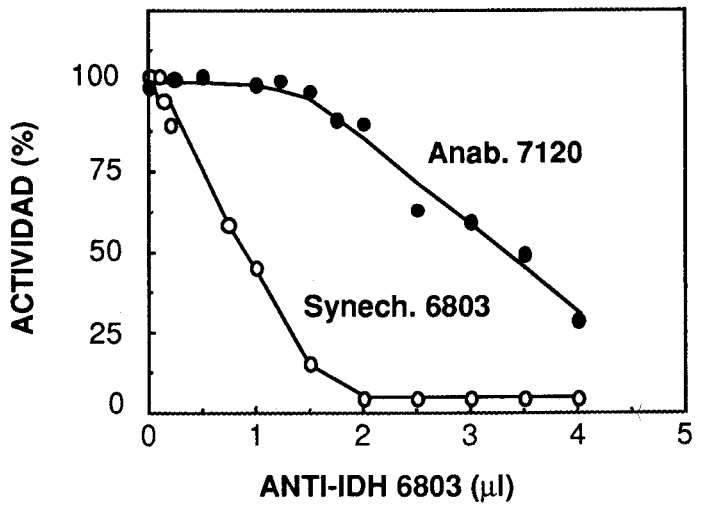


FIGURA 19. Curvas de inmunotitulación de las NADP-IDHs purificadas de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120.

Se incubaron cantidades constantes (40 mU) de las enzimas purificadas con volumenes sucesivamente mayores de antisuero anti-IDH de *Synechocystis* como se describe en el apartado 2.3.4.2. La actividad enzimática remanente en los sobrenadantes se midió en las condiciones estándar descritas.

3.6. CARACTERIZACION CINETICA DE LA NADP-IDH DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

Los estudios cinéticos de la IDH de *Synechocystis* se llevaron a cabo utilizando preparaciones enzimáticas purificadas y siguiendo el ensayo estándar descrito en el apartado 2.2. La enzima resultó ser estrictamente dependiente de NADP y cationes divalentes como Mg^{2+} o Mn^{2+}, no encontrándose actividad alguna en presencia de NAD en lugar de NADP o en ausencia de cationes divalentes.

Las reacciones se iniciaron tras la adición de la enzima a la mezcla de ensayo con objeto de evitar un efecto de retardo inicial observado en los registros de actividad y debido posiblemente a la falta de equilibrio entre los diferentes componentes de la mezcla. Esta falta de linealidad inicial en la velocidad de aparición de sustrato respecto al tiempo, cuando la reacción se inicia con la adición de isocitrato, ha sido descrita para otras IDHs y es debida al tiempo requerido para la formación de un complejo entre el catión divalente y el isocitrato, verdadero sustrato de la reacción.

3.6.1. Efecto del pH

En la figura 20 se muestra el efecto del pH sobre la actividad IDH. Como se puede apreciar, la enzima presenta un pH óptimo de 9 si bien es activa en un amplio rango de pH mostrando una actividad superior al 84% de la máxima entre pH 8 y 10.

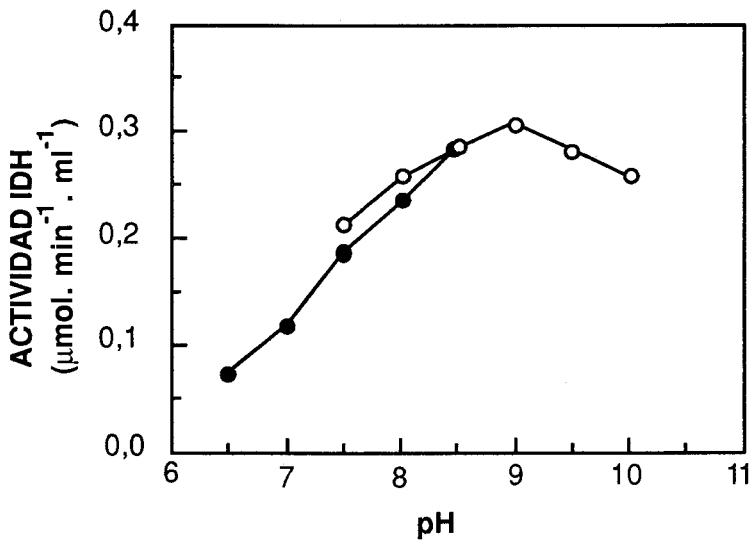


FIGURA 20. Efecto del pH sobre la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803.

Las condiciones de ensayo fueron las descritas en el apartado 2.2. Se utilizaron tampones HEPES 50 mM (6,5-8,5) y Tris/Glicina 50 mM (7,5-10).

3.6.2. Constantes de Michaelis-Menten (K_m)

Con objeto de estudiar la afinidad de la IDH por sus distintos sustratos así como por los cationes divalentes indispensables para su actividad, se realizaron ensayos seriados variando la concentración del compuesto estudiado en cada caso. Los resultados obtenidos se interpretaron tras realizar representaciones de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk). Se comprobó así que la enzima muestra una cinética típica de Michaelis-Menten y se calcularon las constantes (K_m), que se muestran en la tabla 7. Los valores de estas constantes son similares a los ya descritos para las IDHs de otras cianobacterias en preparaciones parcialmente

purificadas o en extractos crudos (Papen *et al.*, 1983), así como a los que presentan otras IDHs diméricas procarióticas (Chen y Gadal, 1990). Todos estos valores seencuentran en el rango μM si bien cabe destacar la alta afinidad de la enzima por el Mn^{2+} (4 μM) aún cuando el Mg^{2+} es generalmente considerado el cofactor fisiológico.

3.6.3. Efecto de diversos metabolitos sobre la NADP-IDH

Tabla 7. Constantes de Michaelis-Menten (K_m) de la isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Sustrato o cofactor	K_m aparente (μM)	
	Con Mg^{2+}	Con Mn^{2+}
isocitrato	59	5,7
NADP	12	6
catión divalente	125	4

Para comprobar si la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 se encontraba modulada por algún metabolito se ha estudiado el efecto de diversos compuestos, tales como intermediarios del ciclo de Krebs, aminoácidos relacionados con la ruta GS-GOGAT, o nucleótidos mono-, di- o trifosforilados, sobre la actividad IDH. Como muestra la tabla 8, la mayoría de estos compuestos no tenían un efecto positivo ni negativo superior al 20%. En cambio el 2-oxoglutarato, el ADP y el NADPH mostraron una inhibición mas significativa sobre la NADP-IDH. Estos metabolitos habían sido ya descritos como inhibidores de la IDH de otras cianobacterias (Papen *et al.*, 1983, Friga y Farkas, 1981) y en *Synechocystis* esta inhibición es de tipo no competitivo para el 2-oxoglutarato y el ADP (figura 21) y competitivo en el caso del NADPH. Las K_i calculadas se encuentran en todos los casos en el rango de mM; 5,9 mM para el 2-oxoglutarato, 8,8 mM para el ADP y 0,6 mM para el NADPH.

Tabla 8. Efecto de diversos metabolitos sobre la actividad isocitrato deshidrogenasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Compuesto	Concentración (mM)	Actividad (%)[a]
-	-	100
Glioxilato	10	86
Fumarato	10	82
Succinato	10	88
Malato	10	96
Oxalacetato	10	70
Cis-aconitato	10	94
Citrato	10	82
2-oxoglutamato	**20**	**30**
Glutamato	10	105
Glutamina	10	88
Aspartato	10	92
Prolina	10	90
AMP	10	83
ADP	**10**	**55**
ATP	10	73
NAD	10	72
NADH	0,2	101
NADPH	0,2	62

[a] Las condiciones de ensayo son las estándar descritas en el apartado de Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a 12 mU.

3.7. CARACTERIZACION CINETICA DE LA NADP-IDH DE *Anabaena* sp. PCC 7120

Los estudios cinéticos de la IDH de *Anabaena* se llevaron a cabo utilizando preparaciones de enzima purificada y siguiendo el ensayo estándar ya descrito. La enzima, al igual que en el caso de *Synechocystis*, resultó ser estrictamente dependiente de NADP y cationes divalentes.

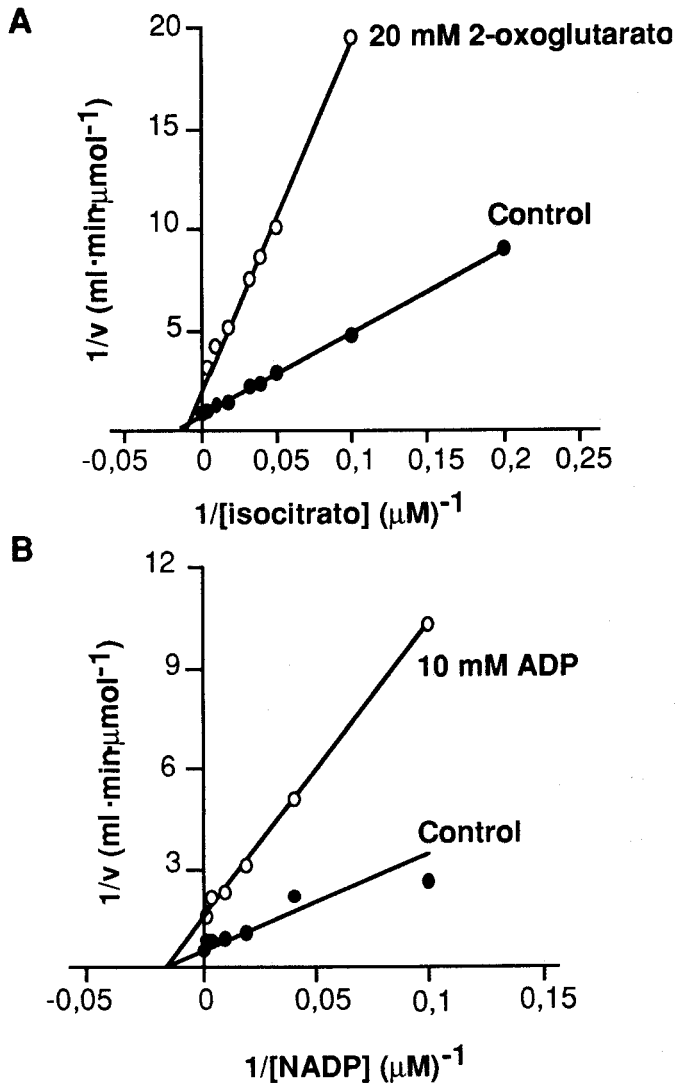


FIGURA 21. Inhibición no competitiva de la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 por 2-oxoglutarato (A) y ADP (B).

Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 2.2, usando 2 μg de enzima purificada, con cantidades crecientes de isocitrato y NADP respectivamente y en presencia del los inhibidores a las concentraciones indicadas.

3.7.1. Efecto del pH

La IDH de *Anabaena* presenta un pH óptimo de ensayo de 8,5 como se muestra en la figura 22 si bien la enzima mantiene mas de un 80% de la actividad máxima en un rango amplio de pH (8-10).

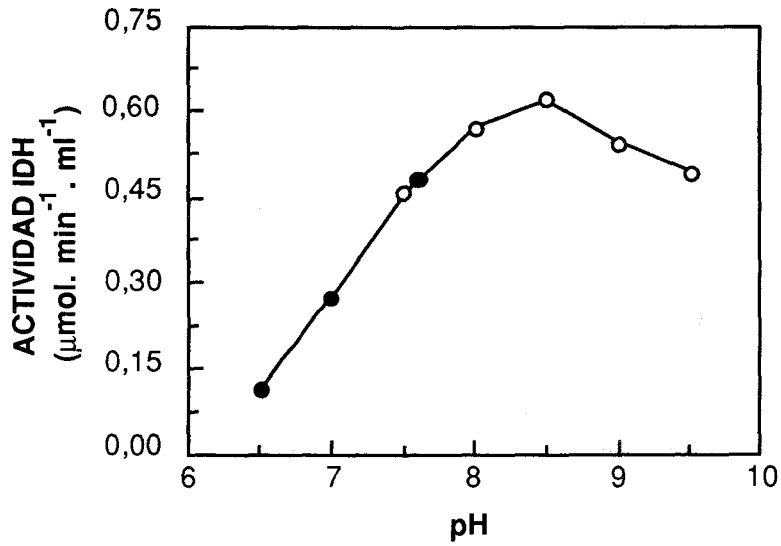


FIGURA 22. Efecto del pH sobre la actividad NADP-IDH de *Anabaena* 7120.
Las condiciones de ensayo fueron las descritas en el apartado 2.2. Se utilizaron tampones KH_2PO_4 50 mM (6,5-7,58) y Tris/HCl 50 mM (7,5-9,5).

3.7.2. Constantes de Michaelis-Menten (K_m)

Se ha estudiado la afinidad de la NADP-IDH de *Anabaena* por sus sustratos utilizando Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores. Las constantes de Michaelis-Menten calculadas para los sustratos así como para los cationes divalentes se resumen en la tabla 9.

Los resultados obtenidos en los ensayos seriados variando la concentración del compuesto estudiado en cada caso se interpretaron tras realizar representaciones de Lineweaver-Burk (1/V frente a 1/[S]), Hanes-Woolf ([S]/V frente a [S]) y Woolf-Augustinsson-Hofstee (V frente a V/[S]). En todos los casos se encontró una cinética típica con una única constante de afinidad salvo cuando se analizó la afinidad de la enzima por el Mg^{2+}. En este caso se observó un claro comportamiento bifásico (figura 23) encontrándose dos componentes cinéticos, uno de alta afinidad

y menor velocidad máxima (K_m = 4,3 μM y V_{max} = 6,3 nmol/min) y otro de baja afinidad y mayor velocidad máxima (K_m = 110 μM y V_{max} = 25 nmol/min). Este fenómeno, que podría indicar una modulación de la actividad IDH dependiente de las concentraciones celulares de Mg^{2+}, no ha sido previamente descrito para ninguna otra isocitrato deshidrogenasa.

3.7.3. Ensayo de diferentes cationes como cofactores de la IDH

Tabla 9. Constantes de Michaelis-Menten (K_m) de la isocitrato deshidrogenasa de *Anabaena* sp. PCC 7120

Sustrato o cofactor	K_m aparente (μM)	
	Con Mg^{2+}	Con Mn^{2+}
isocitrato	61,2	4,2
NADP	13,6	9,3
catión		
alta afinidad	4,3	2,9
baja afinidad	110	

Se ha ensayado la capacidad de diferentes cationes mono y divalentes para actuar como cofactores de la reacción de la NADP-IDH de *Anabaena*, con objeto de estudiar el grado de especificidad de la enzima respecto al cofactor catiónico. En la tabla 10 se muestra el resultado de los ensayos llevados a cabo con diferentes concentraciones de los cationes indicados. En todos los casos la enzima tiene su máxima actividad en presencia de Mn^{2+} si bien se puede observar que a concentraciones altas (500 μM), similares a las empleadas en el ensayo estándar, existen otros iones como Mg^{2+} Co^{2+} o Ni^{2+} capaces de sustentar una actividad apreciable de la enzima.

Por otra parte, si se compara la actividad en presencia de Mg^{2+} o Co^{2+} a las tres concentraciones probadas se observa una clara diferencia de actividad a 5 μM, concentración a la cual el Co^{2+} es ineficaz como cofactor mientras que el Mg^{2+} sustenta una actividad del 20% de la máxima, este hecho es debido al componente de baja afinidad de la enzima por el Mg^{2+} (apartado 3.7.2) que posiblemente no existe en el caso del Co^{2+}. Estos datos sugieren un carácter específico del comportamiento bifásico descrito para el Mg^{2+}.

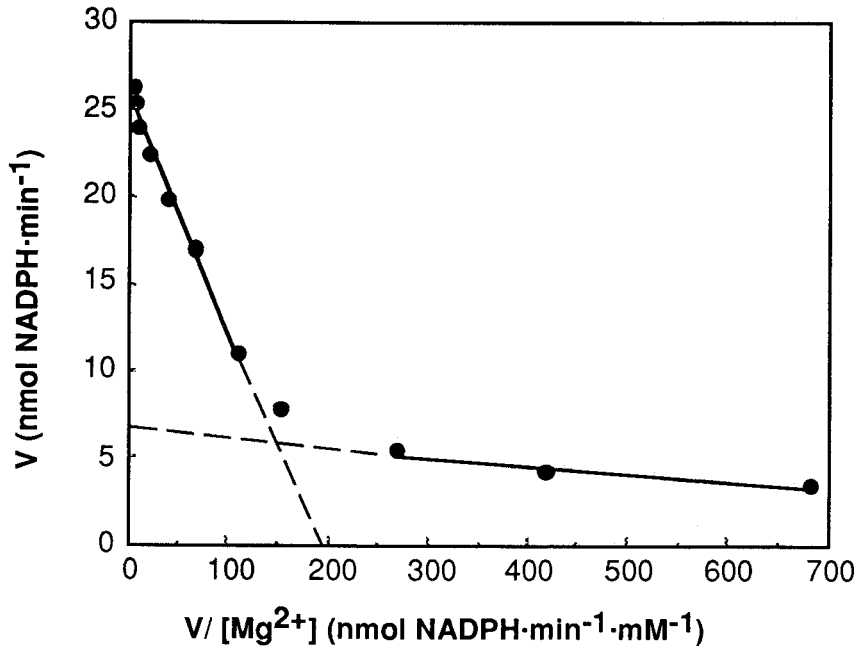


FIGURA 23. Efecto del Mg^{2+} sobre la actividad NADP-IDH de *Anabaena* 7120. Representación de Hofstee

La actividad IDH se ensayó en las condiciones estándar descritas en el apartado 2.2, usando 1 µg de enzima purificada y diferentes concentraciones de $MgCl_2$.

3.7.4. Efecto de diversos metabolitos sobre la NADP-IDH

En la tabla 11 se muestra el resultado de los estudios de inhibición llevados a cabo con la NADP-IDH de *Anabaena*. Al igual que en el caso de la enzima de *Synechocystis* la mayoría de los intermediarios del ciclo de Krebs y de los aminoácidos probados no presentan un efecto significativo, sin embargo una mezcla de oxalacetato y glioxilato a concentraciones de 1 mM para cada uno de ellos, consiguió inactivar la enzima completamente. Esta inhibición ha sido descrita para varias de las IDHs estudiadas y tiene un carácter competitivo (K_i = 144 µM) respecto al isocitrato (figura 24) debido probablemente a la formación espontanea de una molécula muy similar al sustrato.

Por otra parte el ATP y el NADPH también presentaron una inhibición significativa que fue objeto de un estudio mas detallado por las posibles implicaciones fisiológicas de las mismas (discusión).

Respecto al ATP la inhibición resultó ser de tipo mixto ya que se observó una

alteración en presencia del inhibidor tanto de la K_m como de la V_{max} de la enzima. El NADPH sin embargo mostró una inhibición de tipo competitivo respecto al NADP (figura 24) siendo la K_i calculada de 35 μM. Esta baja constante de inhibición permite asignar una significación fisiológica a este efecto.

3.8. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES NUTRICIONALES Y DE LA

Tabla 10. Ensayo de diferentes cationes mono y divalentes como cofactores de la IDH de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Catión	Actividad (%)[a]		
	Concentración (μM)		
	5	50	500
Li^+	0	1,7	1,6
Na^+	0	0,1	0,7
K^+	1	2	1
Cs^+	2	3	2
Ca^{2+}	2	0	0
Mg^{2+}	**21**	**33**	**41**
Mn^{2+}	**100**	**100**	**100**
Co^{2+}	**1**	**15**	**46**
Ni^{2+}	**0,1**	**1**	**10**
Cu^{2+}	3	2	0

[a] El 100% de actividad corresponde a la actividad observada con Mn^{2+} a cada una de las concentraciones indicadas.

Tabla 11. Efecto de diversos metabolitos sobre la actividad isocitrato deshidrogenasa de *Anabaena* sp. PCC 7120

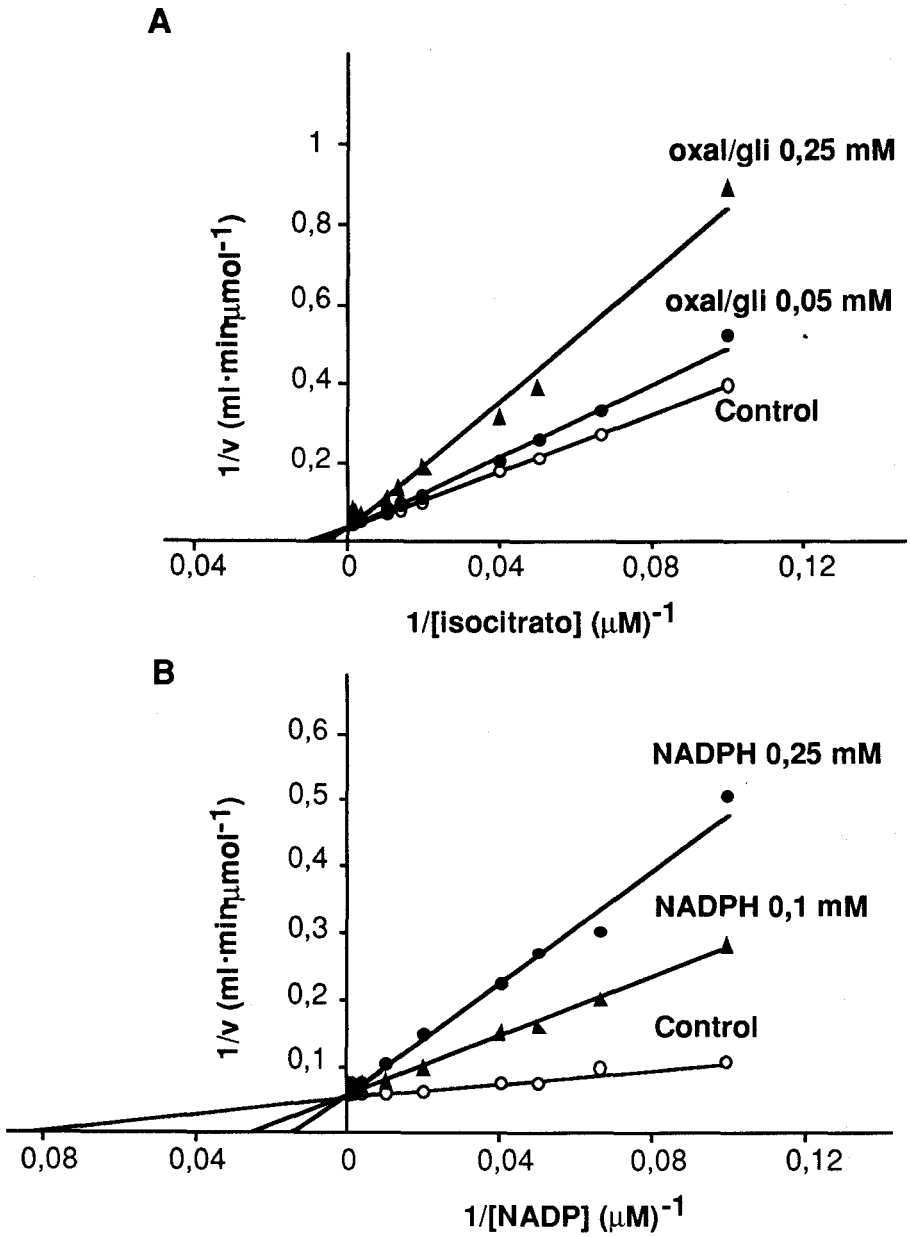
Compuesto	Concentración (mM)	Actividad (%)[a]
-	-	100
Glioxilato	10	92
Fumarato	10	91
Succinato	10	96
Malato	10	95
Oxalacetato	20	67
Cis-aconitato	10	66
Piruvato	10	102
Citrato	10	75
2-oxoglutarato	**10**	**67**
Glutamato	10	95
Glutamina	10	97
Aspartato	10	101
Prolina	10	98
AMP	20	77
ADP	20	50
ATP	**20**	**30**
NAD	20	48
NADH	0,25	91
NADPH	**0,25**	**72**
Oxalac.+Gliox.	**1(cada)**	**1**

[a] Las condiciones de ensayo son las estándar descritas en el apartado de Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a 40 mU.

FIGURA 24. Inhibición competitiva de la NADP-IDH de *Anabaena* 7120 por oxalacetato + glioxilato (A) y por NADPH (B).

(A) Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 2.2, usando 1 µg de enzima purificada, con cantidades crecientes de isocitrato y en presencia del los inhibidores a las concentraciones indicadas.

(B) Los ensayos se realizaron como se describe en el apartado 2.2, usando 1 µg de enzima purificada, con cantidades crecientes de NADP y en presencia del inhibidor a las concentraciones indicadas


A
1
0,8
0,6
0,4
0,2
1/v (ml·minμmol-1)
oxal/gli 0,25 mM
oxal/gli 0,05 mM
Control
0,04
0
0,04
0,08
0,12
1/[isocitrato] (μM)-1
B
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
1/v (ml·minμmol-1)
NADPH 0,25 mM
NADPH 0,1 mM
Control
0,08
0,04
0
0,04
0,08
0,12
1/[NADP] (μM)-1

FASE DE CRECIMIENTO SOBRE LOS NIVELES DE LA ACTIVIDAD NADP-IDH DE *Synechocystis.*

3.8.1. Niveles de actividad NADP-IDH a lo largo del crecimiento en diferentes condiciones de cultivo

Con objeto de estudiar si existía alguna modulación de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* en función de que éste se cultivara en condiciones fotoautotróficas *versus* mixotróficas y de la fuente de nitrógeno utilizada, se determinaron los niveles de actividad a lo largo de las distintas fases de crecimiento, en presencia o ausencia de glucosa y en cultivos con amonio o nitrato como fuente de nitrógeno. Como se puede apreciar en las figuras 25 y 26, la IDH no presenta variaciones significativas de actividad en función de la fuente de nitrogeno utilizada si bien se observa una menor actividad durante el crecimiento mixotrófico.

En cuanto a la fase de crecimiento la actividad IDH presenta su pico máximo en la fase lineal para decaer después en las etapas finales del cultivo.

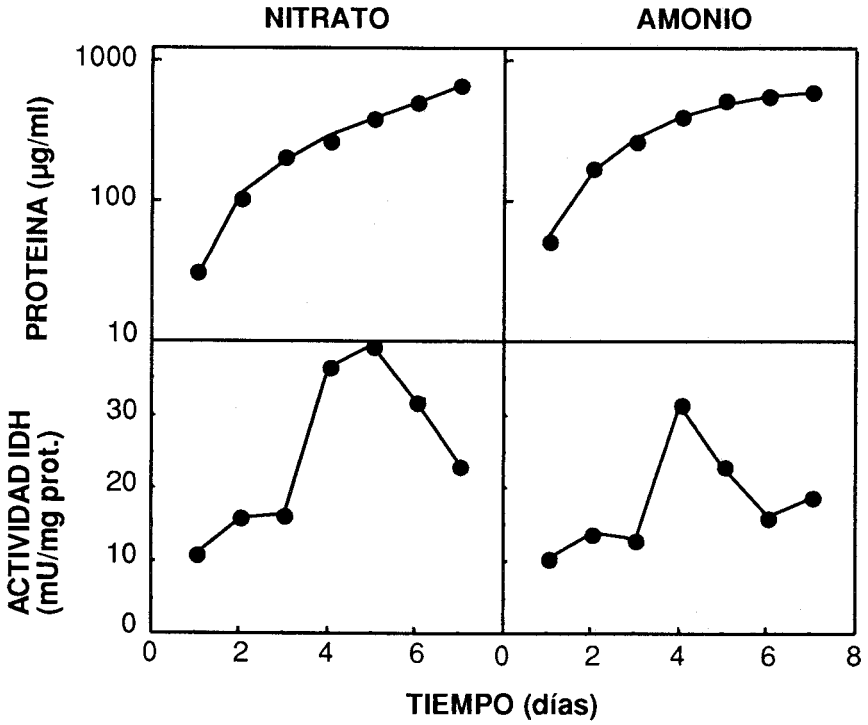


FIGURA 25. Evolución de la actividad NADP-IDH en células de *Synechocystis* 6803 cultivadas fotoautotróficamente con amonio o con nitrato como fuente de nitrógeno.

Los cultivos fueron inoculados a una concentración inicial de 0.1 μg de clorofila por ml, con células crecidas fotoautotróficamente en nitrato. Los datos corresponden a un experimento típico. La actividad IDH se midió en extractos crudos tal como se describe en el apartado 2.2.

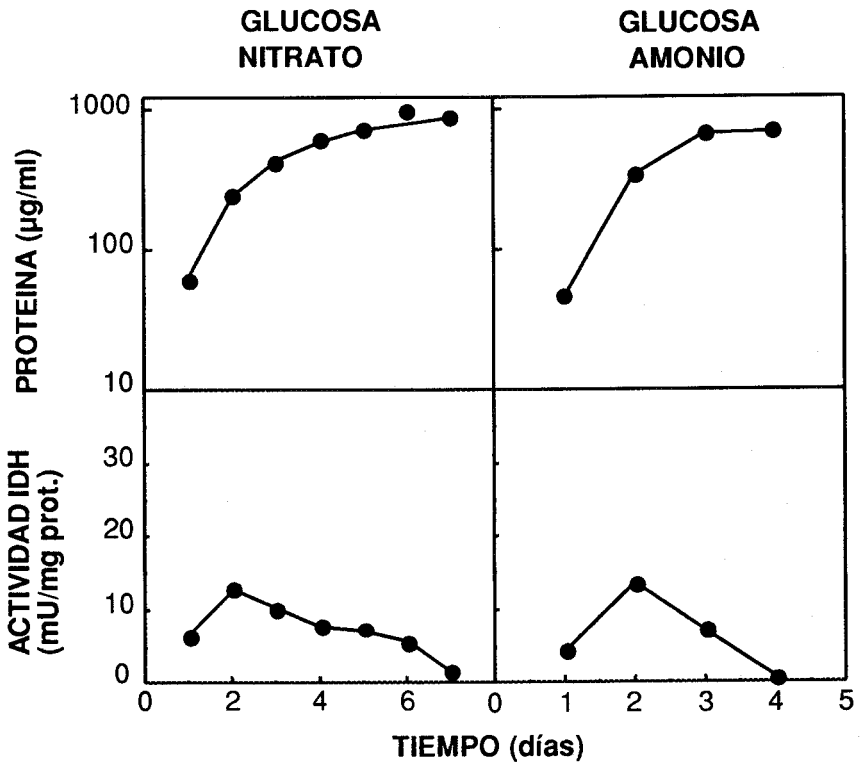


FIGURA 26. Evolución de la actividad NADP-IDH en células de *Synechocystis* 6803 cultivadas mixotróficamente con amonio o con nitrato como fuente de nitrógeno.

