

T/807

i18059041

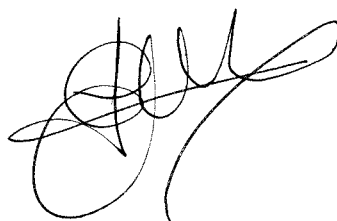
600031154

**ESTUDIO DEL GEN DE LA FERREDOXINA:GLUTAMATO SINTASA (*glsF*) DE
Anabaena sp. PCC 7120 Y DE LOS GENES DEL SISTEMA DE LAS
TIORREDOXINAS DE *Synechocystis* sp. PCC 6803**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias

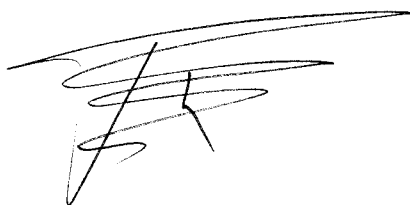
Biológicas por el Licenciado

Eugenio Martín Figueroa



Sevilla, febrero de 2001

Director:



Dr. F. Javier Florencio Bellido
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular

Universidad de Sevilla



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
REGISTRO DE LIBROS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio... 131... número... 222... del libro
correspondiente.

23 FEB. 2001
Sevilla,

El Jefe del Negociado.

P. D.



A mis padres,
A María

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular e Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (Centro mixto, Universidad de Sevilla-C.S.I.C.). Mi agradecimiento al Dr. Miguel García Guerrero, director del centro al comienzo de este trabajo, y a los Drs. F. Javier Florencio Bellido y Antonia Herrero Moreno, actuales directores.

Quiero agradecer al Dr. F. Javier Florencio la dirección de esta Tesis. Además de su continua colaboración en la aportación de ideas y en la discusión de los resultados, y sobre todo quiero agradecer su confianza, que ha posibilitado mi formación científica durante todo este tiempo.

A los Drs. Agustín Vioque, Pedro Candau, Manolo Hervás, Pepe Navarro y Mercedes Roncel, por la gran ayuda que me han prestado al atender siempre a mis dudas.

A mis compañeros de trabajo, muchos de ellos ya Doctores como; Miguel Ángel Vega-Palas, Jesús de la Cruz, Ana Peciña, Alberto Pascual, M^a José Quintero, Maribel Muro, José Carlos Reyes, Cristina Ravina, M^a Félix Vázquez y Mario García, más que por ninguna otra cosa por su gran amistad. Y a los que están en vías de serlo, como Cristina Tous, José Manuel Lucena, M^a Jesús Fernández, María Ceballos, Marta Roche, Luis López, José Antonio del Campo y Rosario Gómez, por el mismo y para mí más importante motivo, su amistad. A las "Anas" Lindahl y Valladares, por la ayuda que han aportado en la obtención de algunos de los resultados obtenidos en este trabajo. Y a M^a José Figueroa porque su ayuda también ha sido fundamental.

Muy especialmente quiero mostrar mi agradecimiento a Paco Navarro, ya que no sólo fue mi maestro directo en los primeros y también en los segundos pasos dados en este Departamento, sino porque ha sido uno de mis grandes amigos y un buen ejemplo a seguir por todos aquellos que deseen dedicarse a algo tan "particular" como es la Ciencia. También quiero mostrar especialmente mi agradecimiento a José Luis Crespo, que junto a Paco ha sido uno de los más firmes apoyos que he tenido durante la realización de esta Tesis y que espero poder seguir teniendo en el futuro.

A Pepa, Antonia, Reyes y más recientemente a Carmen