Los cultivos fueron inoculados a una concentración inicial de 0.1 μg de clorofila por ml, con células crecidas fotoautotróficamente en nitrato. Los datos corresponden a un experimento típico. La actividad IDH se midió en extractos crudos tal como se describe en el apartado 2.2.

3.8.2. Influencia de la oscuridad y de la ausencia de CO_2 sobre la actividad NADP-IDH

Considerando que en cianobacterias la IDH representa la etapa final de una de las ramas del ciclo de Krebs abierto que opera en estos organismos y que su sustrato proviene en última instancia de la fijación fotosintética del CO_2, se ha estudiado la posible modulación de la actividad IDH por factores ambientales como la oscuridad o la ausencia de CO_2 que regulan la actividad fotosintética. Como se muestra en la tabla 12 ninguno de estos factores provocó cambios significativos en los niveles de actividad NADP-IDH de *Synechocystis*, cuando se sometieron células de este organismo a tratamientos de cuatro horas de ausencia de CO_2 o de veinte horas en oscuridad. Tratamientos mas prolongados de ausencia de CO_2 proporcionaron resultados similares (datos no mostrados).

Tabla 12. Influencia de la oscuridad y la ausencia de CO_2 sobre la actividad NADP-IDH de *Synechocystis*.

	Actividad (mU/mg prot.)[a]	
	Nitrato	Amonio
Oscuridad[b]		
Control	27,5	32,0
Oscuridad	36,0	29,5
Ausencia de CO_2[c]		
Control	24,5	22,0
Menos CO_2	25,5	23,5

[a] La actividad NADP-IDH se determinó en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos.
[b] Las células se transfirieron a oscuridad, durante 24 h, tras dos días de cultivo fotoautotrófico.
[c] El CO_2 fue eliminado del medio, como se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.1.1.2.), tras dos días de cultivo normal. La actividad se ensayó tras 4 h de tratamiento.

3.8.3. Influencia de la ausencia de fuente nitrogenada sobre la actividad y la cantidad de NADP-IDH presente en *Synechocystis*

Como se ha señalado en la Introducción, la IDH es responsable en cianobacterias del aporte de 2-oxoglutarato necesario para la asimilación del amonio mediante la ruta GS-GOGAT. Dado que la ausencia de una fuente de nitrógeno provoca en *Synechocystis* la inducción de enzimas implicadas directamente en la asimilación del mismo como es el caso de la glutamina sintetasa (Reyes y Florencio, comunicación personal), se ha estudiado si la situación metabólica creada en condiciones de hambre de nitrógeno altera de alguna forma los niveles de actividad y/o la cantidad de NADP-IDH presente en este organismo. Como muestra la figura 27 la actividad IDH experimentó un aumento de entre 4 y 5 veces tras diez horas de cultivo en ausencia de fuente nitrogenada y este efecto fue similar tanto en células provenientes de cultivo en nitrato como en amonio.

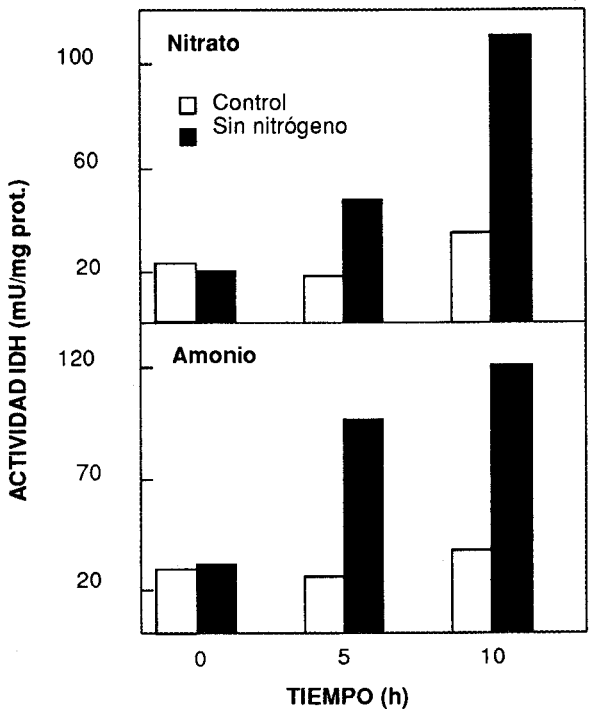


FIGURA 27. Influencia de la ausencia de fuente nitrogenada sobre la NADP-IDH de *Synechocystis* 6803.

Las células fueron lavadas y transferidas a medio carente de nitrógeno combinado tras alcanzar los cultivos 6-8 μg de clorofila por ml en condiciones de crecimiento fotoautotrófico en nitrato o en amonio. En los cultivos control no se eliminó la fuente nitrogenada aunque las células se sometieron a un proceso similar en todos los casos. Se muestra el resultado de un experimento típico.

Con objeto de determinar si este aumento de actividad estaba acompañado de un aumento en la cantidad de enzima presente en las células o se debía a una regulación de la actividad, se procedió a cuantificar mediante detección con anticuerpos la enzima presente en extractos procedentes de células cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno y sometidas a 5 y 10 horas de hambre de nitrógeno. En el caso de células cultivadas con nitrato y sometidas al mismo tratamiento se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados). Como se muestra en la figura 28 la cantidad de IDH presente en extractos procedentes de células sometidas a hambre fue superior a la cantidad de enzima presente en el extracto del mismo cultivo antes de eliminar el amonio del medio.

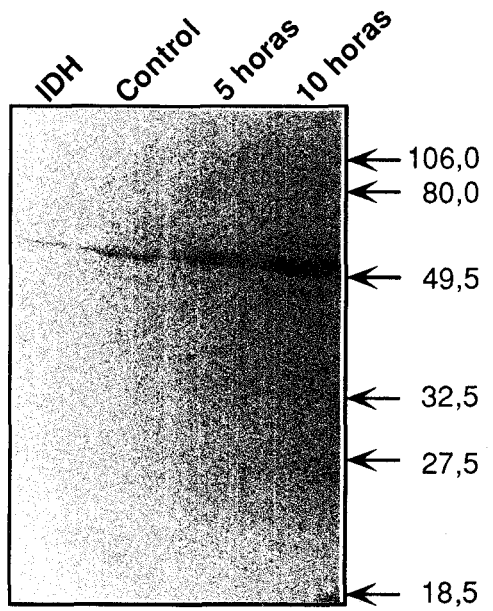


FIGURA 28. Cuantificación mediante Western blot de la NADP-IDH presente en células de *Synechocystis* 6803 sometidas a hambre de nitrógeno.

Se realizó electroforesis en presencia de SDS de cantidades iguales de proteína (85 μg) de extractos crudos procedentes de células control o sometidas a 5 y 10 h respectivamente de hambre de nitrógeno, junto con 2 μg de IDH purificada de *Synechocystis* 6803 y proteínas marcadoras de masa molecular. Las proteínas se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se procedió al revelado con anti-NADP-IDH como se describe en el apartado 2.3.4.3.

3.9. INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA NADP-IDH DE *Anabaena*

Como se ha descrito en la Introducción, *Anabaena* sp. PCC 7120 es una

cianobacteria fijadora de dinitrógeno capaz de crecer por tanto en medio carente de nitrógeno combinado así como en medios conteniendo nitrato o amonio como fuente de nitrógeno. Por otra parte la IDH ha sido propuesta como posible donadora de poder reductor para la fijación de dinitrógeno, a través de la producción de NADPH. Con objeto de determinar si existía alguna modulación de la actividad y/o de la cantidad de proteína IDH presente en *Anabaena,* cultivada en las diferentes fuentes de nitrógeno, se realizaron medidas de actividad en extractos procedentes de células cultivadas con nitrato, amonio o en condiciones de fijación. En la figura 29 se muestran los valores obtenidos en un experimento típico. Como se puede observar, la actividad obtenida en extractos procedentes de cultivos con nitrato o amonio fue entre un 60-70% de la obtenida en cultivos fijando dinitrógeno. Esta diferencia es especialmente patente en las fases iniciales de los cultivos siendo las diferencias mucho menos evidentes en las etapas tardías de los mismos. Como se muestra en la figura, el aumento de actividad fue acompañado de un aumento de la cantidad de enzima según se comprobó mediante la detección con anticuerpos (anti-IDH de *Synechoystis*) de la cantidad de NADP-IDH presente en los extractos de *Anabaena.*

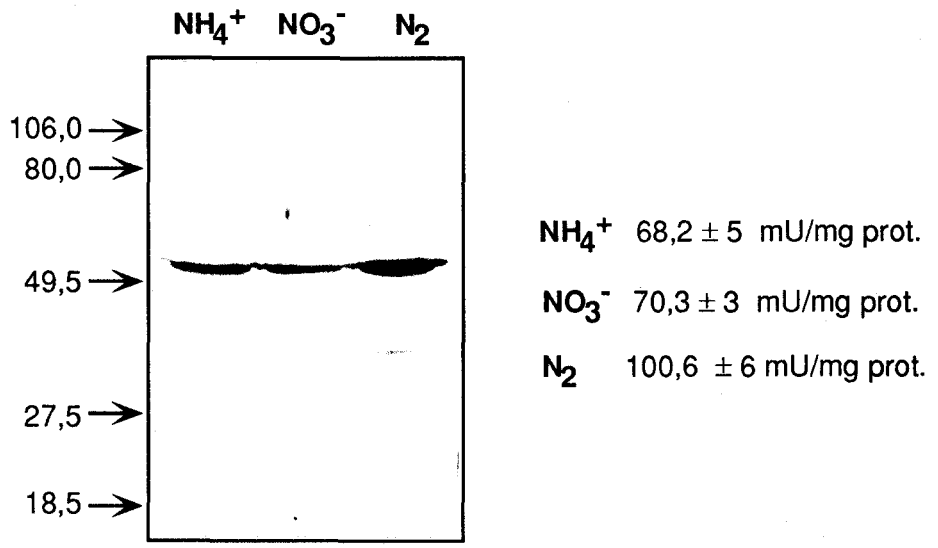


FIGURA 29. Cuantificación mediante Western blot de la NADP-IDH presente en células de *Anabaena* 7120 cultivadas en diferentes fuentes de nitrógeno.

En la parte derecha de la figura se muestran los valores de actividad específica NADP-IDH obtenidos en extractos de *Anabaena* en las diferentes condiciones de cultivo. Tras cuantificar la proteína de cada uno de ellos se sometieron al proceso de Western blot cantidades iguales de proteína (180 μg) como se describe en el apartado 2.3.4.3.

3.10. CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA NADP-IDH (*icd*) DE *Anabaena*

En este apartado se describe la clonación del gen estructural de la NADP-IDH de *Anabaena* sp. PCC 7120, la cual se llevó a cabo con objeto de caracterizar el gen y como paso previo a la obtención, mediante manipulación *in vitro*, de mutantes afectados en la actividad IDH que pudieran aportar luz acerca del papel fisiológico de la enzima en esta cianobacteria.

3.10.1. Clonación y expresión en *E. coli* del gen *icd* de *Anabaena*

Dado que se disponía de mutantes *icd* de *E. coli*, carentes de actividad IDH y auxótrofos por tanto para el glutamato, y teniendo en cuenta la similitud estructural y cinética entre la IDH cianobacteriana y la de *E. coli*, que se deriva de los estudios bioquímicos, se procedió a la clonación del gen *icd* de *Anabaena* siguiendo una estrategia de complementación. El mutante *icd* de *E. coli* DEK2004 se transformó con una genoteca de expresión de ADN de *Anabaena* (Linden *et al.*, 1993), seleccionando en medio mínimo la prototrofía para glutamato de dicho mutante. En la figura 30 se esquematiza el proceso seguido para la construcción de la genoteca y la complementación. Se aisló por este procedimiento un único clon de la estirpe DEK 2004 capaz de crecer en medio mínimo sin glutamato añadido. A partir de este clon se extrajo un plásmido (pMA1) cuya capacidad de conferir prototrofía a la estirpe mutante se recomprobó mediante transformación.

El plásmido pMA1 portaba un inserto de 5,8 kb cuyo mapa de restricción se muestra en la figura 31.

Como se muestra en la tabla 13 el ensayo de la actividad NADP-IDH de las células que portaban el plásmido pMA1 reveló que dicho plásmido confería elevada actividad a las células de las estirpes DEK 2004, utilizada para la clonación, y EB 106, ambas mutantes en el gen *icd*. En ambos casos, la actividad conferida por pMA1 era superior a la presente en la estirpe silvestre de *E. coli* K12.

Con objeto de comprobar que la actividad NADP-IDH detectada en el clon seleccionado y expresada a partir de pMA1 correspondía a la de la enzima de *Anabaena* 7120 se obtuvieron extractos crudos de esta cianobacteria así como de clones de las dos estirpes *icd* de *E. coli* transformadas con pMA1 o con pBluescript II SK(+) (pBS), y se sometieron a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. La figura 32A muestra la detección en gel de la actividad NADP-IDH presente en cada caso. Como se puede apreciar, la movilidad electroforética de la NADP-IDH presente en los clones transformados con pMA1 es idéntica a la que se observa en *Anabaena* 7120. Por otra parte los niveles de actividad observados en los transformantes son muy elevados, lo cual sugiere una sobreexpresión de la enzima y correlaciona con la aparición de una banda diferencial de proteína entre los

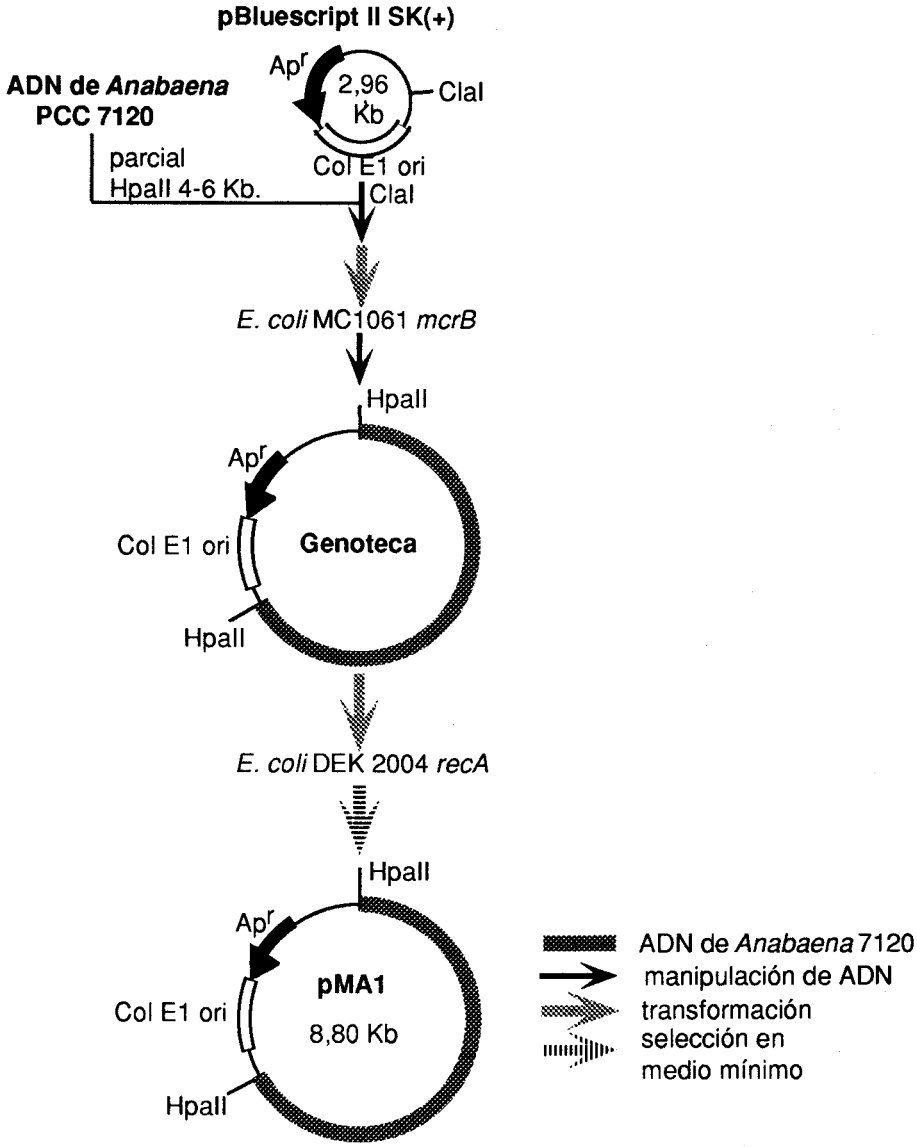


FIGURA 30. Esquema del proceso de clonación del gen *icd* de *Anabaena* 7120 por complementación de la estirpe DEK 2004 de *E. coli*, auxótrofa para el glutamato.

extractos transformados con pMA1 y los transformados con pBS, de movilidad electroforética idéntica a la actividad NADP-IDH y que se observa al revelar el gel con azul de Coomassie (figura 32B).

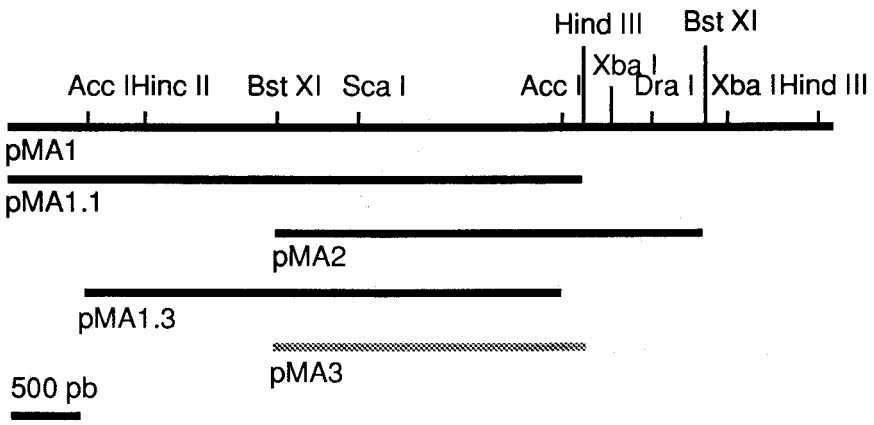


FIGURA 31. Mapa de restricción del inserto de ADN de *Anabaena* 7120 contenido en el plásmido pMA1, así como de los subclones derivados del mismo.

Se indica con trazo sombreado el inserto del subclón mas pequeño obtenido a partir de pMA1 cuya secuencia se muestra en la figura 38.

Tabla 13. Actividad NADP-IDH en estirpes de *E. coli* que expresan el gen *icd* de *Anabaena* 7120

Estirpe	Actividad NADP-IDH (U/mg prot.) [a]
DEK 2004 (pBS)	0,00
DEK 2004 (pMA1)	0,78
DEK 2004 (pMA3)	**6,90**
EB 106 (pBS)	0,00
EB 106 (pMA1)	0,72
K12	0,23

[a] Las células se cultivaron en medio Luria suplementado con ampicilina salvo en el caso de la estirpe K12, se rompieron mediante ultrasonidos y se centrifugaron para obtener el extracto crudo como se describe en Materiales y Métodos. La actividad se determinó en condiciones estándar.

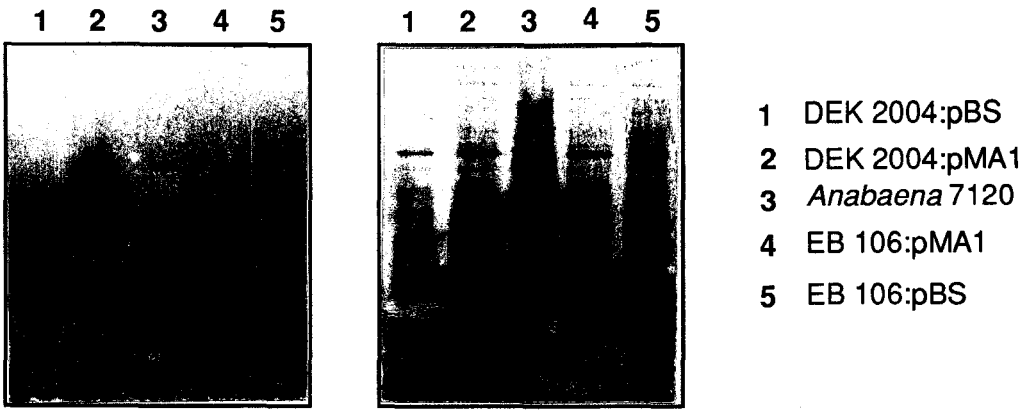


FIGURA 32. (A) Movilidad electroforética, en condiciones no desnaturalizantes, de la actividad NADP-IDH en extractos crudos de clones de *E. coli* que expresan el gen *icd* de *Anabaena* 7120 y de un extracto crudo de esta cianobacteria. (B) Tinción de proteínas con azul de Coomassie de las muestras de extractos crudos cuya actividad NADP-IDH se muestra en A.

Se utilizaron las estirpes de *E. coli* auxótrofas de glutamato DEK 2004 y EB 106 (tabla 2.), transformadas con el vector pBluescript (pBS) o con el plásmido pMA1, derivado de pBS conteniendo el gen *icd* de *Anabaena*. La detección de actividad NADP-IDH en gel de poliacrilamida se llevó a cabo como se describe en el apartado 2.3.3.4. Las flechas indican la banda de proteína diferencial, presente solo en los clones transformados con pMA1, cuya movilidad coincide con la de la actividad NADP-IDH.

Para confirmar que la actividad NADP-IDH expresada a partir del fragmento clonado presenta una movilidad electroforética idéntica a la de la IDH de *Anabaena* 7120 y diferente a la de la NADP-IDH de *E. coli*, se llevó a cabo un experimento similar al anterior en el que se sometió a electroforesis la enzima purificada a partir de *Anabaena* 7120 así como extractos crudos de *E. coli* DEK2004 transformada con pMA3 (derivado de pMA1 conteniendo el gen *icd* clonado, figura 31) y con pTK513 (conteniendo el gen *icd* de *E. coli*). La figura 33 muestra el resultado tras detectar la actividad NADP-IDH de cada una de las muestras.

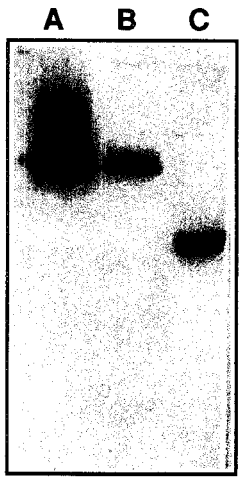


FIGURA 33. Movilidad electroforética, en condiciones no desnaturalizantes, de la actividad NADP-IDH de *Anabaena* y *E. coli*.

Se realizaron extractos crudos de clones de *E. coli* DEK 2004 transformados con pMA3 y pTK513, que expresan la NADP-IDH de *Anabaena* y *E. coli* respectivamente. Se sometieron los extractos a electroforesis junto con IDH purificada de *Anabaena* 7120 (1,5 µg) y se reveló su actividad como se describe en el apartado 2.3.3.4.

El uso del plásmido pTK513 permitió sobreexpresar la actividad NADP-IDH de *E. coli* y visualizarla en gel lo cual no fue posible utilizando la estirpe silvestre K12, debido probablemente a que la enzima de *E. coli* es mas lábil o a que las condiciones de ensayo en gel usadas para la NADP-IDH de cianobacterias no son las mas adecuadas en el caso de *E. coli*.

Para realizar una comprobación adicional de que la NADP-IDH clonada y expresada en *E. coli* DEK 2004 era la enzima de *Anabaena* 7120 se llevó a cabo la inmunotitulación de la actividad NADP-IDH presente en *E. coli* DEK 2004 (pMA3) y *E. coli* DEK 2004 (pTK513) con anticuerpos anti-IDH de *Synechocystis* que, como se describió en el apartado 3.5, eran capaces de inmunoprecipitar la actividad NADP-IDH purificada de *Anabaena* 7120. La figura 34 muestra el resultado de esta inmunotitulación observándose que efectivamente el antisuero es capaz de inmunoprecipitar la actividad expresada a partir de pMA3 y no la expresada a partir de pTK513, que es la procedente del gen *icd* de *E. coli*.

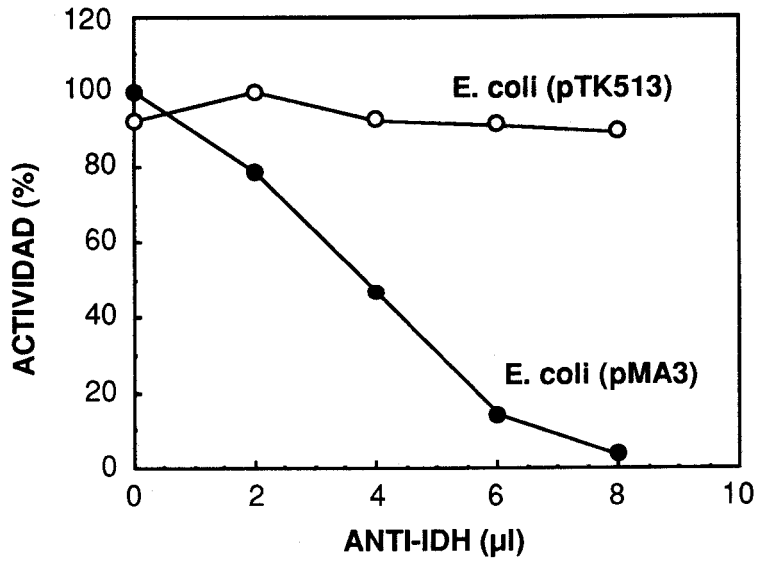


FIGURA 34. Inmunotitulación de la actividad NADP-IDH de *Anabaena* y *E. coli* con anti-IDH de *Synechocystis* 6803.

Se incubaron cantidades constantes de los extractos de DEK 2004 (pMA3) y DEK 2004 (pTK513) con volumenes sucesivamente mayores de antisuero anti-IDH de *Synechocystis* como se describe en el apartado 2.3.4.2. La actividad enzimática remanente en los sobrenadantes se midió en las condiciones estándar descritas. El 100% de actividad corresponde en ambos casos a 50 mU.

3.10.2. Localización del gen *icd* dentro del fragmento de ADN clonado

Para localizar el gen *icd* dentro del inserto de 5,8 kb del plásmido pMA1, se llevó a cabo la subclonación de varios fragmentos construyéndose así los plásmidos pMA1.1, pMA2 y pMA1.3. (figura 31 p. 88). Estos tres plásmidos mantenían la capacidad de conferir prototrofía a la estirpe auxótrofa para glutamato DEK 2004 por lo que se dedujo que el gen *icd* se encontraba localizado en la zona central del inserto de pMA1 común a los tres plásmidos construidos. Se procedió posteriormente a la subclonación a partir de pMA2 del fragmento *Bst*X I-*Hin*D III de 2,1 kb denominándose a este nuevo plásmido pMA3 (figura 31 p. 88). El plásmido pMA3 confirió a la estirpe mutante de *E. coli* una actividad NADP-IDH muy elevada y

entre cinco y seis veces superior a la que confiere pMA1 (tabla 13 p. 88). Dicha actividad, como era de esperar, presentó una movilidad electroforética idéntica a la de la NADP-IDH purificada de *Anabaena* (figura 33 p. 90).

Los fragmentos de ADN de *Anabaena* de los plásmidos pMA1.3 y pMA2 que contienen el gen *icd* se clonaron en el vector pBS en ambas orientaciones, respecto a la dirección de transcripción del promotor del gen *lac*Z contenido en dicho vector. Los plásmidos resultantes eran capaces en todos los casos de complementar la auxotrofía de la estirpe DEK2004. Se concluyó por tanto que el gen *icd* de *Anabaena* se expresa en *E. coli* a partir de su propio promotor, descartándose que la transcripción de este gen se lleve a cabo a partir del promotor del gen *lac*Z.

3.10.3. Secuenciación y análisis del inserto de pMA3 que contiene el gen *icd*

Dado que el inserto de 2,1 kb del plásmido pMA3 parecía contener el gen *icd* se procedió a secuenciar este fragmento utilizando para ello deleciones seriadas de pMA3 (figura 35) realizadas con exonucleasa III como se describe en el apartado 2.4.4.1.

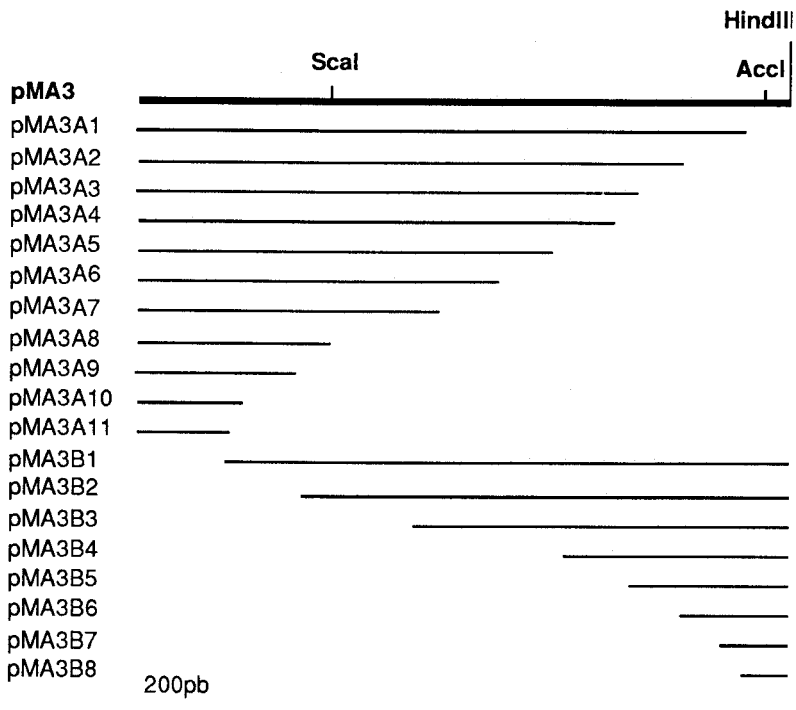


FIGURA 35. Plásmidos conteniendo deleciones seriadas del inserto del plásmido pMA3 obtenidos mediante digestión con exonucleasa III.

Las lineas horizontales situadas junto al nombre de cada plásmido indican la extensión del fragmento de ADN de *Anabaena* 7120 que contienen. La digestión con exonucleasa III seguida de tratamiento con S1 y ligación se llevó a cabo como se describe en el apartado 2.4.4.1.

La secuenciación se llevó a cabo por el procedimiento de la terminación de cadenas con dideoxinucleótidos (apartado 2.4.4.2). A partir de los clones mostrados en la figura 35 se obtuvieron fragmentos de secuencia de longitud variable, los cuales se superpusieron para obtener la secuencia lineal completa. La estrategia de secuenciación seguida para ambas cadenas hasta un total de 2.157 nucleótidos secuenciados se muestra en la figura 36.

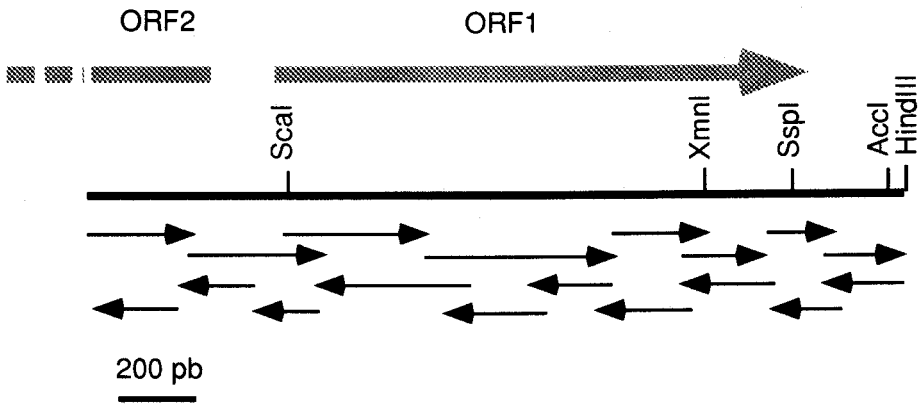


FIGURA 36. Estrategia seguida para la secuenciación del fragmento de ADN de *Anabaena* 7120 que contiene el gen *icd*.

Se muestra la región de 2,1 kb de ADN de *Anabaena* secuenciada. Las flechas indican la dirección y extensión de la secuencia determinada a partir de cada uno de los clones utilizados. Se señalan igualmente las pautas de lectura abierta encontradas.

Mediante análisis por ordenador de la secuencia obtenida se determinaron las zonas de lectura abierta (ORFs) en las seis fases posibles. El resultado de este análisis se muestra en la figura 37. De entre las ORFs encontradas tan solo una de ellas, denominada ORF1 en la figura 36, presentaba el tamaño suficiente para codificar la NADP-IDH de *Anabaena* ya que daría lugar a una proteína de 473 aminoácidos con una masa molecular de 52.194 Da, lo cual está de acuerdo con la determinación de tamaño previamente realizada (figura 14 p. 64) con la IDH purificada de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se identificó por tanto ORF1 como la zona de lectura abierta que codificaba la NADP-IDH de *Anabaena* y se denominó *icd*.

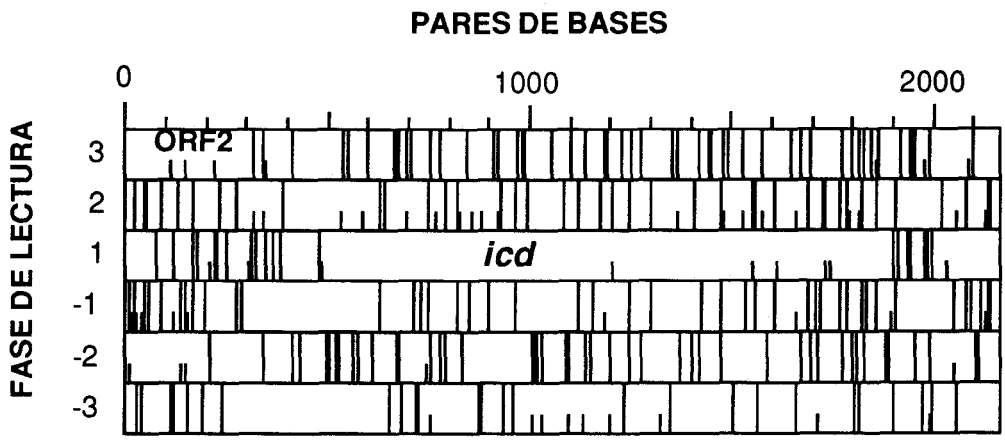


FIGURA 37. Análisis de las posibles fases de lectura abierta existentes en el fragmento de ADN de *Anabaena* 7120 que contiene el gen *icd*.

Las lineas verticales cortas indican codones que codifican para el aminoácido metionina; las lineas verticales largas indican codones de terminación de la traducción. El estudio se realizó utilizando el programa DNA-Strider (apartado 2.7).

El análisis de su secuencia (figura 38) y su posterior comparación con las secuencias contenidas en los bancos de datos (apartado 3.12) confirmó que la asignación realizada era correcta.

Como se indica en la figura 38 la secuencia anterior al gen *icd* contiene un posible sitio de unión a ribosomas (secuencia de Shine-Dalgarno) de 4 pb que coincide con cuatro de los nucleótidos de la secuencia de Shine-Dalgarno consenso de *E. coli*. Esta secuencia, 5'GGAG3', muestra una complementariedad perfecta con el extremo 3' del ARN ribosómico 16S de *Anabaena* sp. PCC 7120 cuya secuencia es 5'GGAUCACCUCCUUU3' (Ligon *et al.*, 1991), y permitiría la unión a ribosomas del ARN mensajero de *icd*. En cuanto a la presencia de posibles secuencias promotoras en esta región existen dos secuencias que se asemejan a las secuencias -10 y -35 consensos de *E. coli*. Dichas secuencias 5'TATACC3' y 5'TTGCGG3' se encuentran separadas por 18 nucleótidos y situadas a 190 y 208 nucleótidos respectivamente del comienzo del gen *icd*.

FIGURA 38. Secuencia nucleotídica del fragmento de ADN de *Anabaena* que contiene el gen *icd*.

Sobre la secuencia de nucleótidos se muestra la secuencia de aminoácidos traducida a partir de la ORF1 (*icd*). Subrayada se indica una posible secuencia de unión de ribosomas identificada. Se señalan con subrayado grueso seis repeticiones imperfectas de un heptanucleótido con secuencia consenso 5'CCCCAAT3'. En negrita se muestran dos posibles zonas promotoras -10 y -35.

```
                AAAATTCCATCAAAACATCTAATCCTTCATTGCCCACATCAGCTAACTGTAGGATTATCTGTTGTTGGACTTGGATAGACCCAG 84
CGATTAGCCGTTGCCGGAGGGAGTCGATGTCATTAGCAGTGCCTGATACAATCATTGGGTCTGTCATGCCATTACTCGTAATTAGCGGGAGCGTGAAAA 183
AGCGGTCAGCTATCGGCCTTCTTTATGGCGAAGCAATGATAGCGAAAAGTAGTTTACTATTTTTGATCGTACAAAA**TTGCGG**CGGTTTCACTGAAAATC 282
C**TATACC**GAAATCCTCCAATGCTGTAAAAAGATGAATAGGGGGAAAATCTGCGACTCAATGAATGAGGGAGTGGGAAGAGGTAGGAGAGCAGGGAGTAG 381
AAAGTAGAGGCGAAAACAACAAAAAATCCTAATCCCCAGTACCCAATCCTCAATCCCCAATCCCCAATACACAACGTATCTTTGTGGAGTGTGTGAAAT 480

                5                                                  20
Met Tyr Asn Lys Ile Thr Pro Pro Thr Thr Gly Glu Lys Ile Thr Phe Lys Asn Gly Glu Pro Val Val Pro Asp
ATG TAC AAC AAG ATT ACC CCC CCT ACA ACC GGA GAA AAA ATT ACC TTC AAA AAT GGT GAG CCG GTT GTG CCT GAC 555
                30                                                 45
Asn Pro Ile Ile Pro Phe Ile Arg Gly Asp Gly Thr Gly Ile Asp Ile Trp Pro Ala Thr Glu Lys Val Leu Asp
AAT CCA ATT ATC CCC TTT ATT CGG GGC GAT GGA ACA GGA ATT GAT ATT TGG CCG GCT ACA GAA AAA GTA CTA GAT 630
                55                                                 70
Ala Ala Val Ala Lys Ala Tyr Gln Gly Lys Arg Lys Ile Ser Trp Phe Lys Val Tyr Ala Gly Asp Glu Ala Cys
GCG GCG GTA GCC AAA GCG TAT CAA GGC AAG CGT AAA ATT AGC TGG TTT AAG GTT TAC GCT GGG GAT GAA GCC TGT 705
                80                                                 95
Asp Leu Tyr Gly Thr Tyr Gln Tyr Leu Pro Glu Asp Thr Leu Thr Ala Ile Arg Glu Tyr Gly Val Ala Ile Lys
GAT TTA TAC GGG ACT TAT CAG TAT TTA CCA GAG GAT ACA TTA ACA GCC ATT AGG GAA TAT GGT GTG GCA ATT AAA 780
                105                                                120
Gly Pro Leu Thr Thr Pro Val Gly Gly Gly Ile Arg Ser Leu Asn Val Ala Leu Arg Gln Ile Phe Asp Leu Tyr
GGG CCT TTG ACT ACC CCT GTC GGT GGT GGT ATC CGT TCC TTA AAT GTG GCA CTC AGA CAA ATT TTT GAC CTA TAT 855
                130                                                145
Ala Cys Val Arg Pro Cys Arg Tyr Tyr Ala Gly Thr Pro Ser Pro His Lys Asn Pro Glu Lys Leu Asp Val Ile
GCC TGT GTA CGT CCT TGC CGT TAT TAT GCA GGT ACA CCC TCA CCC CAC AAA AAT CCT GAA AAA CTT GAT GTA ATT 930
                155                                                170
Val Tyr Arg Glu Asn Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Gly Ile Glu Trp Lys Gln Gly Ser Glu Ile Gly Asp Arg Leu
GTC TAT CGG GAA AAC ACG GAA GAT ATT TAT TTA GGG ATT GAG TGG AAA CAA GGT AGT GAA ATA GGC GAT CGC CTC 1005
                180                                                195
Ile Ser Ile Leu Asn Lys Glu Leu Ile Pro Ala Thr Pro Glu His Gly Lys Lys Gln Ile Pro Leu Asp Ser Gly
ATC TCT ATC CTC AAC AAA GAA CTC ATC CCC GCC ACC CCA GAA CAC GGT AAA AAG CAA ATC CCC CTC GAT TCT GGT 1005
                205                                                220
Ile Gly Ile Lys Pro Ile Ser Lys Thr Gly Ser Gln Arg Leu Val Arg Arg Ala Ile Lys His Ala Leu Thr Leu
ATA GGG ATC AAA CCC ATC AGT AAA ACA GGT TCC CAG CGC CTA GTA CGC CGC GCC ATT AAA CAC GCC CTC ACA TTA 1080
                230                                                245
Pro Lys Asp Lys Gln Gln Val Thr Leu Val His Lys Gly Asn Ile Met Lys Tyr Thr Glu Gly Ala Phe Arg Asp
CCC AAA GAC AAG CAA CAA GTG ACT TTG GTG CAT AAG GGT AAC ATC ATG AAG TAC ACC GAA GGC GCT TTC CGT GAT 1155
                255                                                270
Trp Gly Tyr Glu Leu Ala Thr Ser Glu Phe Arg Gln Glu Thr Val Thr Glu Arg Glu Ser Trp Ile Leu Ser Asn
TGG GGT TAC GAA TTA GCT ACA AGT GAG TTC CGC CAA GAG ACT GTC ACT GAA CGG GAA TCT TGG ATT TTA AGC AAC 1230
                280                                                295
Lys Glu Lys Asn Pro Asn Ile Ser Leu Glu Asp Asn Ala Arg Gln Ile Asp Pro Gly Phe Asp Ala Leu Thr Pro
AAG GAG AAA AAC CCG AAC ATT TCC TTG GAA GAC AAC GCC CGT CAA ATT GAC CCT GGT TTT GAT GCC CTT ACT CCA 1305
                305                                                320
Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Lys Glu Val Glu Thr Val Leu Asn Ser Ile Trp Glu Ser His Gly Asn Gly Lys
GAG AAA AAG GCG CAA ATT GTC AAG GAA GTA GAA ACA GTT CTT AAC TCA ATT TGG GAA AGC CAC GGT AAC GGT AAG 1455
                330                                                345
Trp Lys Glu Lys Val Leu Val Asn Asp Arg Ile Ala Asp Ser Ile Phe Gln Gln Ile Gln Thr Arg Pro Asp Glu
TGG AAA GAA AAA GTG TTA GTC AAT GAC CGG ATT GCT GAC AGT ATC TTT CAA CAA ATC CAA ACC AGA CCA GAT GAG 1530
                355                                                370
Tyr Ser Ile Leu Ala Thr Met Asn Leu Asn Gly Asp Tyr Leu Ser Asp Ala Ala Ala Ala Ile Val Gly Gly Leu
TAT TCA ATT CTG GCG ACA ATG AAC TTA AAC GGC GAT TAC TTG TCT GAT GCG GCG GCT GCT ATT GTC GGC GGC TTA 1605
                380                                                395
Gly Met Gly Pro Gly Ala Asn Ile Gly Asp Ser Cys Ala Val Phe Glu Ala Thr His Gly Thr Ala Pro Lys His
GGA ATG GGG CCA GGG GCA AAT ATT GGC GAT TCC TGC GCT GTG TTT GAA GCC ACT CAT GGT ACA GCA CCT AAA CAC 1680
                405                                                420
Ala Gly Leu Asp Arg Ile Asn Pro Gly Ser Val Ile Leu Ser Gly Val Met Met Leu Glu Tyr Met Gly Trp Gln
GCT GGC TTA GAC AGA ATT AAC CCA GGT TCA GTC ATT TTA TCT GGG GTA ATG ATG TTG GAG TAT ATG GGT TGG CAA 1755
                430                                                445
Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys Lys Gly Leu Ser Asp Ala Ile Ala Asn Ser Gln Val Thr Tyr Asp Leu Ala Arg
GAA GCC GCA GAC CTA ATT AAG AAA GGT TTA AGC GAT GCG ATC GCT AAC AGT CAA GTC ACC TAT GAT TTA GCT AGA 1830
                455                                                470
Leu Leu Glu Pro Pro Val Glu Pro Leu Lys Cys Ser Glu Phe Ala Asp Ala Ile Ile Lys His Phe Gly OCH
TTA CTC GAA CCA CCA GTT GAA CCT CTA AAA TGT TCT GAA TTT GCC GAC GCA ATT ATC AAA CAT TTT GGT TAA TTA 1905

ACCTGAGTTCGGGATAAGGAAAGGGACAGGTAGTAAGCTGAAAATAGTGTTAAACCCAGCAACCTGTCCTACTGATGAAGTGCCATTAACTAAATCTTT 2004
GGTTGGGAGTGGTATATAAAGTGTATGCACCAACAAGATACTTCATCCTTTTATGTGCGCGTCCCTGCAAGAGTTTTAGGATGTCTACGTGCTGGTGAG 2103
ATTACTATTATTCTATTTCCTGGGCATGGGTTAGTGCTAACAGAACCAATCGAA 2157
```

En la zona secuenciada anterior al gen *icd* es de destacar la presencia de seis repeticiones imperfectas de un heptanucleótido cuya secuencia consenso es 5'CCCCAAT3'. Estas repeticiones en tandem se marcan con subrayado grueso en la figura 38 y su posible papel se discutirá mas adelante.

El gen *icd* mostró un patrón de uso de codones muy similar a la media calculada para los genes con secuencia conocida de *Anabaena* sp. PCC 7120 (datos no mostrados) por lo que no parece existir ninguna peculiaridad en *icd* que pudiera afectar a la expresión de este gen a nivel traduccional.

3.11. CLONACION Y CARACTERIZACION DEL GEN ESTRUCTURAL DE LA NADP-IDH (*icd*) DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

Con objeto de llevar a cabo un estudio comparativo a nivel molecular que complementara el realizado previamente con las IDHs purificadas de *Anabaena* y *Synechocystis*, se procedió a clonar y caracterizar el gen *icd* de esta última cianobacteria. Por otra parte esta clonación nos permitiría la obtención de mutantes por manipulación *in vitro* y su posterior estudio fisiológico.

3.11.1. Detección de hibridación heteróloga entre el gen *icd* de *Anabaena* y el ADN genómico de *Synechocystis*

Dado que se había clonado previamente el gen *icd* de *Anabaena* se procedió a comprobar si existía hibridación entre este gen y el ADN genómico de *Synechocystis*. Para ello, se digirió este último con varias enzimas de restricción, se sometió a electroforesis y se hibridó en condiciones no restrictivas con un fragmento *Sca* I-*Acc* I de 1,4 kb procedente de pMA3 (figura 31 p. 88). Como se muestra en la figura 39 se obtuvo de esta forma un patrón de hibridación con cada una de las enzimas de restricción utilizadas. Este resultado permitió considerar la posibilidad de clonar el gen de la NADP-IDH de *Synechocystis* por hibridación con el gen *icd* de *Anabaena*.

3.11.2. Clonación del gen *icd* de *Synechocystis* mediante el aislamiento de fragmentos de ADN que presentan hibridación con el gen *icd* de *Anabaena*

Para el aislamiento de *icd* se llevó a cabo una estrategia que denominamos «clonación mediante construcción de subgenoteca» y cuyas etapas fundamentales se esquematizan en la figura 40.

Teniendo en cuenta los patrones de hibridación observados en la figura 39 se procedió a utilizar para la digestión del ADN genómico alguna de las enzimas que dieran lugar a fragmentos de hibridación únicos con la sonda de *icd*, pudiendose así esperar la clonación del gen *icd* de *Synechocystis* completo.

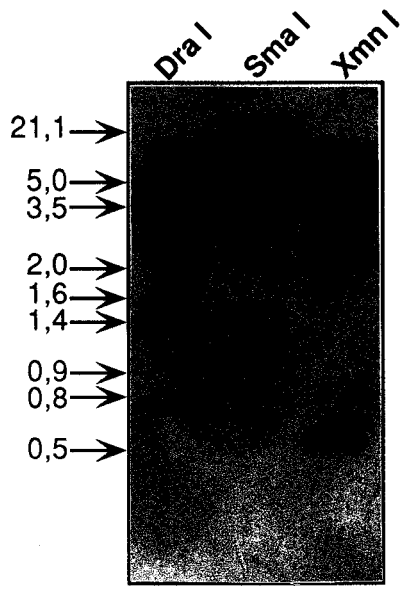


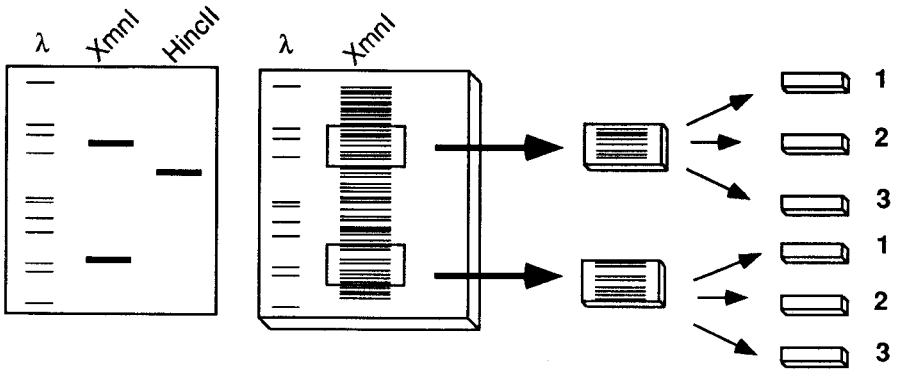
FIGURA 39. Hibridación de ADN total de *Synechocystis* 6803 con una sonda del gen *icd* de *Anabaena*.

El ADN de *Synechocystis* se digirió con las enzimas que se indican y se hibridó con una sonda *Sca* I-*Acc* I de 1,4 kb del gen *icd* de *Anabaena* a 55 °C. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado 2.4.2.9. Se indican los patrones de tamaño empleados (kb).

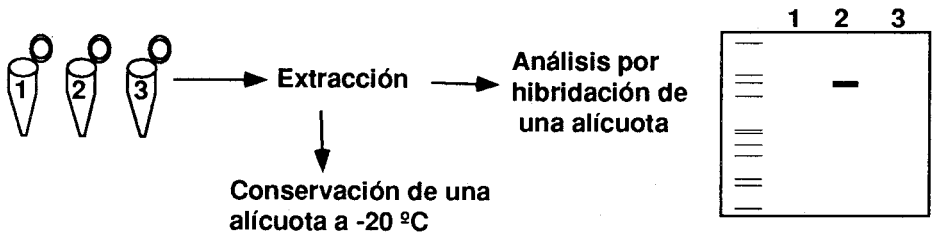
Los intentos llevados a cabo en este sentido fueron infructuosos y no fue posible en ningún caso clonar en *E. coli* estos fragmentos. Con objeto de evitar posibles impedimentos desconocidos que fueran la causa de este problema se intentó posteriormente la clonación de fragmentos parciales del gen *icd* para su posterior reconstrucción *in vitro*. Se aislaron de esta forma dos fragmentos *Xmn* I de 2,4 y 0,5 kb respectivamente que presentaban una clara hibridación con la sonda del gen *icd* de *Anabaena* como se muestra en la figura 39. Se clonaron estos fragmentos en pBluescript II SK (+) (pBS) y se denominó pMS1 al plásmido derivado que contenía el inserto de 0,5 kb de *Synechocystis* y pMS2 al que contenía el inserto de 2,4 kb. El mapa de restricción de los fragmentos clonados se muestra en la figura 41.

1. Identificación de bandas de hibridación.

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



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



4. Clonación de la fracción que contiene el fragmento deseado en pBluescript SK (+).

5. Transformación de *E. coli* MC1061 y selección en medio con ampicilina.

6. Picaduras a filtros de nitrocelulosa y conservación de duplicados.

7. Selección de los clones positivos por hibridación.

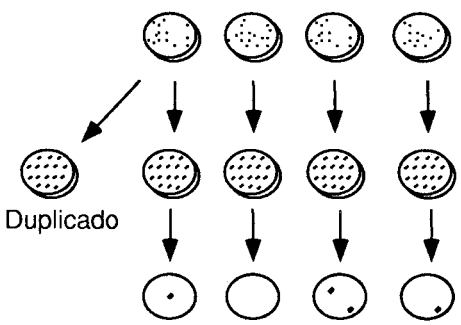


FIGURA 40. Esquema del proceso de clonación de fragmentos de ADN cromosómico mediante construcción de una subgenoteca.
Se muestran las siete etapas principales del proceso desde la detección de secuencias homólogas a la sonda disponible, hasta la obtención de clones de *E. coli* conteniendo el fragmento deseado clonado en un plásmido.

3.11.3. Localización del gen *icd* de *Synechocystis* en los fragmentos clonados y secuenciación de los mismos

Se procedió a localizar el gen *icd* en los fragmentos clonados mediante identificación en los mismos de secuencias homólogas al gen *icd* de *Anabaena* que se había utilizado como sonda para la clonación. Para ello, se secuenciaron los extremos de los insertos de pMS1 y pMS2 por el procedimiento de la terminación de cadenas con dideoxinucleótidos, utilizando como cebadores oligonucleótidos comerciales cuyas secuencias complementarias se encontraban localizadas en pBS a ambos lados de los insertos clonados. Se identificaron de esta forma secuencias homólogas al gen *icd* de *Anabaena* en ambos extremos del inserto de pMS1 y en uno de los extremos de pMS2 lo que permitió situar el gen *icd* tal como se muestra en la figura 41.

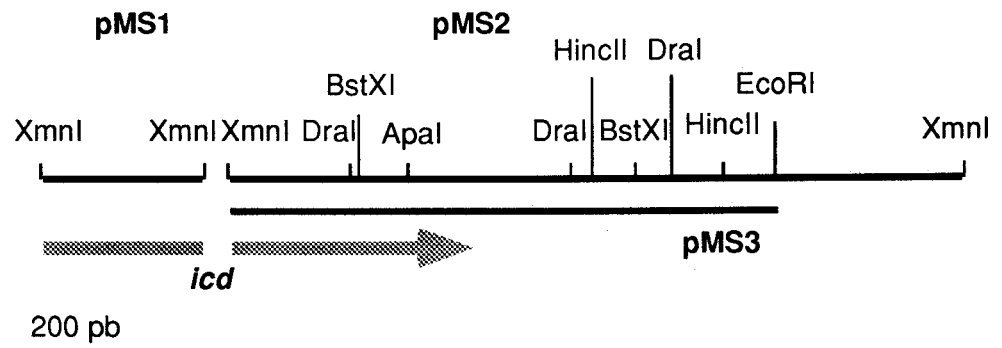


FIGURA 41. Mapa de restricción de los insertos de ADN de *Synechocystis* contenidos en los plásmidos pMS1 y pMS2.
Se muestra el mapa de restricción de los dos fragmentos *Xmn* I clonados así como la localización del gen *icd* en los mismos, deducida de la secuenciación de los extremos.

Una vez localizado el gen *icd* y determinada su orientación y antes de proceder a su secuenciación, se llevó a cabo una subclonación del mismo mediante la construcción de un plásmido derivado de pMS2 en el que se eliminaba un fragmento de 0,6 kb del extremo contrario al que contenía el gen *icd* y al que se denominó pMS3 (figura 41).

Con objeto de secuenciar los insertos de pMS1 y pMS3 se obtuvieron deleciones seriadas de los mismos y se determinó su secuencia siguiendo un procedimiento análogo al descrito para el gen *icd* de *Anabaena*. El análisis por ordenador de las secuencias obtenidas permitió localizar las zonas de lectura abierta (ORFs) en las seis fases posibles. La figura 42 muestra el resultado de dicho análisis. El inserto de 536 pb de pMS1 presentó una ORF a lo largo de toda su secuencia mientras que el fragmento de 1.791 pb contenido en pMS3 mostró dos ORFs principalmente, denominadas ORF1 y ORF2.

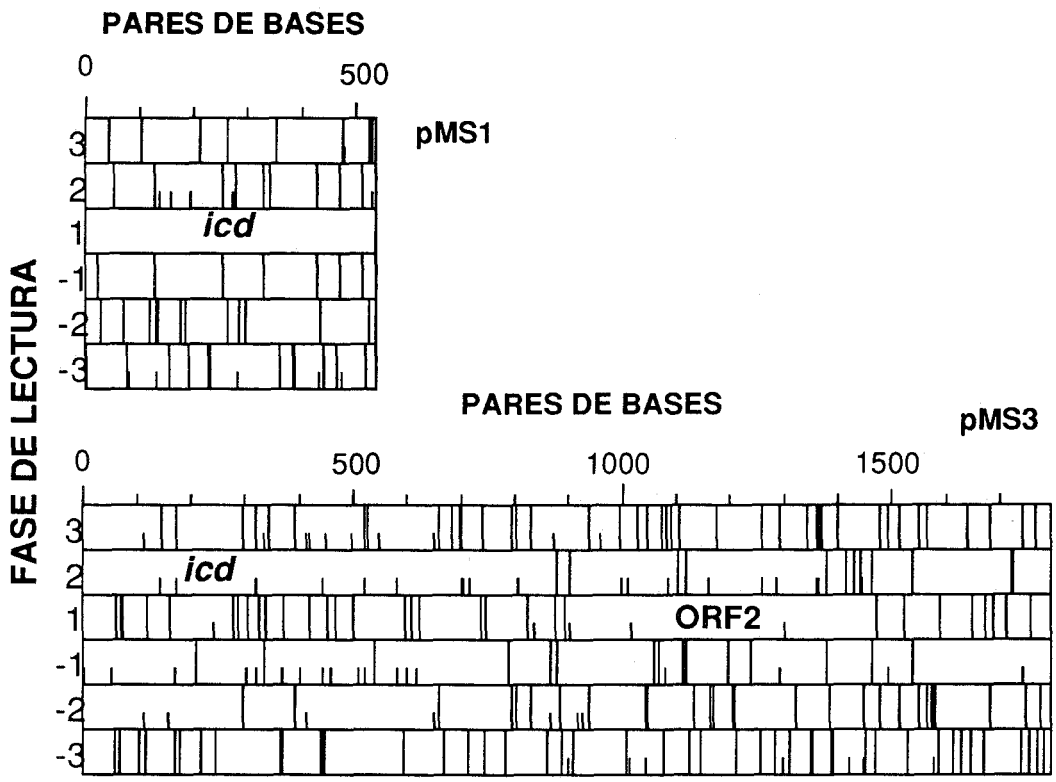


FIGURA 42. Análisis de las posibles fases de lectura abierta existentes en los fragmentos de ADN de *Synechocystis* 6803 secuenciados.

Las lineas verticales cortas indican codones que codifican para el aminoácido metionina; las lineas verticales largas indican codones de terminación de la traducción . El estudio se realizó utilizando el programa DNA-Strider (apartado 2.7).

Mediante comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias contenidas en los bancos de datos y con la secuencia del gen *icd* de *Anabaena* determinada en

este trabajo (figura 38 p. 95) se asumió que la ORF de pMS1 y la ORF1 de pMS3 constituían en realidad una única ORF en el genomio de *Synechocystis* correspondiente al gen *icd*. Por otra parte la ORF2 no mostró parecido significativo con ninguna de las secuencias contenidas en los bancos de datos.

Se realizaron a continuación varios intentos de clonación, siguiendo la estrategia de subgenoteca, de fragmentos de ADN de *Synechocystis* que presentaran el gen *icd* completo utilizando en esta ocasión como sonda los insertos de pMS1 y pMS3. Si bien en todos los casos se identificaron bandas de hibridación no fue posible en ninguno de ellos concluir el proceso descrito en la figura 40 con la clonación en *E. coli* de dichos fragmentos. Se interpretó en consecuencia que existía algún impedimento para clonar el gen *icd* de *Synechocystis* en *E. coli*, al menos utilizando un plásmido de alto número de copias como es el caso de pBS. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que los intentos de clonación del gen *icd* de *Synechocystis* mediante la estrategia de complementación, utilizando las estirpes mutantes *icd* de *E. coli* y genotecas de ADN de *Synechocystis* construídas en el vector pBS, fueron infructuosos en todos los casos.

La alta homología encontrada entre el gen *icd* de *Anabaena* y las secuencias parciales del gen *icd* de *Synechocystis* (>80%), a lo largo de toda la secuencia y concretamente en la zona que contiene a la diana *Xmn* I, nos permitió concluir que la asumción mencionada respecto a la contigüidad de las ORFs de pMS1 y pMS3 era muy probablemente correcta, si bien no pudimos descartar la presencia de dos dianas *Xmn* I muy próximas en el genomio de *Synechocystis* lo cual nos hubiera inducido a error en la determinación de la secuencia del gen *icd*.

Dado que se disponía de la secuencia de veinte aminoácidos del extremo amino terminal de la NADP-IDH de *Synechocystis*, llevada a cabo en este trabajo a partir de la proteína purificada (apartado 3.3.5.), se comparó esta con la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia nucleotídica de pMS1 y se comprobó la identidad de 16 de los residuos comparados así como la ausencia en pMS1 de secuencias codificantes de los cuatro primeros residuos de la proteína. Esto indica que el gen *icd* de *Synechocystis* se extiende solo 4 codones por delante del inserto de pMS1. Utilizando esta información se determinó la secuencia aminoacídica completa de la NADP-IDH de *Synechocystis* que se muestra en la figura 43. La secuencia de nucleótidos del gen *icd* así como del resto del fragmento de ADN de *Synechocystis* presente en pMS3 se muestra igualmente en la figura 43.

El gen *icd* de *Synechocystis* no presentó ninguna peculiaridad en cuanto al patrón de uso de codones, el cual es muy similar a la media calculada para los genes con secuencia conocida de este organismo.

```
                    5                                                  20
Met Tyr Glu Lys Leu Gln Pro Pro Ser Val Gly Ser Lys Ile Thr Phe Val Ala Gly Lys Pro Val Val Pro Asn
                CTT CAG CCC CCC AGC GTT GGG TCA AAA ATC ACC TTT GTT GCA GGT AAG CCC GTA GTA CCC AAC 63
                   30                                                  45
Asp Pro Ile Ile Pro Tyr Ile Arg Gly Asp Gly Thr Gly Val Asp Ile Trp Pro Ala Thr Glu Leu Val Ile Asn
GAT CCG ATT ATT CCC TAC ATC CGG GGG GAC GGC ACC GGG GTT GAT ATT TGG CCC GCT ACG GAA TTA GTC ATC AAT 138
                   55                                                  70
Ala Ala Ile Ala Lys Ala Tyr Gly Gly Arg Glu Glu Ile Asn Trp Phe Lys Val Tyr Ala Gly Asp Glu Ala Cys
GCA GCG ATC GCC AAG GCC TAT GGC GGC CGA GAG GAA ATC AAC TGG TTC AAA GTC TAT GCC GGG GAC GAA GCC TGT 213
                   80                                                  95
Glu Leu Tyr Gly Thr Tyr Gln Ile Phe Pro Glu Asp Thr Leu Thr Ala Ile Lys Glu Tyr Gly Val Ala Ile Lys
GAA TTG TAC GGC ACT TAT CAG ATA TTT CCG GAA GAC ACT TTA ACA GCG ATT AAG GAG TAT GGG GTA GCC ATC AAA 288
                  105                                                 120
Gly Pro Leu Thr Thr Pro Val Gly Gly Gly Ile Arg Ser Leu Asn Val Ala Leu Arg Gln Ile Phe Asp Leu Tyr
GGG CCT CTC ACA ACC CCG GTG GGC GGT GGT ATC CGT TCC CTA AAC GTG GCC CTG AGG CAA ATT TTT GAC CTC TAC 363
                  130                                                 145
Thr Cys Val Arg Pro Cys Arg Tyr Tyr Pro Gly Thr Pro Ser Pro His Lys Thr Pro Glu Lys Leu Asp Ile Ile
ACC TGT GTG CGG CCC TGT CGT TAC TAT CCC GGT ACT CCG TCT CCC CAC AAA ACC CCC GAA AAA TTA GAC ATT ATC 438
                  155                                                 170
Val Tyr Arg Glu Asn Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Gly Ile Glu Trp Ala Glu Gly Thr Glu Gly Ala Lys Lys Leu
GTT TAT CGG GAA AAT ACG GAA GAT ATT TAC CTA GGC ATT GAA TGG GCG GAA GGT ACG GAA GGG GCG AAA AAG TTA 513
                  180                                                 195
Ile Ala Tyr Leu Asn Asp Glu Leu Ile Pro Thr Thr Pro Ala Leu Gly Lys Lys Gln Ile Arg Leu Asp Ser Gly
ATC GCT TAC CTT AAC GAT GAA CTC ATT CCC ACA ACT CCA GCT TTG GGC AAA AAA CAA ATT CGC CTC GAC TCT GGC 588
                  205          XmnI                                   220
Ile Gly Ile Lys Pro Ile Ser Lys Thr Gly Ser Gln Arg Leu Val Arg Arg Ala Ile Leu His Ala Lys Arg Leu
ATT GGT ATT AAA CCG ATT AGT AAG ACT GGT TCC CAA CGG TTG GTG CGG CGG GCT ATT CTC CAT GCT AAG CGC TTG 663
                  230                                                 245
Pro Lys Ala Lys Gln Met Val Thr Leu Val His Lys Gly Asn Ile Met Lys Phe Thr Glu Gly Pro Phe Arg Asp
CCG AAA GCA AAA CAG ATG GTG ACG TTG GTC CAT AAG GGC AAC ATT ATG AAG TTC ACC GAA GGG CCG TTT CGG GAT 738
                  255                                                 270
Trp Gly Tyr Glu Leu Ala Thr Thr Glu Phe Arg Ala Glu Cys Val Thr Glu Arg Glu Ser Trp Ile Cys Gly Asn
TGG GGT TAC GAG TTG GCT ACG ACG GAA TTT CGG GCG GAA TGC GTT ACG GAA CGG GAA TCT TGG ATT TGC GGC AAT 813
                  280                                                 295
Lys Glu Ser Asn Pro Asp Leu Thr Ile Glu Ala Asn Ala His Met Ile Asp Pro Gly Tyr Asp Thr Leu Thr Glu
AAG GAA AGT AAT CCG GAC TTA ACC ATT GAG GCC AAC GCC CAC ATG ATT GAC CCC GGT TAT GAC ACT TTG ACC GAA 888
                  305                                                 320
Glu Lys Gln Ala Val Ile Lys Gln Glu Val Glu Gln Val Leu Asn Ser Ile Trp Glu Ser His Gly Asn Gly Gln
GAA AAA CAA GCG GTC ATT AAA CAA GAA GTG GAG CAG GTT TTA AAT TCC ATT TGG GAA TCC CAT GGT AAT GGC CAG 963
                  330                                                 345
Trp Lys Glu Lys Val Met Val Asn Asp Arg Ile Ala Asp Ser Ile Phe Gln Gln Ile Gln Thr Arg Pro Asp Glu
TGG AAA GAA AAA GTC ATG GTC AAT GAC CGC ATT GCC GAT AGT ATT TTC CAA CAG ATC CAA ACC CGC CCC GAT GAG 1038
                  355                                                 370
Tyr Ser Ile Leu Ala Thr Met Asn Leu Asn Gly Asp Tyr Leu Ser Asp Ala Ala Ala Ala Val Val Gly Gly Leu
TAT TCC ATT CTG GCG ACC ATG AAT TTG AAC GGG GAT TAC CTT TCC GAT GCC GCC GCC GCT GTG GTG GGA GGT TTG 1113
                  380                                                 395
Gly Met Gly Pro Gly Ala Asn Ile Gly Asp Ser Ala Ala Ile Phe Glu Ala Thr His Gly Thr Ala Pro Lys His
GGC ATG GGC CCC GGA GCT AAC ATT GGG GAT AGT GCA GCC ATT TTT GAA GCC ACC CAC GGC ACT GCC CCC AAA CAT 1188
                  405                                                 420
Ala Gly Leu Asp Arg Ile Asn Pro Gly Ser Val Ile Leu Ser Gly Val Met Met Leu Glu Phe Met Gly Trp Gln
GCT GGT TTA GAC CGG ATC AAC CCC GGC TCT GTG ATC CTT TCC GGC GTA ATG ATG CTG GAA TTT ATG GGC TGG CAG 1263
                  430                                                 445
Glu Ala Ala Asp Leu Ile Lys Lys Gly Ile Gly Ala Ala Ile Ala Asn Arg Glu Val Thr Tyr Asp Leu Ala Arg
GAG GCC GCT GAT CTG ATT AAA AAA GGT ATC GGA GCG GCG ATC GCC AAT CGG GAA GTT ACC TAC GAT TTA GCC CGG 1338
                  455                                                 470
Leu Met Glu Pro Lys Val Asp Lys Pro Leu Lys Cys Ser Glu Phe Ala Gln Ala Ile Val Ser His Phe Asp Asp
TTA ATG GAA CCG AAG GTG GAT AAA CCC CTA AAA TGC TCC GAG TTT GCC CAG GCG ATC GTC AGT CAT TTC GAT GAT 1413
OCH
TAATTTTCAATCAATAACCCACCATGATTGCTCACTCCCCATCTGCCCCATTTCCCAAACTTAGCCCAGAGGAATATTTGCAATGGGAAGAACGGCAGAG 1513
GGAGAAGCACGAATATTTTGATGGGCAGATCTATGCCATGGGGGGCGGCAGTAAAAACCACAGTGTCATTAGTGTCCGCCTATCGACTTTATTTTGTAAT 1613
CATCTTGATGGCGGTGATTGCGAAATAGGTAATTCAGATTTAAAAATTCAGATTGTCAACACCCAAAACTACACCTGTCCCGATGTCAGCGTCACCTGTG 1713
ATCCAAGGGATCGGAAGTCAACACAATTTATTACCTATCCCTGCCTGGTTGTGGAGGTTTTATCCCCCAGTACCGAAGCCTATGACCGGGGTGGCAAATT 1813
TCGGCTCTATGCCCATAATCCCATGTTGCAGGACTATCTTTTGGTCAGCTCCACCAGTGTGGAAATTGATCTCTATCACAAAAATGATGACGGTGATTGG 1913
TTAATCCTCAATTATCAGGCCAGTGATCGCCTGGAACTGAAAAGCATTGGTTTGAGCTTTGCCGTAGATGTCATTTACCGCGGTTTAGCCTTTTAAAATC 2013
CTAAAGGCGATCGCCATAGATCCACCAAAGGACGTGCTAACCGATAACCGTATCAAATTTTAGTTGTTTTGGTTAGCAACAAACCGATTAACCAGTTCAA 2113
CATCAATATCTAACTCCTTGGCAATTTCGGCGATTGTCAACCCCAATTTTTTCAACAAAGGTATAGTTTCTAGTTTTGCCTCCAGCCTTCCTTCTAATTT 2213
GCCTTTAAGTAAGCCTCTTTGTTCCCCTTCCTGTAGAATTTCCTGATAAACAGCGGATTCCTTCATAATTTCACTCCTTAGAATTGTCTTGATCAGCTCA 2313
GGGGTCAGCAGAAT 2327
```

FIGURA 43. Secuencia nucleotídica de los fragmentos de ADN de *Synechocystis* que contienen el gen *icd*.

Sobre la secuencia de nucleótidos se muestra la secuencia de aminoácidos traducida correspondiente a la NADP-IDH. La secuencia de los cuatro primeros aminoácidos está tomada de los resultados de microsecuenciación de los veinte aminoácidos del extremo amino-terminal de la proteína. La diana *Xmn* I señalada separa los insertos de los plásmidos pMS1 y pMS2.

3.12. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS GENES *icd* DE *Anabaena* Y *Synechocystis*, COMPARACION CON OTROS GENES DE ISOCITRATO DESHIDROGENASAS

3.12.1. Alineamiento de las secuencias y similitud entre las diferentes IDHs

Las secuencias de aminoácidos codificadas por el gen *icd* tanto en *Anabaena* como en *Synechocystis* se compararon con aquellas contenidas en la base de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL Heidelberg). Se comprobó de este modo que las IDHs cianobacterianas eran homólogas a otras IDHs así como a una variedad de isopropilmalato deshidrogenasas (IMDH) de origen tanto procariótico como eucariótico y contenían una secuencia consenso común a ambas deshidrogenasas.

El alineamiento de las diez secuencias de IDH disponibles, incluidas las dos obtenidas en este trabajo, se presenta en la figura 44. Lo mas destacado de este alineamiento es la existencia en las secuencias de cianobacterias de una zona no alineable con el resto de las secuencias y cuyas características se analizaran mas adelante. Las NADP-IDHs de *Anabaena* y *Synechocystis* muestran la máxima identidad con la NADP-IDH de *E. coli* (59 y 58% respectivamente) y forman parte junto con la NADP-IDH de *Thermus thermophilus* y las dos subunidades de la NAD-IDH de *Saccharomyces cerevisiae* de uno de los dos grupos de secuencias que podemos distinguir en el alineamiento, atendiendo a las similitudes entre las diferentes IDHs. El segundo de estos grupos es el formado por las cuatro NADP-IDHs de origen eucariótico. Este grupo es bastante homogéneo y las cuatro secuencias presentan mas del 60% de sus residuos idénticos. Las identidades compartidas por todas las secuencias son muy reducidas y la mayoría se localizan en los residuos identificados como implicados en la unión del isocitrato o el NADP en la IDH de *E. coli*, cuyo análisis estructural es muy detallado. En concreto las NADP-IDHs de cianobacterias conservan todos los residuos directamente relacionados, en la enzima de *E. coli*, con la unión del isocitrato (Ser-113, Arg-119, Arg-129, Arg-153, Tyr-160, Lys-230, Asp-283, Asp-307 y Asp-311) y cinco de los ocho implicados en la unión del NADP (Gly-321, His-339, Ala-342, Asn-352, y Asp-392).

G. max (soja)
M. sativa (alfalfa)
S. suis (cerdo)
Sacc. NADP (levadura)
Synechocystis 6803
Anabaena 7120
E. coli
Sacc. IDH1 (levadura)
Sacc. IDH2 (levadura)
T.thermophilus
G. max
M. sativa
S. suis
Sacc. NADP
Synechocys
Anabaena
E. coli
Sacc. IDH1
Sacc. IDH2
T.thermop.
G. max
M. sativa
S. suis
Sacc. NADP
Synechocys
Anabaena
E. coli
Sacc. IDH1
Sacc. IDH2
T. thermop.
G. max
M. sativa
S. suis
Sacc. NADP
Synechocys
Anabaena
E. coli
Sacc. IDH1
Sacc. IDH2
T. thermop.

FIGURA 44. Alineamiento de secuencias de isocitrato deshidrogenasas.

Se comparan las diez secuencias de IDHs disponibles en las bases de datos, incluyendo todas las NADP-IDHs eucarióticas y procarióticas secuenciadas así como las dos subunidades IDH1 e IDH2 de la NAD-IDH de *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de la NADP-IDH de *Anabaena* 7120 se marca en azul, los residuos idénticos a los de esta secuencia se señalan en verde en la secuencia de *Synechocystis* 6803 y en rojo en el resto de las secuencias. Los residuos idénticos en todas las secuencias alineadas se señalan con un asterisco, los guiones denotan los residuos implicados en la unión del isocitrato que se encuentran conservados en todas las secuencias y los dobles guiones los implicados en dicha unión que se encuentran conservados en todos excepto en la IDH1 de levadura.

En general hay una mayor conservación entre las secuencias del sitio de unión del isocitrato que del de unión del cofactor lo cual es lógico si tenemos en cuenta las diferencias entre las IDHs en relación a la especificidad por NAD o NADP.

A partir de las comparaciones dos a dos de las distintas secuencias de IDH mostradas en el alineamiento de la figura 44 se puede generar una matriz de porcentajes de identidad. La tabla 14 contiene los valores obtenidos para las diferentes IDHs expresados en forma de tanto por ciento. Utilizando estos datos se puede igualmente elaborar un árbol como el que se muestra en la figura 45 y en el que se aprecia de una forma gráfica la existencia de los dos grupos de secuencias antes mencionados y la relación existente entre ellos.

Tabla 14. Identidades entre las secuencias de aminoácidos de las isocitrato deshidrogenasas[a].

	Aminoácidos idénticos (%)[b]									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Medicago (1)	-	90	67	63	23	23	25	23	26	20
Glycine (2)		-	69	64	22	23	23	23	24	22
Sus suis (3)			-	64	21	25	24	26	27	19
Sacchar. NADP (4)				-	23	22	22	21	25	25
Anab. 7120 (5)					-	81	59	30	36	42
Synech. 6803 (6)						-	58	31	36	40
E. coli (7)							-	30	35	39
Sacchar. IDH1 (8)								-	43	38
Sacchar. IDH2 (9)									-	46
Thermus (10)										-

[a] Las secuencias empleadas son las que se presentan en el alineamiento de la figura 44 y los cálculos se han llevado a cabo comparando las secuencias por pares.

[b] El tanto por ciento se calcula sobre la secuencia mas corta.

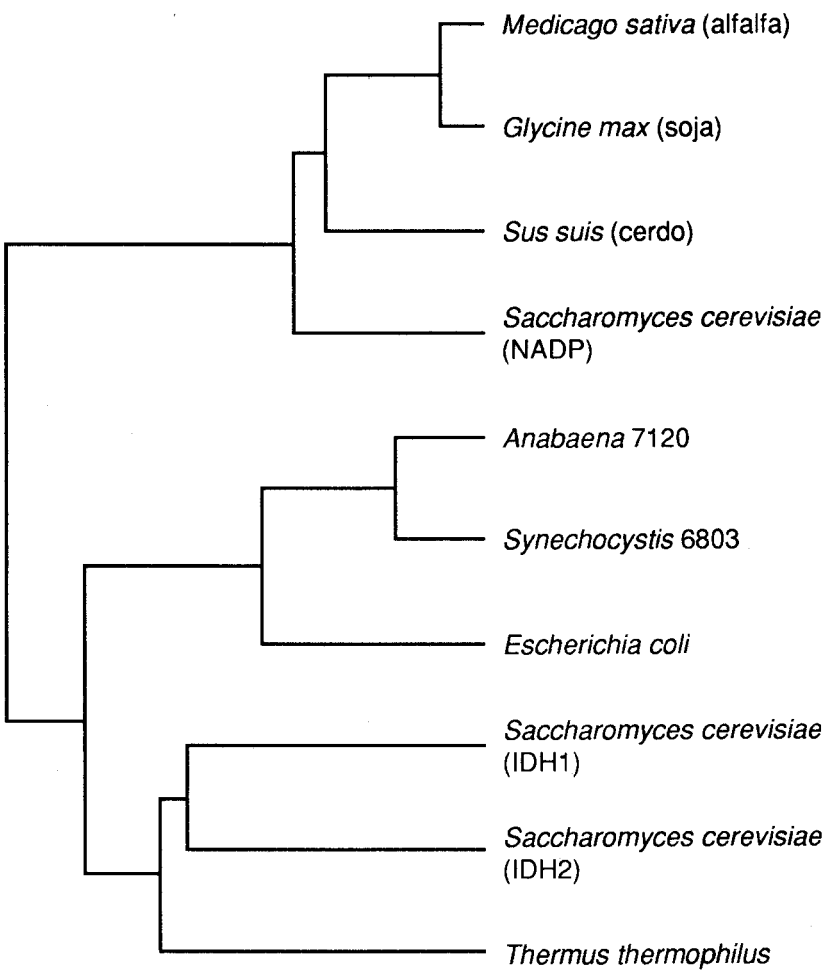


FIGURA 45. Arbol evolutivo de las isocitrato deshidrogenasas.
El árbol se elaboró utilizando los porcentajes de identidad entre cada par de secuencias, calculados sobre la secuencia mas corta de cada comparación.

3.12.2. Análisis comparativo de las NADP-IDHs de *Anabaena* y *Synechocystis* a partir de sus secuencias

De forma similar a como se desprende del ánalisis fisicoquímico y cinético llevado a cabo con las NADP-IDHs purificadas de *Anabaena* y *Synechocystis* (apartado 3.5), las características deducibles para estas proteínas a partir de su

secuencia vinieron a confirmar la elevada similitud existente entre ambas enzimas.

En este sentido, la identidad de secuencia entre ambas IDHs fue del 81%, siendo su composición de aminoácidos muy similar. La masa molecular calculada a partir de la secuencia fue de 52.194 Da con 473 residuos en el caso de *Anabaena* y 52.241 Da con 475 residuos en el caso de *Synechocystis*.

La aplicación del algoritmo de Kyte y Doolittle a las secuencias peptídicas de las dos IDHs cianobacterianas permitió obtener el perfil de hidrofobicidad de las mismas que se muestra en la figura 46.

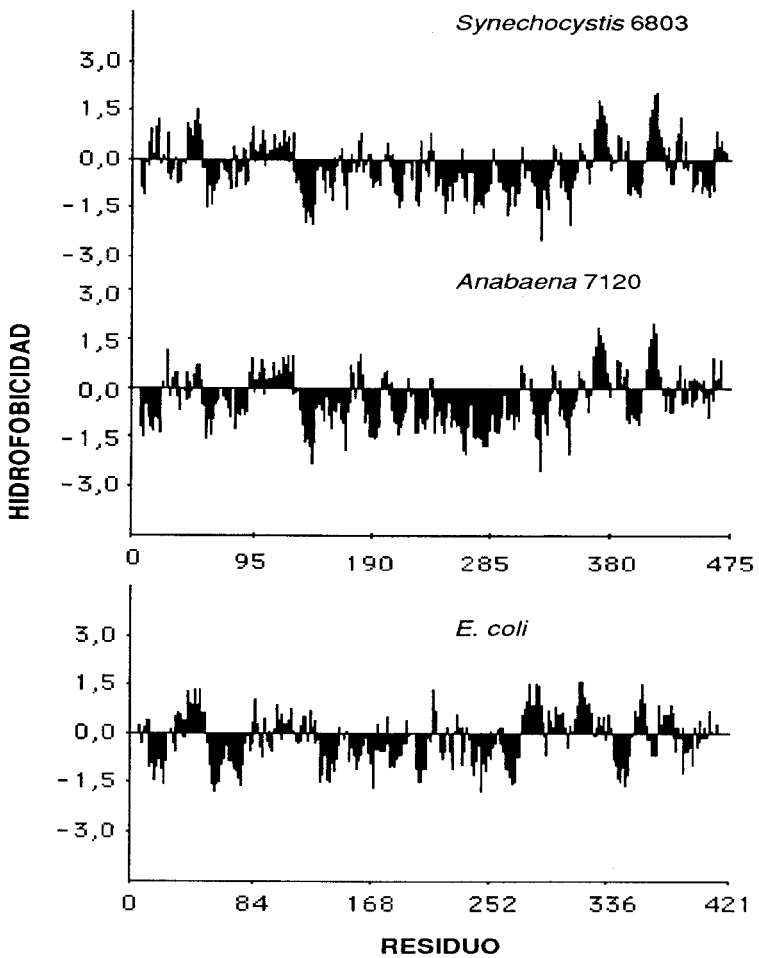


FIGURA 46. Perfiles de hidrofobicidad de las NADP-IDHs de *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 y *E. coli*.

Se empleó la aplicación correspondiente del programa informático MacMolly, que utiliza para este cálculo el algoritmo descrito por Kyte y Doolittle en 1982 (apartado 2.7). Se puede apreciar el carácter hidrofílico de la región específica de las IDHs cianobacterianas (residuos 286-329).

Como se puede apreciar ambas proteínas presentan tres zonas bien diferenciadas, una primera región en la que alternan dominios hidrofílicos e hidrofóbicos, una amplia región con un claro dominio de los residuos hidrofílicos y una última región en la que reaparece la alternancia de dominios hidrofílicos e hidrofóbicos como es típico de las proteínas globulares. Este patrón es similar al que presenta la IDH de *E. coli* si bien en este caso la región hidrofílica central es menos extensa.

El aspecto mas sobresaliente de las dos IDHs cianobacterianas estudiadas, en relación a su secuencia, es la existencia en ambas proteínas de un dominio característico que no está presente en el resto de las IDHs secuenciadas. Esta región tiene un caracter hidrofílico si atendemos a su composición de aminoácidos (figura 46) y se extiende entre los residuos 286 y 329 de ambas proteínas. Las predicciones de estructura secundaria mediante la aplicación informática del algoritmo descrito por Garnier *et al.* en 1978 asignan a estas secuencias una estructura en α-hélice.

Si comparamos la posible estructura secundaria de las IDHs de cianobacterias con la estructura deducida para la IDH de *E. coli* mediante un estudio detallado por cristalografía de rayos X (Hurley *et al.* 1989), podemos localizar la región específica de las IDHs de *Anabaena* y *Synechocystis* en un dominio de alternancia α/β y concretamente ampliando una de las α-hélices definidas en *E. coli*.

3.13. INFLUENCIA DE LA AUSENCIA DE FUENTE NITROGENADA SOBRE LA CANTIDAD DE ARN_m DEL GEN *icd* PRESENTE EN *Synechocystis*

Dado que se había observado un aumento de la actividad NADP-IDH en las células de *Synechocystis* cuando estas se cultivaban en ausencia de fuente de nitrógeno, y considerando que este aumento de actividad estaba acompañado de un aumento de la cantidad de enzima presente en las células (apartado 3.8.3), se procedió a analizar si se producía una modulación de la cantidad de transcrito del gen *icd* en respuesta a la eliminación de la fuente de nitrógeno de los cultivos.

La figura 47 muestra el análisis mediante Northern blot de la cantidad de dicho transcrito en células cultivadas con nitrato y sometidas a hambre de nitrógeno durante un período de 20 h. Se observa un único transcrito de aproximadamente 1,6 kb al hibridar el ARN total de *Synechocystis*, aislado a

diferentes tiempos tras eliminar la fuente de nitrógeno, con una sonda *Xmn* I de 536 pb procedente de pMS1 e interna al gen *icd*. El transcrito experimenta un aumento a lo largo del tiempo y presenta su máximo nivel en las células sometidas a 5 h de cultivo en ausencia de fuente de nitrógeno. El nivel de actividad IDH es máximo tras 10 h de hambre de nitrógeno (apartado 3.8.3), esta discrepancia respecto a los niveles máximos de mensajero y enzima puede deberse a acumulación de esta última en las células sometidas a hambre de nitrógeno.

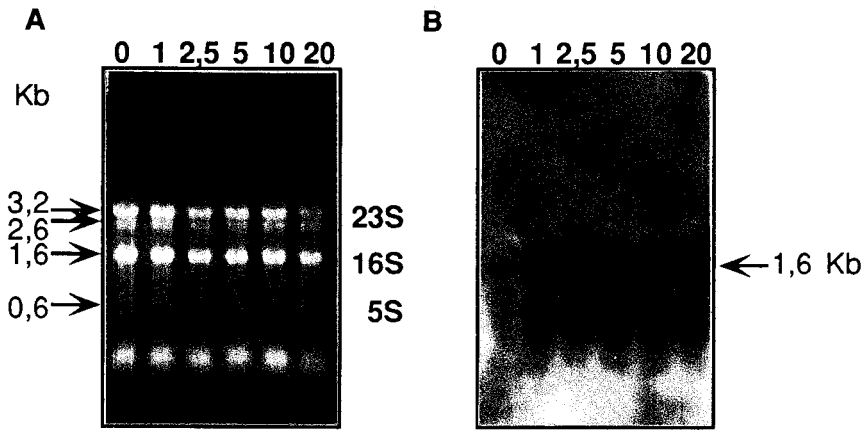


FIGURA 47. Hibridación de ARN total de *Synechocystis* 6803 con una sonda de ADN interna al gen *icd* de este mismo organismo.

Se extrajo ARN total a partir de células de *Synechocystis* cultivadas en medio BG11 y sometidas a continuación a 0, 1, 2,5, 5, 10 y 20 horas de hambre de nitrógeno como se describe en el apartado 2.4.2.3. El ARN (15 µg por carril) se sometio a electroforesis en agarosa (A) y se transfirió a filtro de Nylon, hibridándose éste a continuación a 42 °C con una sonda XmnI de 0,5 kb, aislada a partir de pMS1 (figura 41). El tamaño del transcrito se estimó por comparación con los ARNs ribosómicos 23S, 16S y 5S. La banda de 2,6 kb resulta de la degradación específica del ARNr 23S. (Mohamed y Jansson 1989) (apartados 2.4.2.5, 2.4.2.8 y 2.4.2.10).

3.14. GENERACION DE MUTANTES *icd* DE *Anabaena* sp. PCC 7120 Y CARACTERIZACION DE LOS MISMOS

Con objeto de estudiar el papel metabólico de la NADP-IDH en *Anabaena* se procedió a la obtención de mutantes como herramienta habitual que nos permitiera responder a las cuestiones referentes a la funcionalidad del gen *icd*. Para ello se utilizó la estrategia de mutagénesis por inserción de un gen de resistencia a antibiótico en el gen deseado.

3.14.1. Construcción de plásmidos con una versión inactivada del gen *icd* y transferencia de los mismos a *Anabaena* mediante conjugación

Como se ha descrito en la introducción, la transferencia de ADN a estirpes filamentosas de cianobacterias se lleva a cabo habitualmente mediante un sistema de conjugación interespecífica desde *E. coli* a la cianobacteria (Wolk *et al.*, 1984). Es necesario para esta transferencia el uso de un vector movilizable mediante conjugación, que porte la versión inactivada del gen y es asimismo muy conveniente que este plásmido portador del gen mutado contenga a ambos lados del mismo entre 0,75 y 1 kb de ADN de la cianobacteria receptora para que se lleve a cabo la sustitución del gen silvestre, presente en el cromosoma de esta, mediante doble recombinación.

En la figura 48 se esquematiza el proceso de construcción de un plásmido movilizable con una versión inactivada del gen *icd*. Mediante la inserción del gen de resistencia a neomicina (*npt*) del plásmido pRL161 en pMA2 (figura 31 p. 88) se obtuvieron los plásmidos pMA2a y pMA2b que contenían el gen de resistencia clonado en ambas orientaciones respecto a *icd* y se procedió a la clonación del gen mutado en el vector movilizable pRL277 obteniéndose pRL277NmA y pRL277NmB.

El plásmido pRL277 es portador de genes de resistencia a estreptomicina y espectinomicina, además del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* y la región *bom* («basis of mobilization») del plásmido pBR322. Esta región hace que los plásmidos derivados de pRL277 puedan ser introducidos en *Anabaena* mediante conjugación desde *E. coli* y la presencia del gen *sacB* permite la selección de aquellas células de *Anabaena* en las que hubiese tenido lugar un evento doble de recombinación entre el cromosoma portador del gen silvestre y el plásmido portador del gen mutado. Esta selección se basa en la letalidad condicional del gen *sacB* que codifica la enzima levansacarasa, una proteína cuya producción es inducida por la sacarosa (Gay *et al.*, 1985). La expresión del gen *sacB* es letal para algunas bacterias gram-negativas cuando estas se cultivan en presencia de sacarosa al 5% en medio sólido (Gay *et al.*, 1983; Gay *et al.*, 1985; Ried y Collmer, 1987). Se ha descrito que esta letalidad condicional afecta también a las células de *Anabaena* (Cai y Wolk, 1990) por lo que se empleó este método de selección para la mutagénesis del gen *icd* como se muestra en la figura 49. Los plásmidos pRL277NmA y pRL277NmB no pueden establecerse autónomamente en *Anabaena* de modo que al seleccionar células resistentes a neomicina solo se obtendrían aquellas en las que se hubiera producido un fenómeno de recombinación homóloga que resultara en la integración del plásmido completo en el cromosoma de *Anabaena*, o bien aquellas en las que, por un fenómeno de doble recombinación homóloga, se hubiera sustituido un fragmento del cromosoma por el fragmento homólogo contenido en pRL277NmA o pRL277NmB.

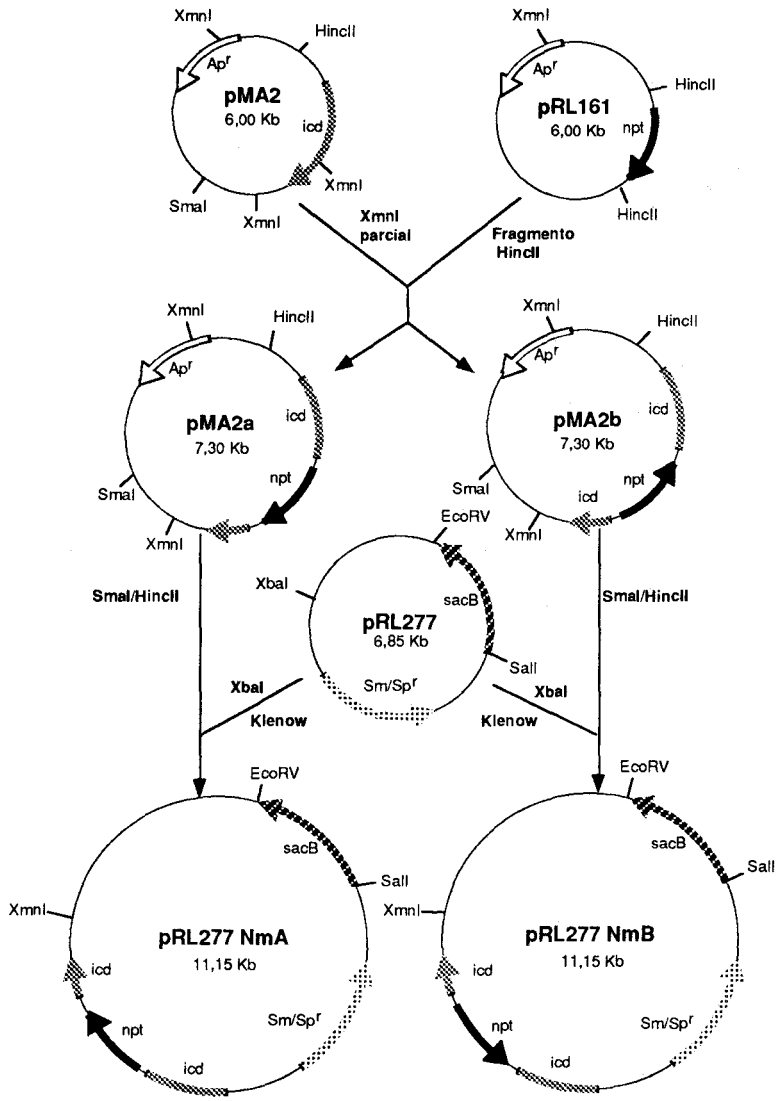


FIGURA 48. Esquema del proceso de construcción de los plásmidos empleados en la generación de mutantes *icd* de *Anabaena* 7120.

Las flechas indican los procesos de ligación llevados a cabo. Las digestiones y los tratamientos con el fragmento de Klenow de la polimerasa para generar extremos romos se indican en cada caso (apartados 2.4.3.1 y 2.4.3.3). La digestión parcial *Xmn* I del plásmido pMA2 se realizó con diluciones sucesivas de la enzima como se describe en el apartado 2.4.3.1.. El gen *npt* (Nm^R) del transposón Tn5 se utilizó para la inactivación por inserción del gen *icd*. El vector movilizable pRL277 fue el empleado para la clonación de las versiones inactivadas de *icd*. *sacB*, gen de la levansacarasa de *Bacillus subtilis*; Sm, estreptomicina; Sp, espectinomicina.

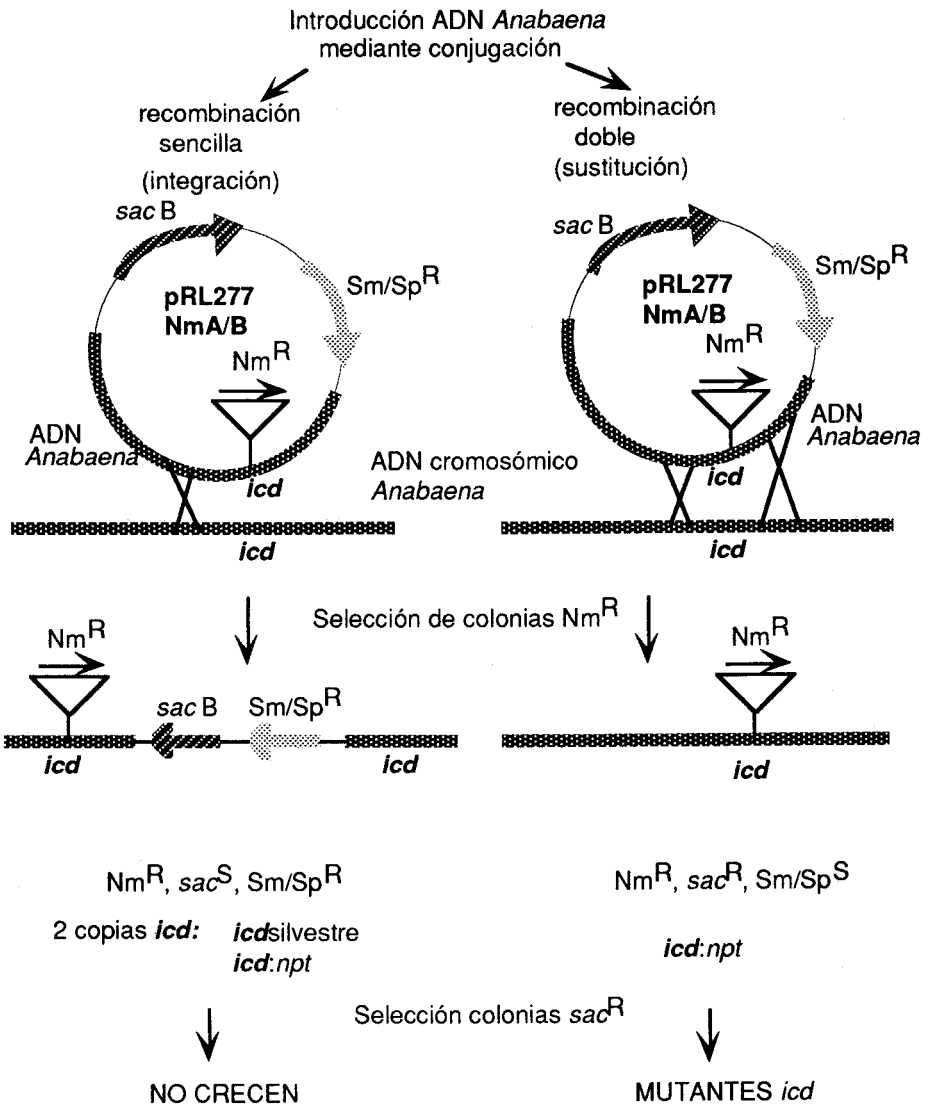


FIGURA 49. Esquema del proceso de mutagénesis empleado en *Anabaena* 7120 utilizando la letalidad condicional del gen *sacB* de *B. subtilis* para esta cianobacteria.

En la figura se muestran los diferentes eventos de recombinación homóloga que permitirían la obtención de células resistentes a neomicina tras la introducción en *Anabaena* mediante conjugación de los plásmidos pRL277NmA o pRL277NmB. Se seleccionaron colonias Nm^R, sac^R, Sm/Sp^S. Los detalles experimentales se recogen en los apartados 2.5.3 y 3.14.1. Sm, estreptomicina; Sp, espectinomicina; sac, sacarosa; Nm, neomicina.

Teniendo en cuenta esto, tras realizar la conjugación se llevó a cabo la selección de colonias de *Anabaena* resistentes a neomicina y se obtuvieron 5 colonias Nm^R procedentes de la conjugación de pRL277NmA. La segunda fase encaminada a la obtención de mutantes *icd* (doble recombinantes) consistió en la siembra en medio conteniendo neomicina y sacarosa al 5% de células de las colonias anteriormente seleccionadas como resistentes a neomicina. Mediante este procedimiento se seleccionarían aquellas células que hubieran perdido el gen *sacB* por eliminación de las secuencias plasmídicas procedentes de pRL277 al haber sufrido una doble recombinación (dobles recombinantes) o bien aquellas en las que se hubiera inactivado este gen letal de forma espontánea, por el salto de secuencias de inserción (Cai y Wolk, 1990) o por algún otro procedimiento de mutación puntual (pseudo-dobles recombinantes). Estos supuestos pueden ser comprobados ya que el fenotipo esperado sería Nm^R, sac^R, Sm/Sp^S en el caso de los auténticos doble recombinantes y Nm^R, sac^R, Sm/Sp^R en el caso de los pseudo-dobles recombinantes. Gracias a esta comprobación fenotípica se identificó que la mayoría de los exconjugantes seleccionados como Nm^R, sac^R eran también Sm/Sp^R y solo una de las colonias analizadas presentó el fenotipo (Nm^R, sac^R, Sm/Sp^S) esperado para los dobles recombinantes, a esta estirpe se le denominó MA1. Por otra parte la presencia del gen *sacB* inactivado en los pseudo-dobles recombinantes obtenidos pudo comprobarse mediante hibridación de ADN total procedente de estas estirpes con una sonda *Eco*R V-*Sal* I (figura 48) de este gen, aislada a partir de pRL277 (datos no mostrados).

3.14.2. Análisis de la estructura cromosómica de la estirpe MA1

Se procedió a comprobar si en la estirpe MA1 se había producido la sustitución del gen *icd* silvestre por la copia mutada introducida mediante conjugación y si la población de cromosomas era homogénea, ya que la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta varias copias del genomio por célula (Cai y Wolk, 1990). Para ello se aisló ADN total de la estirpe MA1 y de la estirpe silvestre y se analizó mediante Southern blot usando como sonda un fragmento de 1,4 kb *Acc* I-*Sca* I que contenía el gen *icd* (figura 50A). Como muestra la figura 50B la sustitución anteriormente mencionada solo se observaba en parte de los cromosomas de la estirpe MA1 ya que en cada digestión del ADN procedente de esta estirpe aparecían dos bandas de hibridación con la sonda, una de ellas igual a la observada con el ADN procedente del silvestre y otra cuyo incremento de tamaño respecto a la anterior se corresponde con lo esperado para la inserción del gen *npt* procedente de la «cassette» C.K1 (1,3 kb) en el gen *icd*. Se comprobó de este modo que la segregación de la versión inactivada del gen *icd* era solo parcial en la estirpe MA1 y que no se había conseguido hasta el momento un mutante *icd* absoluto de la estirpe *Anabaena* sp. PCC 7120.

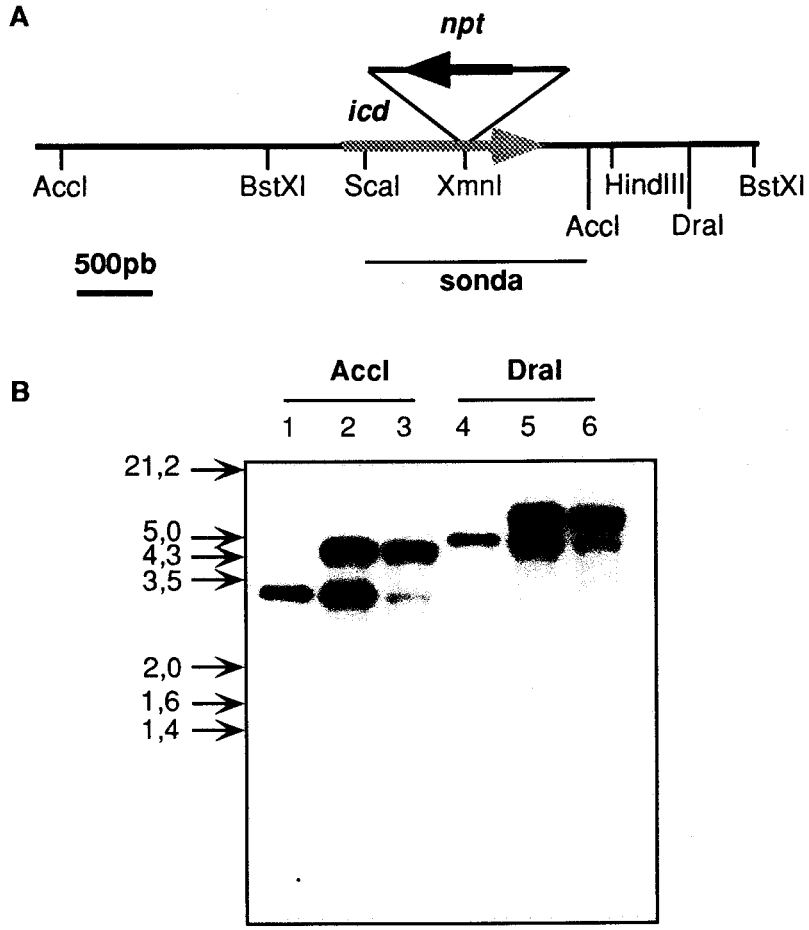


FIGURA 50. Estructura cromosómica de la estirpe MA1 de *Anabaena* sp. PCC 7120.

(A) Se muestra la región de ADN de *Anabaena* 7120 en la que se localiza el gen *icd*, la versión del gen *npt* usada para inactivar el gen *icd* en la estirpe MA1 y la sonda de 1,4 kb empleada en la hibridación que se muestra a continuación.

(B) Hibridación de ADN total de *Anabaena* 7120 silvestre (calles 1 y 4), la estirpe MA1 cultivada durante varias generaciones con 3 mM de L-prolina (calles 2 y 5) o 5 mM de 2-oxoglutarato (calles 3 y 6) en medio con nitrato. El ADN se digirió en cada caso con las enzimas que se indican. La hibridación se realizó a 65 °C. Los detalles experimentales se recogen en los apartados 2.4.2.7 y 2.4.2.9. A la izquierda se indican en kb los patrones de tamaño empleados.

3.14.3. Estudio del proceso de segregación y el crecimiento de la estirpe MA1 en diferentes medios de cultivo

Se describe en este apartado el seguimiento del proceso de segregación de la estirpe MA1 mediante tres aproximaciones complementarias llevadas a cabo tras varias generaciones en diferentes medios de cultivo: determinación de la actividad NADP-IDH de la estirpe, análisis mediante Southern blot de la proporción de copias silvestres y mutantes del gen *icd* que presentaba la estirpe MA1 a lo largo del tiempo y cuantificación de la NADP-IDH en células de MA1 procedentes de los diferentes medios de cultivo mediante Western blot.

Aunque en otros organismos en los que se habían obtenido mutantes *icd* estos resultaron ser auxótrofos de glutamato, la estirpe MA1 fue obtenida en medio BG11 sin adición de ningún requerimiento. Dado que el fenotipo esperado para un mutante *icd* de *Anabaena* era la auxotrofía de glutamato, se procedió a cultivar la estirpe MA1 en presencia de 0,5 mM de glutamato ya que concentraciones mas elevadas de este aminoácido son tóxicas para *Anabaena* (Chapman y Meeks, 1983). Considerando que la K_m descrita para el transporte de L-glutamato en *Anabaena* sp. PCC 7120 es de 0,5 mM (Flores y Muro-Pastor, 1988) se decidió añadir prolina 3 mM que es rápidamente metabolizada hasta glutamato (Flores comunicación personal) para garantizar la complementación de la posible auxotrofía.

Por otra parte *Anabaena* sp. PCC 7120 presenta distintos niveles de NADP-IDH cuando se cultiva en diferentes fuentes de nitrógeno (apartado 3.9). Teniendo en cuenta este aspecto, se analizó el crecimiento y el proceso de segregación de la estirpe MA1 en cultivos con nitrato, amonio o en condiciones de fijación suplementados o no en cada caso con 3 mM de prolina.

Se comprobó de este modo que la estirpe MA1 no crecía en medios carentes de fuente de nitrógeno combinado independientemente de la presencia de prolina. El crecimiento era similar en medio con nitrato y prolina o nitrato sin prolina. En medios con amonio la presencia de prolina tenía un efecto negativo sobre el crecimiento, aunque este era menor que en medios con nitrato tanto si se añadía prolina como si no se añadía. En la tabla 15 se muestran las actividades NADP-IDH de la estirpe MA1 en los distintos medios y en la figura 51 se observa la cantidad de NADP-IDH presente en extractos crudos de la estirpe MA1 procedentes de células cultivadas en las distintas condiciones detectada mediante Western blot. Se aprecia una clara correspondencia entre los niveles de actividad y la cantidad de NADP-IDH presente. Esta correlación existe también respecto a los niveles de segregación observados en Southern blot (datos no mostrados). De esta forma se identificó el medio con amonio y prolina como aquel en el que la estirpe mutante MA1 presentaba un crecimiento mas pobre, unos niveles de actividad NADP-IDH mas bajos y una segregación de la copia mutada del gen *icd* mas alta. Sin embargo no se alcanzó en ningun caso la segregación total del gen mutado.

Tabla 15. Actividad NADP-IDH de la estirpe MA1 en diferentes medios de cultivo.[a]

Medio	Actividad NADP-IDH (mU/mg prot.)[b]
Nitrato	34,4
Nitrato + prolina	31,5
Amonio	6,0
Amonio + prolina	0,9

[a] Se empleó medio BG11 con la fuente de nitrógeno indicada y suplementado con 3 mM de L-prolina cuando se indica.
[b] La actividad NADP-IDH se midió en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos.

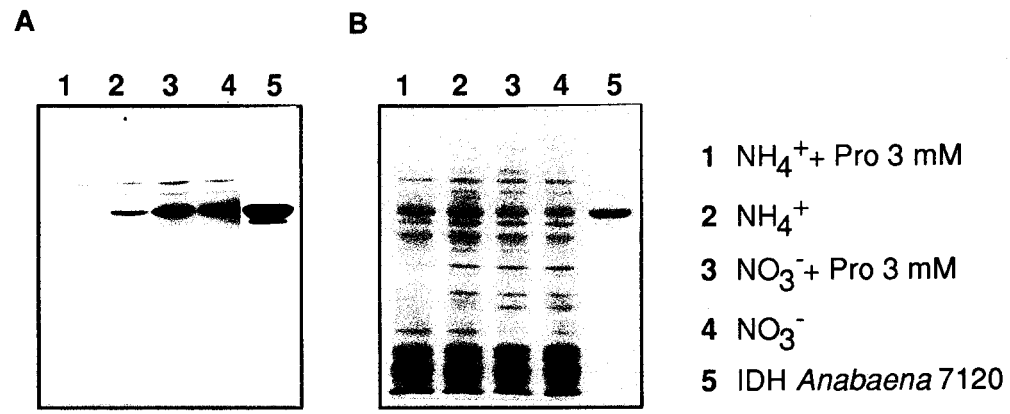


FIGURA 51. Cuantificación mediante Western blot de la NADP-IDH presente en la estirpe MA1 cultivada en diferentes condiciones nutricionales.

(A) Se realizó electroforesis en presencia de SDS de extractos crudos de la estirpe MA1 cultivada **en medio BG11,** en las condiciones que se indican, así como de 5 µg de IDH purificada de *Anabaena* 7120. Las muestras se transfirieron a papel de nitrocelulosa y se revelaron con antisuero anti-IDH como se describe en el apartado 2.3.4.3. El carril correspondiente a la IDH purificada se sometio a menor exposición lu minosa al fotografiar filtro de nitrocelulosa.

(B), Tinción con azul de Coomassie de muestras idénticas a las empleadas en el Western blot.

Se ensayó a continuación si la adición de 2-oxoglutarato (producto de la reacción de la NADP-IDH) a los cultivos de MA1 favorecía de algún modo el proceso de segregación. Para ello se cultivó la estirpe mutante en presencia de 5 mM de 2-oxoglutarato durante varias generaciones y se procedió a determinar los niveles de actividad NADP-IDH y a observar el crecimiento en los diferentes medios con y sin 2-oxoglutarato añadido.

Dado que la segregación alcanzada no era total fue necesario en todo momento mantener la presión selectiva del antibiótico en los cultivos. Por ello, se utilizó como control para el crecimiento y la actividad NADP-IDH silvestres la estirpe AMP2 de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Muro-Pastor *et al.*, 1992). Esta estirpe es resistente a neomicina, silvestre respecto al gen *icd* y presenta tasas de crecimiento idénticas a la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC 7120.

En la tabla 16 se muestran los niveles de actividad NADP-IDH obtenidos para las estirpes MA1 y AMP2. Se aprecia como en los cultivos con nitrato las actividades se han reducido sensiblemente en la estirpe MA1 respecto a los cultivos anteriores con y sin prolina. La presencia de 2-oxoglutarato no afectó en ningún caso los niveles de actividad de la estirpe AMP2. En cuanto al crecimiento es de destacar que la estirpe MA1 es capaz de crecer sin fuente de nitrógeno combinado en el medio cuando este se suplementa con 2-oxoglutarato.

Tabla 16. Actividad NADP-IDH de las estirpes AMP2 y MA1 en diferentes medios de cultivo.

Medio	AMP2	MA1	
	Actividad NADP-IDH (mU/mg prot)[a]		
Nitrato	60	5,9	(9,8)[b]
Nitrato + 2-oxoglutarato	68	7,1	(10,4)
Amonio	52	7,7	(14,8)
Amonio + 2-oxoglutarato	59	8,4	(14,2)
N_2	85	n.d[c]	
N_2 + 2-oxoglutarato	73	9,7	(13,3)

[a] La actividad NADP-IDH se midió en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos.

[b] Entre paréntesis se indica el valor (%) de la actividad IDH de la estirpe MA1 respecto a la AMP2 en las mismas condiciones.

[c] n. d. significa no determinado.

Mediante Southern blot se determinó el nivel de segregación de la estirpe MA1 tras ser cultivada durante varias generaciones en medio con nitrato y 2-oxoglutarato en comparación con la que se obtuvo en este mismo medio sin adición del cetoácido (figura. 50). Se dedujo por tanto que el 2-oxoglutarato favorecía la segregación de la estirpe mutante, especialmente en medios con nitrato donde nunca se había alcanzado una segregación superior al 50% y por otra parte permitía el crecimiento, aunque muy limitado, en condiciones de fijación donde parecen ser requeridos niveles mas altos de actividad NADP-IDH.

Se llevó a cabo finalmente un estudio del crecimiento de la estirpe MA1 en los diferentes medios de cultivo en comparación con el crecimiento silvestre de la estirpe AMP2. Se realizaron curvas de crecimiento de ambas estirpes tanto en presencia como en ausencia de 2-oxoglutarato partiendo siempre de preinóculos en nitrato y 2-oxoglutarato. Como se deduce de los resultados mostrados en la figura 52, la estirpe MA1 no se comportó como un auxótrofo de 2-oxoglutarato en medios conteniendo nitrato o amonio ya que en estos casos era capaz de crecer incluso cuando el 2-oxoglutarato se eliminaba del medio, si bien el crecimiento alcanzado era superior en presencia del cetoácido, siendo esta diferencia mas notable en el caso de los cultivos con nitrato. En condiciones de fijación de nitrógeno el crecimiento de la estirpe MA1 era dependiente de la presencia de 2-oxoglutarato y el crecimiento alcanzado era en todo caso muy reducido en comparación con la estirpe AMP2 en las mismas condiciones.

Tras varias generaciones mas de cultivo en medio suplementado con 2-oxoglutarato, tratando de obtener la segregación total, la estirpe MA1 resultó totalmente inviable. Sin embargo dicha estirpe pudo ser mantenida en medio conteniendo 3 mM de L-prolina en un estado intermedio de segregación.

Por otra parte, en los cultivos de la estirpe MA1 se observó la existencia de dos tipos de filamentos, unos similares a los de la estirpe silvestre y otros de contenido intracelular heterogéneo al microscopio óptico como se muestra en la figura 53. El aspecto granuloso de estos filamentos podría deberse a la presencia de vesículas de gas. Este tipo de filamentos no se aprecia habitualmente en los cultivos de la estirpe silvestre ni de la estirpe AMP2 cultivadas en las mismas condiciones que el mutante. Los filamentos granulados se diferencian a partir de los normales como se puede deducir por la existencia de filamentos «mixtos» (figura. 53). Este hecho podría considerarse una manifestación mas del estress a que se encuentran sometidas las células de la estirpe MA1, si bien no se ha caracterizado en detalle este fenómeno.

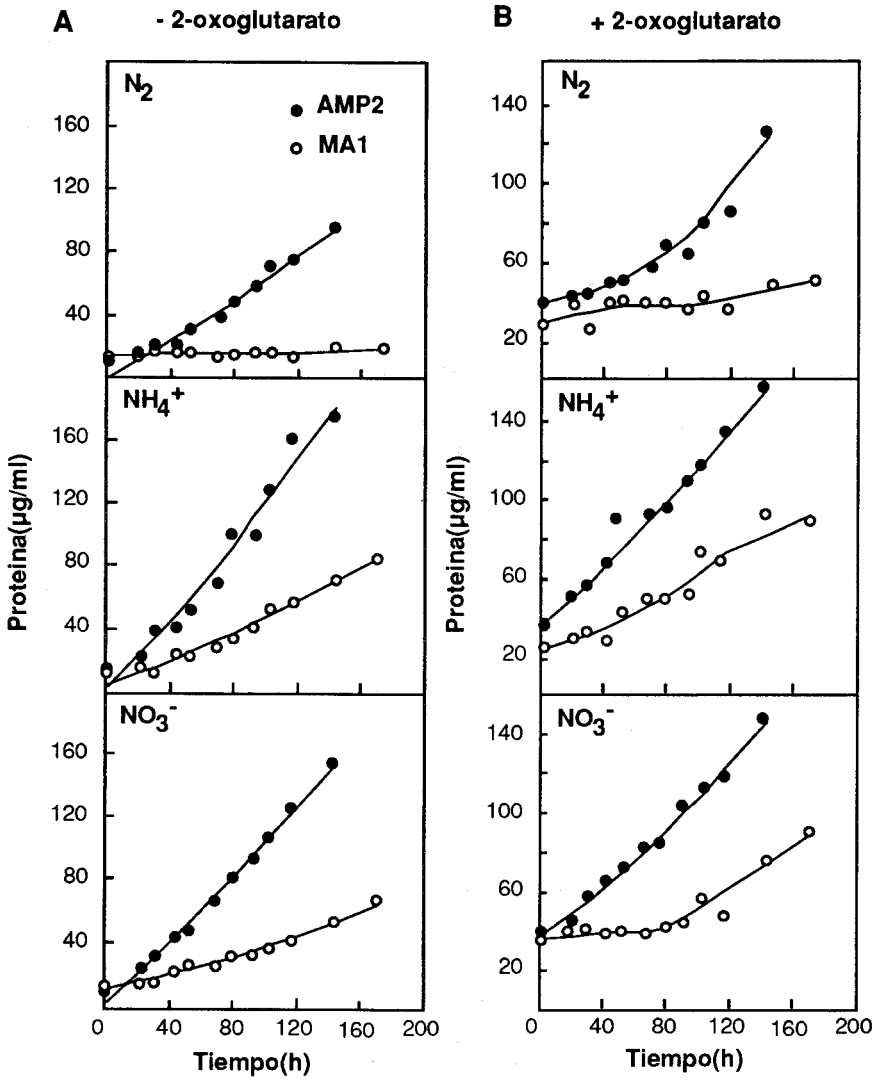


FIGURA 52. Curvas de crecimiento de las estirpes AMP2 y MA1 en diferentes condiciones de cultivo.

Células de las estirpes AMP2 y MA1 procedentes de un cultivo líquido en medio con nitrato, 5 mM de 2-oxoglutarato y 10 µg/ml de neomicina tamponado con 10 mM TES (pH 7,5) se lavaron con medio sin nitrógeno combinado y se resuspendieron en medios con nitrato, amonio o en ausencia de fuente de nitrógeno combinado, con la misma concentración de antibiótico y suplementados o no con 2-oxoglutarato. La densidad celular inicial fue de 0,4 µg de clorofila por ml y los cultivos se incubaron en luz con agitación constante durante varios días. Periódicamente se tomaron muestras de las cuales se determinó la concentración de proteína. Se muestra el resultado de un experimento típico.

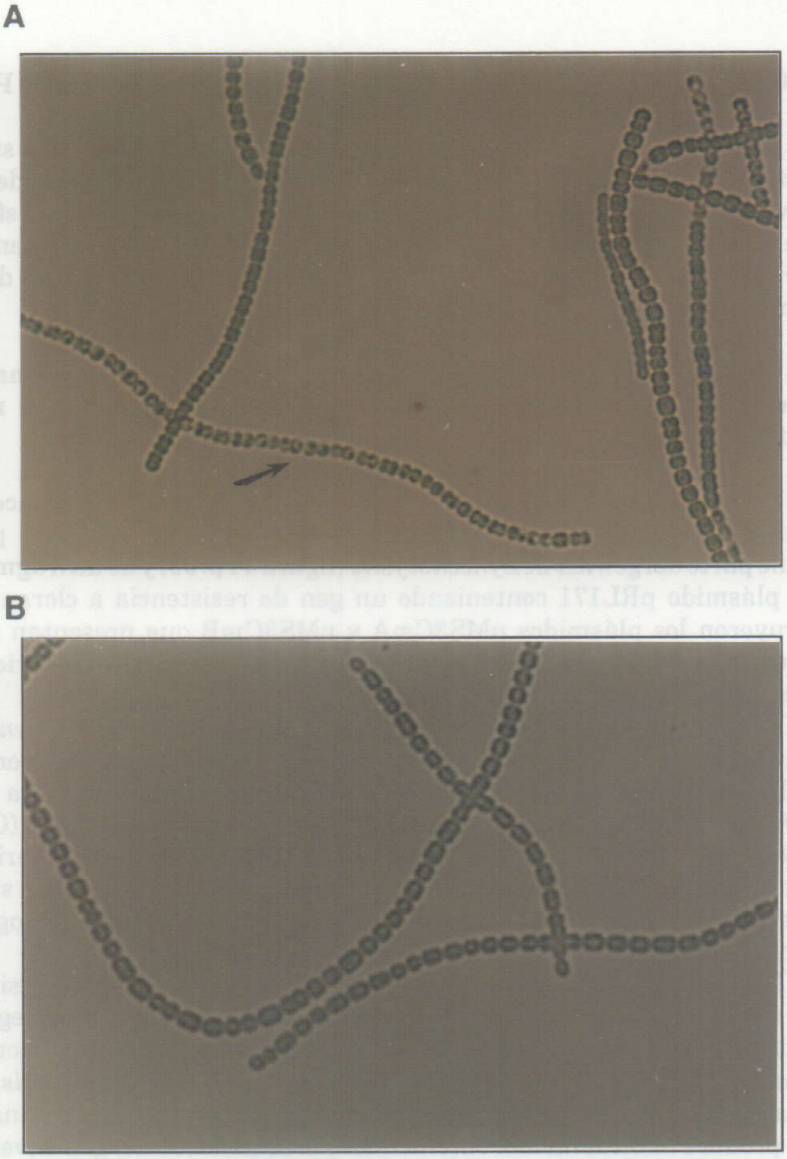


FIGURA 53. Imagen de los filamentos de las estirpes MA1 (A) y AMP2 (B) al microscopio óptico utilizando la técnica de campo claro.

(A) Estirpe MA1 de *Anabaena* sp. PCC 7120 (x420) cultivada en medio BG11 suplementado con 2-oxoglutarato, se señala con una flecha uno de los filamentos de aspecto granuloso de la estirpe MA1 a los que se hace referencia en el texto.

(B) Estirpe AMP2 de *Anabaena* sp. PCC 7120 (x670) cultivada en las mismas condiciones que la estirpe MA1.

3.15. GENERACION DE MUTANTES *icd* DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

La estrategia de mutagénesis del gen *icd* en *Synechocystis* fue similar a la descrita para el mismo gen en *Anabaena*, sin embargo la introducción de versiones inactivadas del gen *icd* en *Synechocystis* se llevó a cabo mediante transformación, ya que como se ha mencionado en la introducción esta cianobacteria es transformable de forma natural. Este hecho simplifica bastante la construcción de estirpes mutantes de forma dirigida.

3.15.1. Construcción de plásmidos portadores de versiones inactivadas del gen *icd* y transferencia de los mismos a *Synechocystis* mediante transformación

En la figura 54 se muestra el proceso seguido para la construcción de los plásmidos empleados en la mutagénesis. Partiendo del plásmido pMS3 que contiene parte del gen *icd* de *Synechocystis* (figura 41 p. 99) y de un fragmento *Hinc* II del plásmido pRL171 conteniendo un gen de resistencia a cloranfenicol, se construyeron los plásmidos pMS3CmA y pMS3CmB que presentan el gen *icd* interrumpido por el gen de resistencia a Cm clonado en ambas orientaciones respecto a *icd*.

Los plásmidos pMS3CmA y pMS3CmB se transfirieron a *Synechocystis* mediante transformación y se seleccionó su integración en el genomio por recombinación añadiendo cloranfenicol al medio (apartado 2.5.2.). La estirpe de *Synechocystis* 6803 utilizada para las transformaciones fue la SFCΩ5 (Chauvat *et al.*, 1988). Dado que no existe ningún origen de replicación cianobacteriano en los plásmidos transferidos, la resistencia al antibiótico solo puede darse si el gen de resistencia se integra en el cromosoma por recombinación homóloga con las secuencias flanqueantes pertenecientes a *Synechocystis*.

La recombinación homóloga para la integración del gen de resistencia se puede dar en un solo punto de la zona homóloga, lo que conlleva la integración del plásmido completo, o a ambos lados del gen del antibiótico, lo que conduce a la eliminación del resto de las secuencias plasmídicas. En *Synechocystis*, de forma contraria a lo que ocurre en *Anabaena*, el fenómeno de doble recombinación es el que se produce habitualmente obteniéndose la sustitución del gen silvestre por la copia inactivada del gen que se mutageniza. Si se produce un solo evento de recombinación se obtiene una estructura cromosómica que presenta dos copias en tandem del gen, una silvestre y otra mutada.

Tras llevar a cabo la transformación de *Synechocystis* con pMS3CmA y pMS3CmB se obtuvieron una serie de estirpes resistentes a cloranfenicol cuyo análisis se describe a continuación.

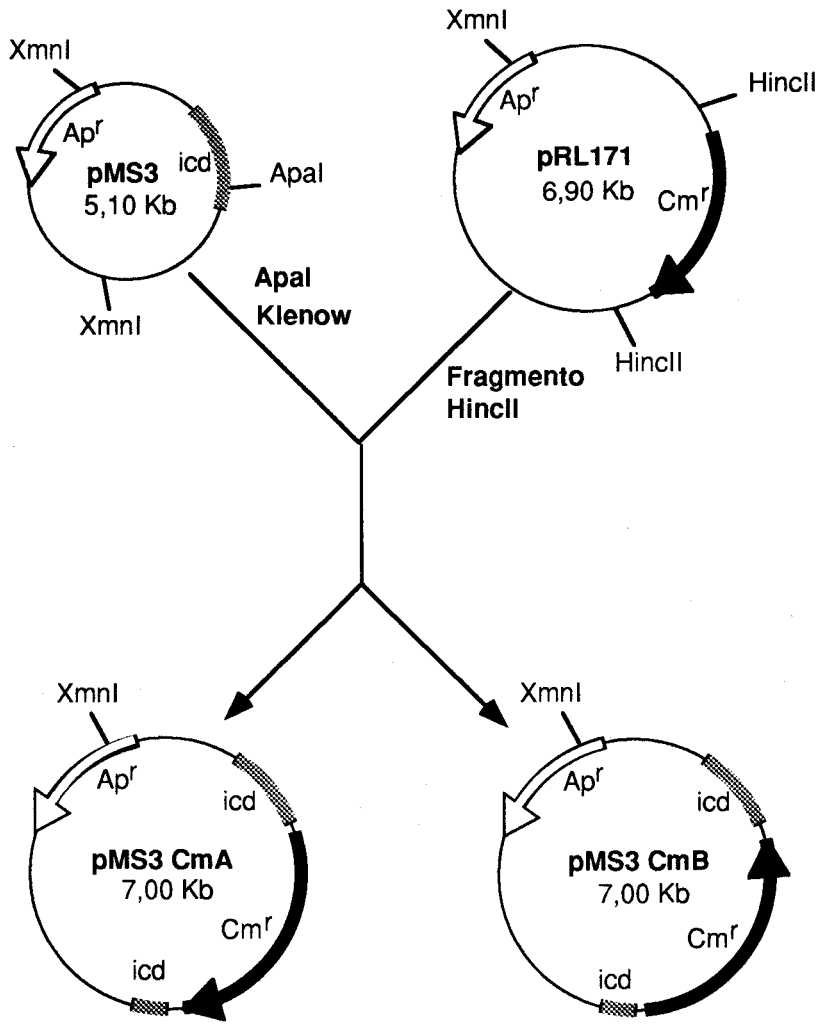
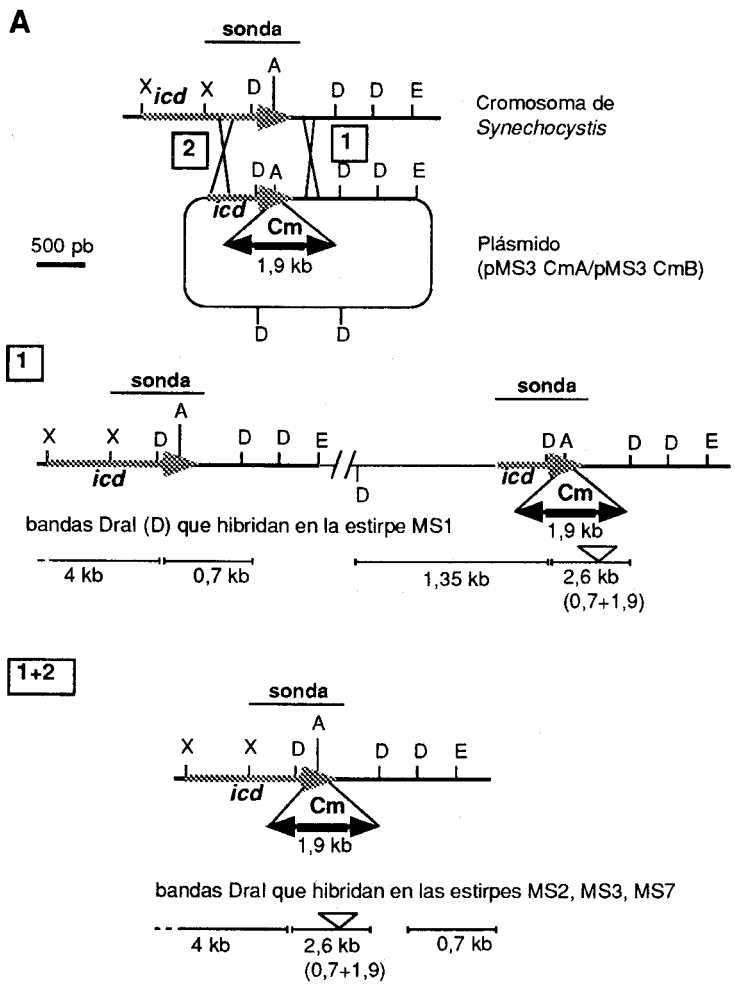


FIGURA 54. Esquema del proceso de construcción de los plásmidos empleados en la generación de mutantes *icd* de *Synechocystis* 6803.

Las flechas indican los procesos de ligación llevados a cabo. Las digestiones y los tratamientos con el fragmento de Klenow de la polimerasa para generar extremos romos se indican en cada caso (apartados 2.4.3.1 y 2.4.3.3). El gen de resistencia a cloranfenicol (Cm^R) empleado en la inactivación del gen *icd* provenía de pRL171 (derivado de RSF1010).

3.15.2. Análisis de la estructura cromosómica de las estirpes mutantes obtenidas.

Dado que *Synechocystis* es un organismo poliploide (Labarre *et al.*, 1989) era necesario comprobar, además de si se había producido la integración, si la segregación de los cromosomas mutados era total respecto a los silvestres. Se analizaron por hibridación de su ADN total con una sonda del gen *icd* cuatro de las estirpes obtenidas, dos de ellas (MS2 y MS7), procedentes de la transformación con pMS3CmA y otras dos procedentes de la transformación con pMS3CmB. En la figura 55A se muestra la estructura de la región *icd* silvestre así como la de los plásmidos empleados en la mutagénesis y la sonda utilizada para la hibridación.



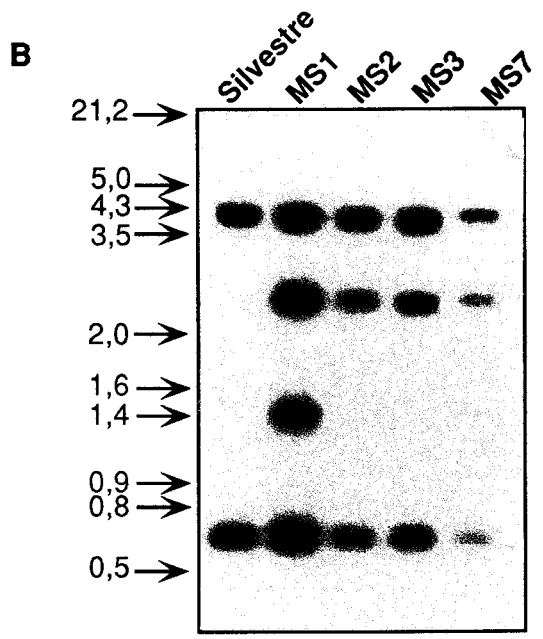


FIGURA 55. Estructura cromosómica de las estirpes mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

(A) Se muestra la región de ADN de *Synechocystis* donde se localiza el gen *icd*, la estructura de los plásmidos empleados en la mutagénesis y la sonda empleada en la hibridación que se presenta a continuación. Se detallan los posibles eventos de recombinación homóloga producidos en cada una de las estirpes obtenidas y las bandas de hibridación esperadas en cada uno de los casos. Por razones gráficas la representación del fragmento de 1,9 kb que contiene el gen Cm^R no se ha realizado a escala.

(B) Hibridación de ADN total de *Synechocystis* 6803 silvestre y de las estirpes mutantes MS1-7. El ADN se digirió en cada caso con la enzima *Dra* I. La hibridación se realizó a 65 °C. Los detalles experimentales se recogen en los apartados 2.4.2.7 y 2.4.2.9. A la izquierda se indican en kb los patrones de tamaño empleados.

Como muestra la figura 55B las cuatro estirpes mutantes presentaban una banda de hibridación de 2,6 kb ausente en la hibridación de la estirpe silvestre con la misma sonda. Esta banda se corresponde con el aumento de 1,9 kb sobre la banda *Dra* I de 0,72 kb silvestre e indicaba que se había producido la integración de la cassette de Cm, sin embargo las cuatro estirpes presentaban igualmente la banda *Dra* I silvestre de 0,72 kb por lo que se dedujo que la segregación de la versión inactivada del gen *icd* era parcial. Por otra parte la estirpe MS1 presentaba una banda adicional de 1,3 kb aproximadamente que indicaba que en este caso la integración del plásmido completo había tenido lugar mediante un único evento de recombinación (figura. 55A).

Con objeto de alcanzar la segregación total de los cromosomas mutantes y

teniendo en cuenta el fenotipo esperado para los mutantes *icd* de *Synechocystis* que era la auxotrofía de glutamato, se cultivaron las estirpes MS1, MS2, MS3 y MS7 durante varias generaciones en presencia de 5 mM de glutamato sin que ello significara un aumento del nivel de segregación obtenido. Se probó igualmente a suplementar el medio con 2-oxoglutarato, producto de la reacción de la NADP-IDH, sin que se obtuviera ningún resultado positivo respecto a la segregación.

3.15.3. Actividad NADP-IDH de las estirpes mutantes obtenidas.

Tal como se muestra en la tabla 17 la actividad NADP-IDH de las estirpes MS2, MS3 y MS7 era en torno al 50% de la que presentaba la estirpe silvestre. La estirpe MS1, tal como se esperaba según su estructura cromosómica, presentaba niveles silvestres de actividad NADP-IDH.

Tabla 17. Actividad NADP-IDH de las estirpes mutantes y silvestre de *Synechocystis*.

Estirpe	Actividad NADP-IDH (mU/mg prot.)[a]
SFCW5 (WT)	16,8 (100%)[b]
MS1	19,9 (118%)
MS2	9,1 (54%)
MS3	10,1 (60%)
MS7	9,7 (57%)

[a] La actividad NADP-IDH se midió en las condiciones estándar descritas en Materiales y Métodos.
[b] Entre paréntesis se indica el valor,en porcentaje, de las actividades respecto al silvestre.

El hecho de que las mutaciones del gen *icd* no se puedan segregar totalmente, indica que dicho gen es esencial para el crecimiento de las cianobacterias, al menos en las condiciones probadas en este trabajo.

4. DISCUSION

El presente trabajo contribuye al conocimiento de las isocitrato deshidrogenasas de cianobacterias, el cual era muy escaso antes de la realización del mismo. Se ha desarrollado un método de purificación de estas enzimas a partir de células procedentes de dos cianobacterias, *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120, de las mas utilizadas actualmente en los laboratorios de investigación. Por otra parte se han clonado y secuenciado los genes estructurales (*icd*) que codifican para la NADP-IDH en las dos cianobacterias estudiadas. La imposibilidad de obtener mutantes de ambas cianobacterias totalmente carentes de actividad NADP-IDH, por inactivación génica, indica que dichos organismos presentan una única enzima con esta actividad, codificada por un único gen cuya mutación impide el crecimiento de estas cianobacterias.

4.1. PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS NADP-IDHs DE *Synechocystis* 6803 Y *Anabaena* 7120

Los métodos empleados en la purificación de la isocitrato deshidrogenasa de diferentes fuentes han sido muchos y muy variados, incluyendo etapas de precipitación con diversos compuestos, filtraciones en gel y cromatografías de intercambio iónico o de afinidad. La mayoría de estos métodos incluyen el uso de gel de Blue-sefarosa como cromatografía de afinidad (Fatania *et al.*, 1993; Farrell Jr, 1980; Novotny Jr y Perry, 1991), este gel es específico para enzimas que requieren nucleótidos ya que el ligando del mismo, Cibacron blue F3GA, se une al dominio para dinucleótidos común a estas proteínas (Thompson *et al.*, 1975; Thompson y Stellwagen, 1976). En la actualidad muchos de los métodos de purificación de IDHs se llevan a cabo en sus últimas etapas mediante técnicas de FPLC empleando columnas de intercambio iónico en Mono-Q o Mono-P (Jennings *et al.*, 1990; McIntosh y Oliver, 1992; Fatania *et al.*, 1993).

En cianobacterias solo ha sido descrita una purificación parcial de NADP-IDH de *Anacystis nidulans* (Friga y Farkas, 1981) que no incluye ninguna etapa de purificación por cromatografía de afinidad. El método desarrollado en este trabajo ha permitido por primera vez la purificación hasta homogeneidad electroforética de dos NADP-IDHs cianobacterianas. La cromatografía de afinidad en Red-agarosa y la hidrofóbica en Fenil-sefarosa constituyen las etapas principales del proceso, si bien la de afinidad en Red-agarosa es la mas crítica en la obtención de las enzimas puras, al ser la única etapa de afinidad en sentido estricto. Este método se ha mostrado igualmente eficaz para la purificación de la NADP-IDHs en ambas cianobacterias, si bien el comportamiento cromatográfico de las enzimas es ligeramente diferente. Es de destacar que la enzima de *Anabaena* es mas inestable que la de *Synechocystis* y para su purificación fue necesario el uso de estabilizantes como citrato, $MgCl_2$,2-mercaptoetanol y glicerol en el tampón de purificación. El comportamiento de ambas enzimas en cromatografía de DEAE celulosa, primera etapa de la purificación, es así mismo diferencial; la IDH de *Anabaena* se une mas

debilmente a esta matriz que la de *Synechocystis* por lo que su elución se produce a concentraciones menores de sal, siendo la eficacia del proceso mayor que en el caso de *Synechocystis* al eliminarse muchas mas proteínas contaminantes que permanecen unidas a la matriz tras eluir la NADP-IDH (figuras 8, p. 57 y 9, p. 59). Los puntos isoeléctricos calculados para ambas enzimas (4,4 para *Synechocystis* y 5,5 para *Anabaena*) son probablemente la explicación a este comportamiento diferencial.

La cromatografía de afinidad en Red-agarosa ha sido empleada en la purificación de la NADP-IDH citosólica a partir de raices y hojas de guisante (Chen *et al.*, 1988), en este caso la elución se produce igualmente con NADP y la matriz puede ser sustituida por Blue-sefarosa aunque obteniéndose un menor rendimiento.

La similitud existente entre las dos NADP-IDHs purificadas se pone de manifiesto tanto por los resultados derivados de los estudios bioquímicos como por los que se deducen a partir de su secuencia de aminoácidos. En cuanto a su estructura molecular, las NADP-IDHs cianobacterianas se encuadran dentro del tipo dimérico de NADP-IDH definido por Chen y Gadal (1990) como enzimas compuestas de dos subunidades idénticas de masa molecular 40-50 kDa. La masa molecular calculada para las subunidades de estas enzimas mediante electroforesis de poliacrilamida con SDS fue de 57 kDa (figuras 10, p. 60 y 15, p. 65) mientras que la deducida de la secuencia de aminoácidos es en torno a 52 kDa (figuras 38, p. 45 y 43, p. 102) en ambos casos. Sin embargo los cálculos realizados mediante filtración en gel de la masa molecular de las NADP-IDHs cianobacterianas en estado nativo (108 kDa) (figuras 11, p. 61 y 16, p. 66) discrepan menos de la masa molecular deducida de la secuencia. En el caso de la NADP-IDH de *E. coli* se produce una situación similar ya que la masa molecular calculada para la subunidad mediante electroforesis con SDS fue de 53 kDa (Vasquez y Reeves, 1979) y el valor deducido a partir de la secuencia de aminoácidos fue de 45,7 kDa. Esta discrepancia se atribuyó en el caso de *E. coli* a una anómala movilidad de la IDH en electroforesis con SDS, circunstancia que no podemos excluir que sea la razón de la discrepancia observada en los cálculos de masa molecular en nuestro caso.

Las NADP-IDHs de *Synechocystis* y *Anabaena* muestran una alta afinidad por isocitrato y NADP como es típico de las NADP-IDHs, encontrándose todos los valores de K_m calculados en el rango micromolar (tablas 7, p. 71 y 9, p. 75). Las constantes de afinidad presentan en general valores mas bajos cuando se ensaya la actividad dependiente de Mn^{2+} como cofactor. El hecho de que las diferencias de K_m obtenidas con Mn^{2+} o con Mg^{2+} sean mayores respecto al isocitrato que respecto al NADP parece indicar que en cianobacterias, al igual que en otros organismos (Dean y Koshland Jr, 1990; Farrell Jr, 1980), el verdadera sustrato de la NADP-IDH es el complejo formado por el metal y el isocitrato, de ahí que la diferente afinidad por el catión divalente de lugar a una diferente afinidad aparente por el isocitrato.

En el caso de la NADP-IDH de *Anabaena* se ha encontrado un comportamiento

cinético bifásico (figura 23, p. 76) con respecto al Mg^{2+}. El componente de baja afinidad (110 μM) presenta una V_{max} (25 nmol/min) cuatro veces superior a la calculada (6,3 nmol/min) para el componente de alta afinidad (4,3 μM). Este hecho sugiere un posible papel del Mg^{2+} en la activación de la enzima. Un mecanismo de activación enzimática por Mg^{2+} ha sido propuesto en plantas superiores para algunas enzimas del ciclo de Calvin (Portis *et al.*, 1977), en este caso un incremento de la concentración estromática de Mg^{2+} inducido por luz sería el responsable de la activación de dichas enzimas del ciclo reductivo de las pentosas fosfato. En cianobacterias se desconoce si tal incremento de Mg^{2+} libre dependiente de la actividad fotosintética tiene lugar, aunque de ser cierto éste podría contribuir a un incremento en la actividad NADP-IDH y por tanto en la producción de 2-oxoglutarato, requerido para la asimilación del amonio durante el proceso fotosintético. Hasta el momento no ha sido descrito ningún mecanismo de regulación de IDH mediado por Mg^{2+} si bien tampoco se ha realizado un análisis cinético en profundidad de las IDHs cloroplásticas.

Respecto a los diferentes cationes que pueden actuar como cofactores en la reacción de la NADP-IDH, además del Mg^{2+} y el Mn^{2+}, otros iones divalentes como el Co^{2+}, el Cd^{2+} y el Ni^{2+} han mostrado su eficacia como cofactores de la NADP-IDH de diferentes fuentes (Farrell Jr, 1980). En el caso de la NADP-IDH de *Anabaena*, el Co^{2+} y el Ni^{2+} son capaces de actuar como cofactores dando lugar a una actividad entre el 40 y el 50% de la observada con Mn^{2+} y en concreto el Ni^{2+} da lugar, a concentraciones altas, a una actividad mayor de la observada en las mismas condiciones con Mg^{2+}, catión divalente que se considera generalmente el cofactor fisiológico y que ha sido demostrado como tal en la NADP-IDH de *E. coli* mediante cristalografía de rayos X (Hurley *et al.*, 1991).

Las NADP-IDHs cianobacterianas, al igual que el resto de las NADP-IDHs estudiadas, no presentan comportamiento alostérico, el cual es típico de las NAD-IDHs. Estas últimas responden alostéricamente a compuestos como el AMP o el ADP, cuya concentración intracelular establece el nivel de carga energética de la célula. Sin embargo las NADP-IDHs cianobacterianas se inhiben en general por nucleótidos de adenina (Papen *et al.*, 1983) (tablas 8, p. 72 y 11, p. 78) o por CDP (Friga y Farkas, 1981). Este fenómeno de inhibición, que ha sido descrito para NADP-IDHs de distinta procedencia, se debe frecuentemente a efectos quelantes de los nucleótidos sobre los cationes divalentes Mg^{2+} o Mn^{2+}, esenciales para la actividad NADP-IDH (Omran y Dennis, 1971; Meixner-Monori *et al.*, 1986). En cianobacterias, dado que no se han realizado estudios de la inhibición ejercida por el ATP o el ADP, a distintas concentraciones de iones metálicos, no podemos descartar que la inhibición observada se deba a efectos quelantes. Este hecho, unido al escaso grado de inhibición encontrado, nos lleva a desestimar las posibles implicaciones fisiológicas de estos fenómenos inhibitorios en las cianobacterias.

El NADPH ha sido descrito como inhibidor competitivo de varias NADP-IDHs incluyendo las de cianobacterias (Papen *et al.*, 1983; Meixner-Monori *et al.*,

1986; Omran y Dennis, 1971). En este trabajo hemos observado una fuerte inhibición competitiva del NADPH sobre la NADP-IDH de *Anabaena*, con una K_i calculada de 35 μM (figura 24B, p. 79) muy similar a la descrita para la NADP-IDH de *Aspergillus niger* (30 μM) (Meixner-Monori *et al.*, 1986). Esta inhibición de la IDH de *Anabaena* por NADPH tiene especial relevancia ya que como se discutirá mas adelante, la IDH de otras cianobacterias filamentosas fijadoras de dinitrógeno ha sido propuesta como potencial donadora de electrones para la nitrogenasa a través de la produción de NADPH (figura 56, p. 141). Concretamente, algunos autores han analizado la actividad de la NADP-IDH de *Nostoc muscorum* en función de la razón NADPH/NADP y en comparación con la actividad de la glucosa 6P deshidrogenasa (G6PDH), otra enzima cuyo aporte de NADPH se considera importante en el heterocisto, en las mismas condiciones (Karni y Tel-Or, 1983). A partir de estos estudios, los autores atribuyen a la IDH un papel dominante sobre la G6PDH en la producción de NADPH en el heterocisto atendiendo a sus características catalíticas, aunque no se aportan datos de K_i para ninguna de las dos enzimas. Nuestros datos, si bien no hemos realizado estudios sobre la G6PDH de *Anabaena*, apuntan a una posible inhibición de la NADP-IDH de este organismo por NADPH *in vivo* en el heterocisto, dada la baja K_i observada y teniendo en cuenta los estudios clásicos en los que se demuestra que en estas células el poder reductor presente es muy alto (Fay *et al.*, 1968).

Además de sus propiedades fisicoquímicas y cinéticas, otro dato que apoya el elevado grado de similitud existente entre las NADP-IDHs de *Synechocystis* y *Anabaena* es la inmunorreacción cruzada que muestran ambas enzimas. Este hecho ha permitido el uso de los anticuerpos policlonales dirigidos contra la NADP-IDH purificada de *Synechocystis*, obtenidos en este trabajo, en los experimentos de cuantificación de la NADP-IDH presente en extractos crudos de la estirpe silvestre de *Anabaena* sp. PCC 7120 en diferentes condiciones de cultivo (figura 29, p. 85), así como en la estirpe mutante *icd* de este organismo, MA1 (figura 51, p. 117).

Estos anticuerpos no presentan sin embargo inmunorreacción cruzada con la NADP-IDH de *E. coli*, si bien esta enzima es bastante similar a las NADP-IDHs cianobacterianas, según se deduce de sus propiedades fisicoquímicas y presenta una identidad de secuencia del 58 y 59%, respectivamente, con las NADP-IDHs de *Synechocystis* y *Anabaena*. Esta ausencia de inmunorreacción cruzada entre la enzima de cianobacterias y la de *E. coli* ha permitido emplear los estudios inmunológicos como una prueba adicional de la identidad de la NADP-IDH clonada por complementación del mutante *icd* DEK 2004 de *E. coli* (figura 34, p. 91).

4.2. CLONACION Y ANALISIS DEL GEN *icd* DE *Synechocystis* 6803 Y *Anabaena* 7120

Si bien el conocimiento de las enzimas con actividad IDH es mucho mas extenso del que se tiene de los genes estructurales que las codifican, se dispone actualmente de once secuencias de genes *icd* incluyendo las dos obtenidas en este trabajo. Ello permite un estudio comparativo de la estructura de estos genes.

El gen estructural de la NADP-IDH de *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha clonado por complementación de un mutante de *E. coli*, carente de actividad NADP-IDH. El método de clonación por complementación presenta en general ventajas sobre otros métodos como la hibridación con sondas heterólogas u homólogas, ya que permite normalmente el aislamiento de genes en su integridad y en muchas ocasiones de sus secuencias promotoras. La complementación heteróloga es especialmente útil en aquellos casos en los que no se dispone de mutantes del gen deseado, con anterioridad al aislamiento de éste, en el organismo objeto de estudio y no puede llevarse a cabo por tanto una estrategia de clonación mediante complementación homóloga. La complementación de mutantes *icd* de *E. coli* ha sido empleada recientemente para la clonación del gen *icd* de *Rhizobium meliloti* (McDermott y Kahn, 1992) y del gen que codifica para una NADP-IDH de soja (Udvardi *et al.*, 1993), mediante la construcción de genotecas de expresión, de forma similar a como se ha realizado en este trabajo para el aislamiento del gen *icd* de *Anabaena* 7120.

En el caso del gen *icd* de *Synechocystis* no fue posible la clonación por este procedimiento, a pesar de que se utilizaron varias genotecas de expresión construidas todas ellas de forma similar a la empleada de *Anabaena* y utilizando el vector de alto número de copias pBluescript II SK (+). El hecho de que tampoco fuera posible el aislamiento mediante construcción de subgenoteca de ADN genómico (figura 40, p. 98), de fragmentos de ADN que contuvieran el gen *icd* de este organismo completo, ni siquiera de aquellos que contienen las secuencias codificantes del extremo amino terminal de la proteína y secuencias de la zona 5' anteriores al codón de iniciación, sugiere que esta dificultad se puede deber a la letalidad que para *E. coli* signifique la presencia en elevado número de copias de dichas secuencias de la zona 5'. Considerando los datos disponibles, esta hipótesis parece mas probable que una imposibilidad de clonación debida a problemas derivados de los niveles de expresión del gen de *Synechocystis* en *E. coli*, la cual no es consistente con la dificultad de clonar fragmentos pequeños de la zona 5'. Es probable que la clonación de esta región del genomio de *Synechocystis* pueda llevarse a cabo mediante construcción de subgenotecas, utilizando un vector plasmídico de bajo número de copias por célula.

Por otra parte, si se considera la elevada identidad existente entre el gen *icd* de *Anabaena* y *Synechocystis*, que es superior al 80% a lo largo de toda la secuencia y especialmente la similitud observada en las secuencias deducidas para la región de la proteína que corresponde a la zona de la diana *Xmn* I del gen *icd* de

Synechocystis:

Anabaena **Leu Asn** Asp **Glu Leu Ile Pro** Thr **Thr Pro**
Synechocystis **Leu Asn** Lys **Glu Leu Ile Pro** Ala **Thr Pro**
Xmn I

No parece probable que los fragmentos *Xmn* I clonados, que constituyen los insertos de los plásmidos pMS1 y pMS2, se encuentren en el genomio de *Synechocystis* separados por alguna secuencias nucleotídicas. Este hecho podría ser confirmado mediante síntesis de oligonucleótidos correspondientes a secuencias del gen *icd* situadas a ambos lados de dicha diana *Xmn* I, amplificación del ADN comprendido entre ellos mediante reacciones de polimerasa en cadena y secuenciación, confirmando de este modo la secuencia de esta región.

El gen *icd* de *Anabaena*, clonado en el vector pBS, se expresa en *E. coli* dando lugar a unos niveles de actividad NADP-IDH en este organismo muy superiores a los encontrados en *Anabaena* (tabla 13, p. 88 y figura 32, p. 89). Esta expresión del gen *icd* de una cianobacteria en *E. coli* corrobora una vez mas el hecho ya descrito de que los genes cianobacterianos no difieren en general, en cuanto al patrón de uso de codones, de los genes de *E. coli* (Tandeau de Marsac y Houmard, 1987) sin que existan por tanto restricciones para la expresión en dicha enterobacteria de los genes de cianobacterias.

Los elevados niveles de NADP-IDH de *Anabaena* presentes en las estirpes de *E. coli* que expresan el gen *icd* de este organismo, facilitarían sin duda la purificación de grandes cantidades de esta enzima a partir de volúmenes de cultivo de *E. coli* muy inferiores a los que sería necesario emplear, para obtener la misma cantidad de enzima pura, en el caso de purificarla a partir de su organismo originario. Este hecho permitiría la realización cómoda de estudios de tipo estructural, los cuales conllevan en muchos casos la utilización de grandes cantidades de proteína.

Las secuencias de aminoácidos de las NADP-IDHs de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120, deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes *icd*, muestran una evidente similitud con el resto de secuencias de IDHs disponibles, lo cual permite un alineamiento de las mismas en casi toda su longitud (figura 44, p. 104). Esta comparación permite comprobar la conservación en las secuencias cianobacterianas de los residuos identificados en otras IDHs como implicados en la unión de los sustratos. Es de destacar en el alineamiento la existencia de una zona de 44 aminoácidos que parece ser característica de las NADP-IDHs de cianobacterias, ya que se encuentra tanto en la enzima de *Anabaena* como en la de *Synechocystis*. Las IDHs cianobacterianas presentan por otra parte un elevado porcentaje de identidad (alrededor del 60%) con la NADP-IDH de *E. coli*, esta similitud es superior a la que muestran con la enzima de *Thermus thermophilus* o a la que presenta esta última con la de *E. coli*, en torno al 40% en todos los casos,

(tabla 14, p. 106). Las NADP-IDHs de *Synechocystis*, *Anabaena* y *E. coli* son por tanto, de entre las IDHs procarióticas secuenciadas, las que presentan mayor similitud, siendo la inserción de 44 residuos de aminoácidos en las enzimas de cianobacterias la principal diferencia entre ellas respecto a sus secuencias. Dado que la estructura de la NADP-IDH de *E. coli* se conoce en detalle, sería interesante realizar un análisis estructural comparativo entre esta enzima y las cianobacterianas, con objeto de dilucidar como afecta esta inserción de 44 residuos de carácter hidrofílico a la estructura global de las NADP-IDHs de cianobacterias.

Por otra parte, no es posible por ahora hacer un estudio evolutivo de las IDHs en procariotas a partir de sus secuencias, ya que solo se dispone hasta el momento de cuatro de ellas; dos de las cuales las obtenidas en este trabajo, pertenecientes al mismo grupo de organismos. Si se comparan las secuencias bacterianas con las eucarióticas se observa que las NADP-IDHs procarióticas presentan una similitud mayor (30-35% de identidad) con las secuencias de la NAD-IDH de *Saccharomyces cerevisiae* (IDH1 e IDH2), únicas secuencias disponibles de IDHs dependientes de NAD, que la que se encuentra al compararlas con las NADP-IDHs eucarióticas (20-25% de identidad). Este último grupo de secuencias es a su vez muy homogéneo existiendo mas de un 60% de identidad entre las secuencias procedentes de plantas superiores, mamíferos o levaduras.

La existencia en eucariotas de isoenzimas de diferente localización subcelular, así como la coexistencia en un mismo orgánulo de mas de una isoenzima con actividad IDH puede haber dado lugar a una especialización de estas en cuanto a su función, acompañada de una común evolución de sus secuencias. Este hecho podría explicar la elevada conservación de las NADP-IDHs eucarióticas, las cuales muestran escasa similitud (25% de identidad) con las secuencias de NAD-IDH de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este sentido los procariotas, que presentan generalmente una única enzima con actividad IDH, han podido conservar quizás un papel catabólico en el ciclo de Krebs similar al que se acepta normalmente para las NAD-IDHs eucarióticas, de ahí que sus secuencias se encuentren mas relacionadas con estas últimas. Las NADP-IDHs de cianobacterias representan un caso especial en este esquema, ya que si bien son enzimas procarióticas su papel catabólico en el ciclo de Krebs no resulta evidente, como se discutirá mas adelante, al encontrarse éste interrumpido en dichos organismos.

Las IDHs presentan en general una elevada similitud de secuencia con las isopropilmalato deshidrogenasas (IMDHs) tanto de origen procariótico como eucariótico. En el caso de las NADP-IDHs de cianobacterias los porcentajes de identidad de secuencia encontrados con las IMDHs son incluso superiores a los existentes con otras IDHs. La IMDH de la cianobacteria *Spirulina platensis*, que ha sido clonada y secuenciada recientemente (Bini *et al.*, 1992), muestra un porcentaje de identidad del 29% con la NADP-IDH de *Anabaena*, el cual no es significatívamente superior al que presenta la IDH de este último organismo con

las IMDHs de otros grupos taxonómicos. Este hecho, junto con los datos disponibles de identidades encontradas entre las IDHs y las IMDHs de diferentes fuentes, sugiere que la relación existente entre ambas deshidrogenasas se extiende a lo largo de toda la escala evolutiva. Por otra parte el hecho de que la IDH de *E. coli* no presente similitud topológica con otras deshidrogenasas, siendo igualmente distinto y único su dominio de unión para el NADP, ha hecho proponer a algunos autores a las deshidrogenasas descarboxilativas dependientes de iones metálicos, a las cuales pertenecen la IDH y la IMDH como enzimas pertenecientes a una familia evolutivamente distinta de otras deshidrogenasas (Hurley *et al.*, 1991).

Un aspecto remarcable en la secuencia de la región que contiene el gen *icd* en *Anabaena* es la presencia de repeticiones imperfectas de un heptanucleótido, de secuencia consenso 5'CCCCAAT3', en la zona anterior al gen icd. Este mismo motivo ha sido encontrado en la región 3' tras el gen *hetA* (renombrado *hepA*) implicado en la diferenciación de heterocistos (Holland y Wolk, 1990), y en varias localizaciones intergénicas o anteriores a genes del operón *nifBNSV* implicado en la fijación de dinitrógeno en este organismo (Mulligan y Haselkorn, 1989). Heptanucleótidos con diferentes secuencias consenso (CAAATGA, CTAATGA o AGTCATT) han sido encontrados cerca de genes relacionados con la biosíntesis de aminoácidos o de genes de ribonucleasa P en varias cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos (Parsot y Mazel, 1987; Floriano *et al.*, 1992; Vioque, 1992). La presencia de estas secuencias repetidas es específica de las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos y se encuentran normalmente en zonas contiguas 5' ó 3' a fases de lectura abierta (ORFs). Sin embargo recientemente se han encontrado estas repeticiones formando una inserción en la zona codificante del gen *nifJ* de *Anabaena* 7120 (Buikema y Haselkorn, 1993). La función de estas repeticiones es totalmente desconocida por el momento. Se ha propuesto un posible papel de las mismas como diana de proteínas específicas de unión a ADN implicadas en el estado de superenrollamiento de determinados dominios del genomio (Mazel *et al.*, 1990) o bien modulando los niveles de transcripción de los genes a los cuales preceden (Mulligan y Haselkorn, 1989). Ambas hipótesis acerca de la función de estas secuencias repetidas en tandem están igualmente sin confirmar experimentalmente.

Tanto el gen *icd* de *Anabaena* como el de *Synechocystis* están situados junto a otras fases de lectura abierta, según se desprende de la secuencia de su entorno (figura 37, p. 94 y figura 42, p. 100). En el caso de *Anabaena* 7120, dado que no se han realizado estudios de la expresión del gen *icd* mediante análisis de mensajeros, no podemos aventurar si este gen se expresa dando lugar a un mensajero monocistrónico, o si por el contrario se cotranscribe con alguna ORF contigua. Sin embargo la proximidad de la ORF2 (figura 37, p. 94) y la correspondiente al gen *icd*, así como la localización en esta zona de las secuencias repetidas en tandem, a que hacíamos referencia anteriormente, que se localizan frecuentemente en regiones intercistrónicas, podría sugerir la posible cotranscripción del gen *icd* y dicha ORF2.

Por otra parte, tampoco se han realizado estudios de la actividad promotora de la región 5' anterior al gen *icd*, aunque es de destacar en este sentido que las posibles secuencias promotoras identificadas como regiones -10 y -35 (figura 38, p. 95) no se ajustan muy fielmente a las secuencias consenso de *E. coli* para estas zonas.

El gen *icd* de *Synechocystis*, cuyo transcrito ha sido identificado mediante Northern, no parece formar parte de una unidad transcripcional con ninguna ORF contigua. El tamaño calculado para el ARN_m correspondiente (1,6 kb) coincide con el esperado para la transcripción del gen *icd* dando lugar a un mensajero monocistrónico, teniendo en cuenta la longitud de la ORF correspondiente a este gen (1.425 b).

4.3. PAPEL FISIOLOGICO DE LA IDH DE *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120

Además de las sugerencias que sobre el papel fisiológico de esta enzima se pueden formular a la vista de los resultados obtenidos en los experimentos de mutagénesis, algunos aspectos acerca de dicho papel metabólico pueden deducirse de los estudios realizados en las estirpes silvestres. En este sentido, tanto en *Synechocystis* 6803 como en *Anabaena* 7120 hemos encontrado una modulación de la actividad NADP-IDH en función de la fuente de nitrógeno o de la disponibilidad de la misma. Este hecho pone de manifiesto la implicación de la NADP-IDH en el metabolismo del nitrógeno de las cianobacterias.

Por otra parte, la ausencia de modulación de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 cuando las células de este organismo se someten a hambre de CO_2 o a oscuridad (Tabla 12, p. 82), circunstancias ambas que alteran la asimilación de carbono en condiciones de crecimiento fotoautotrófico, parece indicar que esta enzima no se encuentra regulada en función de los factores externos que regulan la asimilación fotosintética del carbono.

La inducción de 4-5 veces observada en la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* en condiciones de hambre de nitrógeno (figura 27, p. 83), la cual se corresponde con un aumento de la cantidad de esta proteína (figura 28, p. 84) así como un incremento en los niveles de ARN_m del gen *icd* (figura 47, p. 110), indica una regulación transcripcional de este gen en función de la disponibilidad de fuente nitrogenada. Una inducción similar por carencia de nitrógeno ha sido descrita para las isoenzimas con actividad isocitrato deshidrogenasa del alga unicelular *Chlamydomonas reinhartdii*, las cuales doblan su actividad tras ocho horas de cultivo en ausencia de nitrógeno (Martinez Rivas y Vega, 1993).

En *Synechocystis* se ha observado por otra parte un incremento de la actividad glutamina sintetasa en respuesta a este mismo factor (Reyes y Florencio, comunicación personal). Este hecho, que ha sido descrito igualmente en *Chlamydomonas reinhartdii* (Menacho y Vega, 1989), confirma la correlación funcional antes apuntada entre la NADP-IDH y las enzimas de la asimilación de

amonio en cianobacterias.

La situación metabólica creada en condiciones de limitación de nitrógeno, considerando el incremento de la actividad NADP-IDH que aporta 2-oxoglutarato y el bloqueo en la metabolización del mismo, por la ruta GS-GOGAT, debido a la carencia de nitrógeno, conllevaría una acumulación de este cetoácido. De hecho en *Synechocystis* dicha acumulación de 2-oxoglutarato en células deficientes en nitrógeno ha sido descrita, encontrándose niveles intracelulares de este compuesto, en células sometidas a hambre de nitrógeno durante tres horas, hasta siete veces superiores a las detectadas en células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno (Mérida *et al.*, 1991). Por otra parte se ha observado que en células de *Anabaena cylindrica* cultivadas en ausencia de nitrógeno combinado, la adición de amonio provoca un rápido incremento de las concentraciones intracelulares de glutamina, glutamato y aspartato (Ohmori *et al.*, 1989). Estos autores atribuyen dicha estimulación de la síntesis de aminoácidos tras adición de amonio, no solo a un incremento del suplemento de nitrógeno para el grupo amino, sino también a una disponibilidad de esqueletos carbonados C-4 y C-5 suministrados por ambas ramas del ciclo incompleto de los ácidos tricarboxílicos (figura 1, p. 6).

Los resultados obtenidos en este trabajo respecto a los niveles de actividad NADP-IDH en la estirpe *Anabaena* sp. PCC 7120, los cuales son superiores cuando este organismo se cultiva en ausencia de nitrógeno combinado, correlacionan con los datos de *Synechocystis* en hambre de nitrógeno, ya que la utilización de dinitrógeno mediante fijación es la situación mas limitante respecto al nitrógeno de las que se han ensayado en este trabajo para dicha cianobacteria fijadora.

La significación fisiológica de un aumento de 2-oxoglutarato, mediado por la inducción de la actividad NADP-IDH, en condiciones metabólicas (hambre de nitrógeno) en las que no puede ser utilizado como esqueleto carbonado para la similación del amonio, no es del todo evidente. Sin embargo, este hecho puede reflejar un mecanismo metabólico para garantizar la máxima eficacia de la ruta GS-GOGAT en la utilización del escaso nitrógeno disponible. Por otra parte, el 2-oxoglutarato no parece tener en cianobacterias ninguna otra vía metabólica de utilización, ya que como se ha mencionado anteriormente estos organismos carecen de 2-oxoglutarato deshidrogenasa y succinil-coenzima-A sintetasa, no existiendo por tanto un verdadero ciclo de Krebs (Pearce et *al.*, 1969).

Respecto a la regulación transcripcional observada del gen *icd* de *Synechocystis*, es de destacar que si bien en otros procariotas que presentan un ciclo de Krebs completo se han observado modulaciones de la actividad IDH, en función de las transiciones entre metabolismo aeróbico y anaeróbico (Iuchi y Lin, 1988) o de la limitación de oxígeno (Jackson y Dawes, 1976), nunca ha sido descrita la regulación transcripcional de genes *icd* procarióticos. Los análisis de mensajeros mediante Northern se han realizado recientemente para los genes *icd* que codifican NADP-IDHs de mamíferos (Huh *et al.*, 1993) y plantas superiores leguminosas (Shorrosh y Dixon, 1992; Udvardi *et al.*, 1993). En estos casos se ha encontrado una

modulación de la cantidad de los transcritos en función de los diferentes tejidos analizados y del estadío de desarrollo de los mismos.

Desafortunadamente, la imposibilidad de clonar la región 5' anterior al gen *icd* de *Synechocystis*, no nos ha permitido analizar en este trabajo las posibles secuencias de unión de factores de transcripción cianobacterianos en esta región, que pudieran estar implicadas en la regulación observada.

El hecho de que, en las condiciones probadas en este trabajo, no haya sido posible la obtención de mutantes *icd* carentes por completo de actividad NADP-IDH de ninguna de las dos cianobacterias estudiadas, sugiere que dicha actividad es esencial para el crecimiento de estos organismos. Por otra parte, el gen *icd* clonado parece ser el único que codifica para una isocitrato deshidrogenasa tanto en *Anabaena* 7120 como en *Synechocystis* 6803.

La poliploidía que, como ya se ha mencionado anteriormente, caracteriza a las cianobacterias estudiadas permite sin embargo la obtención de mutantes con diferentes niveles de actividad NADP-IDH. Estos mutantes, obtenidos mediante inactivación génica por inserción de genes de resistencia a antibióticos, presentan estados intermedios de segregación de forma que manteniendo cromosomas silvestres respecto al gen *icd*, son resistentes al antibiótico gracias a otros cromosomas en los que si se observa la inactivación del gen *icd*, expresándose en estos últimos el gen de resistencia al antibiótico (figura 50, p. 115 y figura 55, p. 124).

La presencia de cromosomas silvestres respecto al gen *icd* en estos mutantes, así como la correlación observada entre la proporción de cromosomas silvestres y mutantes y la actividad NADP-IDH detectada, descarta que dicha actividad residual se deba a la existencia de alguna otra isoenzima con actividad isocitrato deshidrogenasa, confirmando de este modo lo que se concluye de los experimentos bioquímicos.

La inestabilidad de los mutantes rezumantes, en los cuales se pueden dar cambios en las proporciones de cromosomas mutados y silvestres en función de los diferentes medios de cultivo, relativiza las conclusiones que sobre el papel de la NADP-IDH pueden ser obtenidas.

De entre los organismos que presentan una única enzima con actividad isocitrato deshidrogenasa, se han obtenido mutantes carentes de dicha actividad en *E. coli* (Lakshmi y Helling, 1976) y *Rhizobium meliloti* (McDermott y Kahn, 1992). En ambos casos el gen *icd* es prescindible siendo el fenotipo característico de estos mutantes la auxotrofía de glutamato. El hecho de que en cianobacterias no se obtengan dichos auxótrofos, teniendo en cuenta que los dos organismos estudiados transportan aminoácidos al interior celular (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1988; Flores y Muro-Pastor, 1990; Montesinos, Tesis doctoral en realización), implica que en estos organismos la NADP-IDH cumple algún otro papel además de su función anabólica en la biosíntesis de glutamato y aminoácidos derivados.

Los resultados obtenidos en los experimentos en que se suplementaba el medio de crecimiento de la estirpe MA1 con 2-oxoglutarato indican que este cetoácido debe ser transportado al interior celular, ya que ejerce su efecto favoreciendo la segregación de la mutación de dicha estirpe. Sin embargo, el hecho de que varias generaciones de cultivo en presencia de 2-oxoglutarato dieran lugar finalmente a la inviabilidad de la estirpe MA1, parece indicar que si bien este compuesto tiene un efecto positivo transitorio, la carencia de este producto de la reacción de la NADP-IDH no es la razón de la letalidad de la mutación *icd*.

El hecho de que la estirpe MA1, en un estado de segregación en el que presenta alrededor del 10% de la actividad silvestre, se comporte como auxótrofo de 2-oxoglutarato cuando se cultiva en medio carente de nitrógeno combinado, mientras que es capaz de crecer tanto en presencia como en ausencia de dicho cetoácido cuando se cultiva con nitrato o amonio, podría indicar que el requerimiento de 2-oxoglutarato para la asimilación de amonio es mayor en condiciones de fijación. En este caso los bajos niveles de actividad presentes en la estirpe MA1 serían insuficientes. Esta hipótesis estaría de acuerdo con la existencia de niveles mas elevados de actividad NADP-IDH que se observan en la estirpe silvestre de *Anabaena* 7120 en condiciones de fijación de dinitrógeno (figura 29, p 85).

Por otra parte, la esencialidad de la actividad NADP-IDH para el crecimiento de las cianobacterias puede venir dada por un requerimiento de NADPH, producto de la reacción de esta enzima. En este sentido, como ya se ha mencionado, la contribución de la NADP-IDH de cianobacterias fijadoras en la producción de poder reductor en forma de NADPH necesario para la reducción de dinitrógeno en el heterocisto, ha sido propuesta por varios autores (Bothe, 1982; Karni *et al.*, 1983; Bothe y Neuer, 1988).

En experimentos realizados con extractos libres de células procedentes de heterocistos se ha observado la reducción de C_2H_2 dependiente de la adición de diversos compuestos, de esta forma se ha identificado que los sustratos cuya metabolización da lugar a producción de NADPH soportan una mayor actividad reductora de C_2H_2. Como se muestra en la figura 56, la metabolización de la glucosa mediante la acción de la G6PDH y la 6PGDH se considera, en virtud de los experimentos mencionados, la principal vía de producción de NADPH en el heterocisto. Sin embargo otros compuestos y entre ellos el isocitrato son capaces de soportar cierta actividad reductora de C_2H_2, lo cual apunta a una contribución importante de la NADP-IDH en la producción de NADPH para la fijación (Haselkorn y Buikema, 1992).

Nuestros datos sugieren que el requerimiento de NADPH no se restringe a las condiciones de fijación de nitrógeno, ya que la esencialidad de la NADP-IDH se muestra en todas las condiciones de crecimiento. Sin embargo no podemos descartar de ningún modo el papel de dicha enzima en el aporte de NADPH para la fijación en el heterocisto.

Aunque el estudio de las estirpes mutantes *icd* de *Synechocystis* ha sido muy

escaso en este trabajo, los bajos niveles de actividad NADP-IDH observados en la estirpe silvestre de este organismo durante el crecimiento mixotrófico (figura 26, p. 81), permiten considerar la posibilidad de que estas estirpes mutantes puedan alcanzar altos niveles de segregación e incluso la segregación total en dichas condiciones de crecimiento. En el caso de que el requerimiento de NADPH fuera

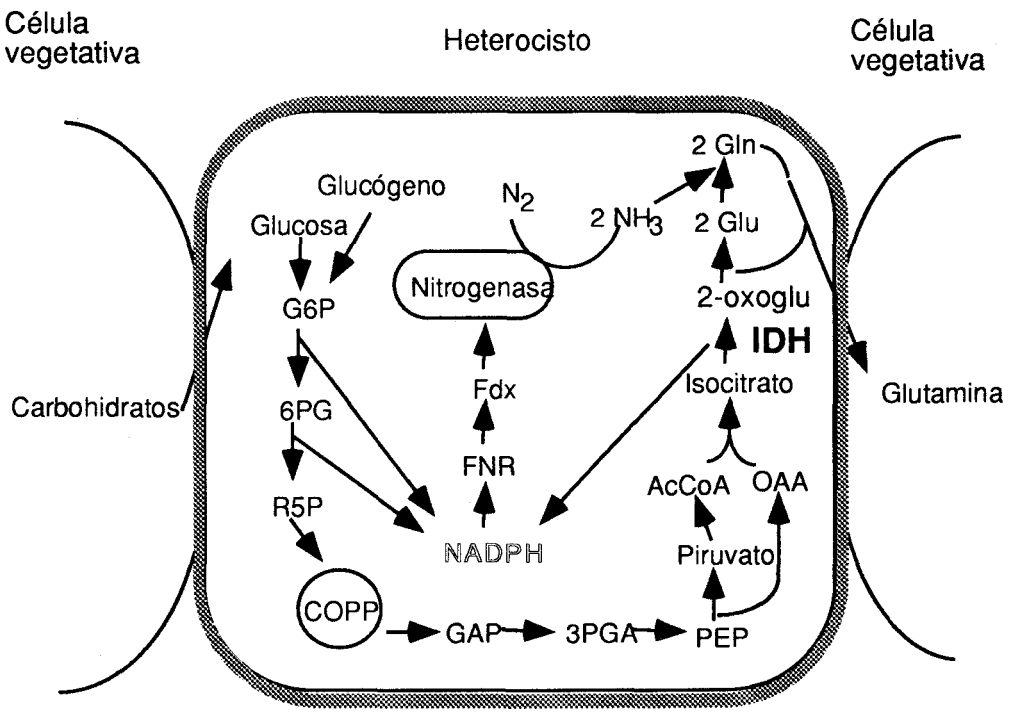


FIGURA 56. Esquema de las principales rutas metabólicas del heterocisto y donación de electrones a la nitrogenasa.

Se señalan las principales vías de producción de NADPH en el heterocisto. COPP: ciclo oxidativo de las pentosas fosfato. FNR: ferredoxina NADP oxidorreductasa.

el factor limitante en la esencialidad de la NADP-IDH, la utilización de glucosa en estas condiciones de mixotrofía a traves de la G6PDH daría lugar a una elevada producción de NADPH. Es de destacar que dicha enzima presenta altos niveles de actividad en la estirpe silvestre de *Synechocystis* 6803 tanto en luz como en oscuridad (Chávez *et al.*, datos no publicados).

Otra posibilidad para la esencialidad de la NADP-IDH podría ser que la

carencia de dicha actividad diera lugar a la acumulación de niveles de citrato o isocitrato tóxicos para las células. De hecho ha sido descrito que los mutantes *icd* de *Rhizobium meliloti* y *E. coli* dan lugar espontáneamente a mutantes sin actividad citrato sintasa (CS) (McDermott *et al.*, 1992; Lakshmi y Helling, 1976). Si esta selección espontánea de mutantes dobles IDH^- CS^- no tiene lugar en cianobacterias, la acumulación de un producto tóxico podría ser la razón de la letalidad de los mutantes *icd*.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha purificado hasta homogeneidad electroforética una enzima con actividad isocitrato deshidrogenasa, presente en la cianobacteria unicelular, heterótrofa facultativa Syne*chocystis* sp. PCC 6803 y en la filamentosa fijadora de dinitrógeno, formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120.

2. La isocitrato deshidrogenasa de las dos cianobacterias estudiadas es una enzima dimérica, estrictamente dependiente de NADP y de cationes divalentes como el Mg^{2+} o el Mn^{2+} para su actividad. Según sus características fisicoquímicas y cinéticas, las NADP-IDHs de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 son muy similares entre sí y a su vez a las NADP-isocitrato deshidrogenasas de diferentes fuentes.

3. Se ha clonado y secuenciado el gen *icd* que codifica la NADP-IDH de *Anabaena* 7120, así como una gran parte del gen *icd* de *Synechocystis* 6803. El gen *icd* de *Anabaena* es capaz de expresarse en *E. coli* y la enzima por el codificada complementa la auxotrofía de glutamato característica de los mutantes IDH^- de este organismo.

4. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes *icd* de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 son muy similares entre sí y presentan así mismo similitud con otras secuencias de isocitrato deshidrogenasas e isopropilmalato deshidrogenasas. Dicha similitud es especialmente alta con la secuencia deducida para la NADP-IDH de *E. coli*, si bien existe una zona específica de 44 aminoácidos en las secuencias cianobacterianas, no alineable con ninguna de las demás secuencias disponibles.

5. Los niveles de actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 se encuentran regulados en función de la fuente de nitrógeno empleada para su cultivo o de la disponibilidad de la misma. La actividad IDH de *Synechocystis* se incrementa entre 4 y 5 veces en células sometidas a hambre de nitrógeno. En *Anabaena* dicha actividad es superior cuando este organismo se cultiva en ausencia de nitrógeno combinado.

6. La regulación de la actividad NADP-IDH de *Synechocystis* 6803 por hambre de nitrógeno se corresponde con un incremento de la cantidad de proteína NADP-IDH así como de ARN_m del gen *icd* en dichas condiciones. Dicha regulación parece producirse por tanto a nivel transcripcional y sugiere una coordinación entre el metabolismo del nitrógeno y del carbono.

7. Se han obtenido estirpes mutantes de *Anabaena* 7120 y *Synechocystis* 6803 que presentan inactivado el gen *icd* en parte de sus copias cromosómicas. La mutación de dicho gen en todos los cromosomas de estas cianobacterias y por tanto la

obtención de estirpes totalmente carentes de actividad IDH no se ha conseguido en las condiciones probadas. Consideramos que el gen *icd* es esencial para el crecimiento de las cianobacterias estudiadas.

6. BIBLIOGRAFIA

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

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

Apostolakos, D., Menter, P.A., Rampsch, B.J?, Reeves, H.C. y Birge, E.A. (1982) Genetic map position of the cistron coding for isocitrate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. *Curr. Microbiol.* **7**, 45-47

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., y Struhl, K. (1992) *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: Greene Publihing y Wiley-Interscience, NY

Barnes, L.D., Kuehn, G.D. y Atkinson, D.E. (1971) Yeast diphosphopyridine nucleotide specific isocitrate dehydrogenase. Purification and some properties. *Biochemistry*. **10**, 3939-3944.

Barrera, C.R., y Jurtshuk, P. (1970) Characterization of the highly active isocitrate dehydrogenase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim. Biophys. Acta* **220**, 416-429

Bini, F., De Rossi, E., Barbirato, L., y Riccardi, G. (1992) Molecular cloning and sequencing of the b-isopropylmalate dehydrogenase gene from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 493-498

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

Black, T.A., Cai, Y., y Wolk, C. P. (1993) Spatial expression and autoregulation of hetR, a gene involved in the control of heterocyst development in Anabaena. *Mol. Microbiol.* **9**, 77-84

Bothe, H. (1982) Nitrogen fixatiion. En *The biology of cyanobacteria* (Carr, N. G. y Whitton B. C., eds) pp 87-104 Blackwell, Oxford

Bothe, H., y Neuer, G. (1988) Electron donation to nitrogenase in heterocysts. *Methods. Enzymol.* **167**, 469-501

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

472

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

Buikema, J., y Haselkorn, R. (1993) Molecular genetics of cyanobacterial development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.***44,** 33-52

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

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

Chapman, J. S., y Meeks, J. C. (1983) Glutamine and glutamate transport by Anabaena variabilis *J. Bacteriol* **156,** 122-129

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

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

Chen, R. D., Le Maréchal, P., Vidal, J., Jacquot, J.P., y Gadal, P. (1988) Purification and comparative properties of the cytosolic isocitrate dehydrogenases (NADP) from pea (Pisum sativum) roots and green leaves. *Eur. J. Biochem.* **175,** 565-572.

Chen, R. D., y Gadal, P. (1990) Structure, function and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenase in higher plants and in other organisms. *Plant Physiol. Biochem.* **28,** 411-427

Chen, R. D.,Bismuth, E., Chanpigny, M-L., y Gadal, P. (1989) Chromatographic and immunological evidence that chloroplastic and cytosolic pea (*Pisum sativum* L.) NADP-isocitrate dehydrogenases are distinct isoenzymes. *Planta* **178,** 157-163

Cohen, P.F. y Colman, R.F. (1972) Diphosphopyridine nucleotide dependent isocitrate dehydrogenase from pig heart. Characterization of the active substrate and modes of regulation. *Biochemistry* **11**, 1501-1508

Coronil, T., Lara, C., y Guerrero, M.G. (1993) Shift in carbon flow and stimulation of amino-acid turnover induced by nitrate and ammonium assimilation in *Anacystis nidulans.Planta* **189**, 461-467

Coulate, T.P. y Dennis, D.T. (1969) Regulatory properties of a plant NAD: isocitrate dehydrogenase. The effect of inorganic ions. *Eur. J. Biochem.* **7**, 153-158

Cupp, J. R., y McAlister-Henn, L. (1991) NAD+-dependent isocitrate dehydrogenase. Cloning ,nucleotide sequence, and disruption of the IDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* **266**, 22199-22205

Cupp, J. R., y McAlister-Henn, L. (1992) Cloning and characterization of the gene encoding the IDH1 subunit of NAD+-dependent isocitrate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae.. J. Biol. Chem.* **267**, 16417-16423

Cox, G.F. y Davies, D.D. (1969) The effects of pH and citrate on the activity of nicotinamide-adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from pea mitochondria. *Biochem. J.* **113**, 813-827

Danson, M.J., y Wood, P.A. (1984) Isocitrate dehydrogenase of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulpholobus acidocaldarius*. *FEBS lett.* **172**, 289-293

Datta,N., Hedges,R.W., Shaw,E.J., Sykes,R.B. y Richmond, M.H. (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **108**, 1244-1249.

Dean, A.M., y Koshland, D.E., Jr. (1990) Electrostatic and steric contributions to regulations at the active site of isocitrate dehydrogenases. *Science* **249**, 1044-1046.

Devereux, J., Haeberli, P., y Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequences analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res*, **12** 387-395

Eguchi, H., Wakagi, T., y Oshima. T. (1989) A highly stable NADP-isocitrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB 8. *Biochim. Biophys. Acta* **990**, 133-137

Elhai, J., y Wolk, C. P. (1988a) A versatile clas of positive-selection vertors based

on the nonviability of palindrome containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**, 119-138

Elhai, J., y Wolk, C. P. (1988b) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**, 747-754

Farrell, H.M.,Jr. (1980) Purification and properties of NADP:isocitrate dehydrogenase from lactating bovine mammary gland. *Arch. Biochem. Biophys.* **204**, 551-559

Fatania, H., Al-Nassar,K.E. y Sidhan, V. (1993) Purification and partial characterisation of NADP-linked isocitrate dehydrogenase from rat liver cytosol. *FEBS lett.***1**, 57-60

Fay, P., Stewart, W.D.P., Walsby, A.E., y Fogg, G.E. (1968) Is the heterocyst the site of nitrogen fixation in blue-green algae? *Nature*, 220, 810-812.

Florencio, F. J. y J. L. Ramos (1985) Purification and characterization of glutamine synthetase from the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **838**, 39-48.

Flores, E., y Muro-Pastor, A.M. (1990) Mutation and kinetic analysis of basic amino acid transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **154**, 521-527

Flores, E., y Muro-Pastor, M. I. (1988) Uptake of glutamine and glutamate by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 127-130

Floriano, B., Herrero, A., y Flores, E. (1992) Isolation of arginine auxotrophs, cloning by mutant complementation and sequence analysis of the *argC* gene from the cyanobacterium *Anabaena* species PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **6**, 2085-2094

Friga, G. M., y Farkas, G. L. (1981) Isolation and properties of an isocitrate dehydrogenase from *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* **129**, 331-334

Fukunaga, N., Yoshida, S., Ishii, A., Imagawa, S., Takada, Y. y Sasaki, S. (1988) Isolation and characterization of a mutant defective in one of two isozymes of the isocitrate dehydrogenase fron a psychrophilic bacterium *Vibrio* sp. strain ABE-1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **34**, 457-465

Garnak, M., y Reeves, H.C. (1979) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli. *Science* **203**, 1111-1112

Garnier, J., D. J. Osguthorpe y B. Robson (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**, 97-120.

Gay,P., Le Coq,D., Steinmetz,M., Berkelman,T. y Kado,C.I. (1985) Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **164**, 918-921

Gay,P., Le Coq,D., Steinmetz,M., Ferrari,E. y Hoch,J.A. (1983) Cloning structural gene sacB, which codes for exoenzyme levansucrase of Bacillus subtilis: expression of the gene in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **153**, 1424-1431

Giorgio, N.A., Yip, J.A.T., Fleming, J. y Plaut, G.W.E. (1970) Diphosphopyridine nucleotide-linked isocitrate dehydrogenase from bovine heart. *J. Biol. Chem.* **245**, 5469-5477

Giovannoni,S.J., Turner,S., Olsen,G.J., Barns,S., Lane,D.J. y Pace,N.R. (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**, 3584-3592

Gonzalez-Villaseñor, L.I. y Powers, D.A. (1986) A multilocus system for studying tissue and subcellular specialization. The pH and temperature dependence of the two major NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isozymes of the fish *Fundulus heteroclitus*. *J. Biol. Chem.* **261**, 11471-11477

Greenfield, S., y Claus, G.W. (1969) Isocitrate Dehydrogenase and Glutamate Synthesis in *Acetobacter suboxydans*. *J. Bacteriol.* **100**, 1264-1270

Grigorieva, G. y S. Shestakov (1982) Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**, 367-370.

Gunsalus, R.P. (1992) Control of electron flow in *Escherichia coli* : coordinated transcription of respiratory pathway genes. *J. Bacteriol.* **174**, 7069-7074

Hampton, M.L. y Hanson, R.S. (1969) Regulation of isocitrate dehydrogenase from *Thiobacillus thiooxidans* and *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 296-305

Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580

Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of E. coli. En DNA cloning, vol. 1 (D. M. Glover, ed.) IRL Press, Oxford.

Haselbeck, R. J., Colman, R. F., y McAlister-Henn, L. (1992) Isolation and sequence of a cDNA encoding porcine mitochondrial NADP-specific isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry* **31**, 6219-6223

Haselbeck, R.J., y McAlister-Henn,L. (1991) Isolation, nucleotide sequence and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* encoding mitochondrial NADP(H)-specific Isolation and sequence of a cDNA encoding porcine mitochondrial NADP-specific isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **266**, 2339-2345

Haselkorn, R., y Buikema, J. (1992) Nitrogen fixation in cyanobacteria. In *Biological Nitrogen Fixation* (Stacey, G., Burris, R.H. y Evans, H.J., eds) pp 166-190 Chapman & Hall, New York, London

Hathaway, J.A. y Atkinson, D.E. (1963) The effect by adenylic acid on yeast nicotinamide adenine dinucleotide isocitrate dehydrogenase. A possible metabolic control mechanism. *J. Biol. Chem.* **238**, 2875-2881

Henikoff,S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene **28**, 351-359

Herdman, M., Delaney, S.F. y Carr, N. G. (1973) A new medium for the isolation and grow of auxotrophic mutant of the blue green alga *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **79**, 233-237

Holland, D., y Wolk, C. P. Identification and characterization of hetA, a gene that acts early in the process of morphological differentiation of heterocysts. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 3131-3137

Holmes,D.S. y Quigley,M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197

Huh, T.-L., Ryu, J.-H., Huh, J.-W., Sung, H.-C., Oh, I.-U., Song, B.J., y Veech, R.L. (1993) Cloning of a cDNA encoding bovine mitochondrial $NADP^+$-specific isocitrate dehydrogenase and structural comparison with its isoenzymes

from different species. *Biochem. J.* **292**, 705-710

Hurley, J.H., Dean, A. M., Koshland, D. E. Jr., y Stroud, R. M. (1991) Catalytic mechanism of $NADP^+$-isocitrate dehydrogenase: implications from the structure of magnesium-isocitrate and $NADP^+$ complexes. *Biochemistry.* **30**, 8671-8678

Hurley, J.H., Dean, A. M., Solh, J. L., Koshland, D. E. Jr., y Stroud, R. M. (1990) Regulation of an enzyme by phosphorylation at the active site. *Science* **249**, 1012-1016

Hurley, J.H., Thorsness, P.E., Ramalingam,V., Helmers,N.H., Koshland, D. E., Jr., y Stroud, R.M. (1989) Structure of a bacterial enzyme regulated by phosphorylation, isocitrate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **86**, 8635-8639

Ihlenfeldt, M.J.A., y Gibson, J. (1975) CO_2 fixation and its regulation in *Anacystis nidulans (Synechococcus). Arch. Microbiol.* **102**, 13-21

Ishii, A., Ochiai, T., Imagawa, S. , Fukunaga, N., Sasaki, S., Minowa, O., Mizuno, Y. y Shiokawa, H. (1987) Isozymes of Isocitrate dehydrogenase from an obligately psychrophilic bacterium, *Vibrio* sp. strain ABE-1: purification, and modulation of activities by growth conditions. *J. Biochem.* **102**, 1489-1498

Iuchi, S., y Lin, C.C. (1988) *ArcA* (*dye*), a global regulatory gene in Escherichia coli mediating repression of enzyme in aerobic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **85**, 1888-1892

Jackson, F.A. y Dawes, E. (1976) Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly-b-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *J. Gen. Microbiol.* **97**, 303-312

Jennings, G.T., Willoughby, J. y Stevenson, P.M. (1990) Purification and properties of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the corpus luteum. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 219-227

Karni, L., y Tel-Or, E (1983) Isocitrate dehydrogenase as a potential electron donor to nitrogenase of *Nostoc muscorum.* En *Photosynthetic prokaryotes.* (Papageorgiou, G.C. y Packer, L., eds) pp 257-264, Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam, Oxford.

Kyte,J. y Doolittle,R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132

Labarre, J., F. Chauvat y P. Thuriaux (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J, Bacteriol.* **171**, 3449-3457.

Labarre,J., Thuriaux, P., y Chauvat, F. (1987) Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. *J. Bacteriol.* **169**, 4668-4673

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685

Lakshmi, T.M., y Helling, R.B. (1976) Selection of citrate synthase deficiency in *icd* mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **127**, 76-83

Laporte, D.C. (1993) The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: regulation and enzymology. *J. Cell Biochem.* **51**, 14-18

Laporte, D.C. y Ikeda, T.P. (1991) The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: enzymology and regulation. *Adv. Prot. Phosphatases* **6**, 347-374

Laporte, D.C. y Koshland, D. E., Jr. (1982) A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation of tricarboxylic acid cycle. *Nature* **300**, 458-460

Lawrie, A.C., Codd, G.A. y Stewart, D.P. (1976) The incorporation of nitrogen into products of photosynthesis in *Anabaena cylindrica* Lemm.*Arch. Microbiol.* **107**, 15-24

Leyland, M. L., y Kelly, D. J. (1991) Purification and characterization of a monomeric isocitrate dehydrogenase with dual coenzyme from the photosynthetic bacterium *Rhodomicrobium vannielii*. *Eur. J. Biochem* **202**, 85-93

Ligon,P.J.B., Meyer,K.G., Martin, J.A. y Curtis, S.E. (1991) Nucleotide sequence of a 16S rRNA gene from *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Nucl. Acids Res.* **19**, 4553

Linden, H., Vioque, A., y Sandmann, G. (1993) Isolation of a carotenoid biosynthesis gene coding for z-carotene desaturase from *Anabaena* PCC 7120 by heterologous complementation. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**, 99-104

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275

MacKinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solution. *J. Biol. Chem.* **140**, 315-322

Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L. y Tolbert, N.E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**, 206-210

Marqués, S., F. J. Florencio y P. Candau (1992) Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur. J. Biochem.* **206**, 69-77

Martínez-Rivas, J.M. y Vega, J.M. (1993) Effect of culture conditions on the isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase activities in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant* **88**, 599-603

Mazel, D., Houmard, J., Castets, A. M., y Tandeau de Marsac, N. (1990) Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *J. Bacteriol.* **172**, 2755-2761

McDermott, T. R., y Kahn, M. L. (1992) Cloning and mutagenesis of the *Rhizobium meliloti* isocitrate dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.* **174**, 4790-4797

McIntosh, C.A. y Oliver, D.J. (1992) NAD^+-linked isocitrate dehydrogenase: isolation and characterization of the protein from pea mitochondria. *Plant Physiol.* **100**, 69-75

Meeks, J.C., Wolk, C.P., Lockau, W., Schilling, N., Shaffer, P.W. y Chien, W.S. (1978) Pathways of assimilation of $[^{13}N]N_2$ and $^{13}NH_4$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.* **134**, 125-130

Meeks, J.C., Wolk, C.P., Thomas, J., Lockau, W., Shaffer, P.W., Austin, M.A., Chien, W.S. y Galonsky, A. (1977) The pathways of assimilation of $^{13}NH^+_4$ by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* **252**, 7894-7900

Meissner, P.S., Sisk, W.P. y Berman, M.L. (1987) Bacteriophage l cloning system for the construction of directional cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 4171

Meixner-Monori, B., KubiceK, C. P., Harrer, W., Schreferl, G. y Rohr, M. (1986) NADP-specific isocitrate dehydrogenase from the citric acid-accumulating fungus *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* **236**, 549-557

Menacho, A. y Vega, J.M. (1989) Effect of nitrogen starvation on ammonium assimilation by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol. Plant.* **75**, 285-289

Mérida, A., Candau, P. y Florencio, F. J. (1991) Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium. *J. Bacteriol.* **173**, 4095-4100

Mérida, A., Leurentop, L., Candau, P. y Florencio, F.J. (1990) Purification and properties of glutamine synthetase from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain PCC 7601. *J. Bacteriol.* **172**, 4732-4735

Mitsui,A., Kumazawa,S., Takahashi,A., Ikemoto,H., Cao,S. y Arai,T. (1986) Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* **323**, 720-722

Miyazaki, K., Eguchi, H., Yamagishi, A., Wakagi, T., y Oshima, T. (1992) Molecular cloning of the isocitrate dehydrogenase gene of an extreme termophile, *Thermus thermophilus* HB8. *Appl. Environ. Biol.* **58**, 93-98

Mohamed, A. y Jansson, C. (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol. Biol.* **13**, 693-700

Morden, C. W. y S. S. Golden (1991) Sequence analysis and phylogenetic reconstruction of the genes encoding the large and small subunits of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the chlorophyll *b*-containing prokaryote *Prochlorothrix hollandica*. *J. Mol. Evol.* **32**, 379-395.

Mulligan, M. E., y Haselkorn, R. (1989) Nitrogen fixation (nif) genes of the cyanobacterium Anabaena species strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **264**, *19200-19207*

Muro-Pastor, A.M., Flores, E. Herrero, A. y Wolk, C.P.(1992) Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease fron the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **6**, 3021-3030

Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., y Smith, D. F. (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.* **119**, 736-747

Neuer, G., Papen, H., Bothe, H. (1983) Heterocyst biochemistry and differentiation. En *Photosynthetic prokaryotes.* (Papageorgiou, G.C. y Packer, L., eds) pp 219-242, Elsevier Biomedical, New York, Amsterdam, Oxford.

Neuer, G., y Bothe, H. (1982) The pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica. Biochim. Biophys. Acta* **716**, 358-365

Novotny, J.N. y Perry, J.J. (1991) Characterization of a heat-stable NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the obligate thermophile *Thermoleophilum minutum* YS-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 461-465

Ohmori, M., Satoh, Y. y Urata, K. (1989) Light-induced accumulation of lactate and succinate in Anabaena cylindrica. *Arch. Microbiol.* **151**, 101-104

Omran, R.G. y Dennis, D.D. (1971) Nicotinamide dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase from higher plant. *Plant Physiol.* **47**, 43-47

Orr, J., Keefer, L.M., Keim, P., Nguyen, T.D., Wellems, T., Heinrikson, R.L. y Haselkorn, R. (1981) Purification, physical characterization and NH_2-terminal sequence of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **256**, 13091-13098

Papen, H., Neuer, G., Refaian, M., y Bothe, H. (1983) The isocitrate dehydrogenase in cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **134**, 73-79

Parsot, C., y Mazel, D. (1987) Cloning and nucleotide sequence of the *thrB* gene from the cyanobacterium Calothrix PCC 7601. *Mol Microbiol* **1**, 45-52

Pearce, J., Leach, C. K., y Carr, N. G. (1969) The incomplete tricarboxilic acid cycle in the Blue-green alga *Anabaena variabilis. J. Gen. Microbiol.* **55**, 371-378

Pearson,W.R. y Lipman,D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **85**, 2444-2448

Popjak, G. (1970) Stereospecifity of Enzymic reactions. En *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.). Vol II, pp 115-215, Acasemic Press, New York.

Portis, A. R., Chon, C. J., Mosbach, A., y Heldt, H. W. (1977) Fructose-and sedoheptulosebisphosphatase. The sites of a possible control of CO_2 fixation by light-dependent changes of the stromal Mg^{2+} concentration. *Biochim. Biophys. Acta* **461**, 313-325

Raleigh, E. A., N. E. Murray, H. Revel, R. M. Blumenthal, D. Westaway, A. D. Reith, P. W. Rigby, J. Elhai y D. Hanahan (1988) McrA and McrB restriction phenotypes of some *E. coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1563-1575.

Reeves, H. C., Danmy, G. O.,Chen, C. L., y Houston, M. (1972) NADP-specific isocitrate dehydrogenase of Escherichia coli. Purification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* **258**, 27-39

Ried,J.L. y Collmer,A. (1987) An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene* 57, 239-246

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herman, M. , y Stanier, R. Y. (1979) Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobaceria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1-61

Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J., y Reeves, H. C. (1987) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290-294

Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 74, 5463-5467

Satoh, Y. y Nakamura, Y. (1984) Characteristics of the reverse reaction of NADP+-isocitrate dehydrogenase from castor bean seeds. *Physiol. Plant.* **62**, 561-565

Seelig, G. F. & Colman, R. F. (1978) Characterization of the physicochemical and catalytic properties of human heart NADP-dependent isocitrate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **188**, 394-409

Sherman, L., T. Bricker, J. Guikema y H. Pakrasi (1987) The protein composition of the photosynthetic complexes from the cyanobacterial thylakoid membrane. En *The cyanobacteria* (P. Fay y C. Van Baalen, eds.), pp. 1-33. Elsevier, Amsterdam.

Shorrosh, B.S., y Dixon, R. A. (1992) Molecular characterization and expression of an isocitrate dehydrogenase from alfalfa (M*edicago sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* **20**, 801-807

Smith, A. J. (1982) Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En The biology of cyanobacteria (N. G. Carr y B. A. Whitton, eds.) pp. 47-85. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Sprang, S.R., Acharya, K.R., Goldsmith, E.J. Stuart, D.I. Varvill, K., Fletterick, R.J. Madsen, N.B. y Johnson, L.N. (1988) Structural changes in glycogen phosphorylase induced by phosphorylation. *Nature* **336**, 215-221

Stanier, R. Y., y Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.***31**, 225- 274

Stueland, C.S., Ikeda, T.P. y Laporte, D.C. (1989) Mutation of the predicted ATP binding site inactivates both activities of isocitrate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**, 13775-13779

Tandeau de Marsac, N. y J. Houmard (1987) Advances in cyanobacterial molecular genetics. En The cyanobacteria (P. Fay y C. Van Baalen, eds.), pp. 251-302. Elsevier, Amsterdam.

Tezuka, T. y Laties, G.G. (1983) Isolation and characterization of inner membrane-associated and matrix NAD-specific isocitrate dehydrogenase in potato mitochondria. *Plant Physiol.* **72**, 959-963

Thorness, P.E., y Koshland, D. E., Jr. (1987) Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate. *J. Biol. Chem.* **262**, 10422-10425

Thomson, S.T., Cass, K.H. and Stellwagen, E. (1975) Blue Dextran-Sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **72**, 669-672

Thomson, S.T. and Stellwagen, E. (1976) Binding of Cibacron blue F3GA to proteins containing the dinucleotide fold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. **73**, 361-365

Udvardi, M.K., McDermott, T.R., y Kahn, M.L. (1993) Isolation and characterization of a cDNA encoding NADP+-specific isocitrate dehydrogenase from soybean (*Glycine max*). *Plant Mol. Biol.* **21**, 739-752

Vasquez, B. y Reeves, H.C. (1979) NADP-specific isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. IV Purification by chromatografy on affi-gel blue. *Biochim. Biophys. Acta* **578**, 31-40

Vidal, J., Godbillon,G. y Gadal, P. (1980) Recovery of active , highly purified phosphoenolpyruvate carboxylase from specific immunoadsorbent column. *FEBS Lett.* **118**, 31-34

Villafranca, J.J. y Colman, R.F. (1972) Role of metal ions in reactions catalyzed by pig heart triphosphopyridine nucleotide-dependent isocitrate dehydrogenase I. Magnetic resonance and binding studies of the complexes of enzyme, manganous ions and substrates. *J. Biol. Chem.* **247**, 209-214

Vioque, A. (1992) Analysis of the gene encoding the RNA subunit of the ribonuclease O from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6331-6337

Wadano, A., Miura, K., Ihara, H., y Taniguchi, M. (1989) Purification and some properties of isocitrate dehydrogenase of a blowfly *Aldrichina grahami*. *Comp. Biochem. Physiol.* **94B**, 189-194

Wagner, S.J., Thomas, S.P., Kaufman, R.I., Nixon, B.T. and Stevens, Jr. S.E. (1993) The *glnA* gene of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 is nonessential for ammonium assimilation. *J. Bacteriol.* **175**, 604-612

Weathers, P.J. and Allen, M.M. (1978) Variations in short term products of inorganic carbon fixation in exponential and stationary phase culturesof Aphanocapsa 6308. Arch. Microbiol. **116**, 231-234

Williams, J. G. K. (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Methods Enzymol.* **167**, 766-778

Woese,C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-171

Wolk,C.P. (1982) Heterocysts. En *The biology of cyanobacteria*, (Carr,N.G. y Whitton,B.A., eds.), pp 359-386. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Wolk,C.P., Vonshak,A., Kehoe,P. y Elhai,J. (1984) Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from Escherichia coli to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **81**, 1561-1565

Yang, J.T., Wu, C.S.C. y Martinez, H.M. (1986) Calculations of Protein Conformation from Circular Dichroism. *Methods Enzymol.* **130**, 208-270

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal designado por la Comisión Permanente en sesión de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

Dña. MARIA ISABEL MUÑOZ PASTOR

titulada ISOCITRATO DESHIDROGENASA DE CIANOBACTERIAS: PURIFICACION, CARACTERIZACION Y CLONACION DEL GEN icd

acordó otorgarle la calificación de APTO cum laude

por unanimidad

Sevilla, 5 de NOVIEMBRE de 1993

El Vocal, El Vocal, El Vocal,

El Secretario, El Doctorado,

M.ª Isabel

500587003

FBI E TD-298 12743

587003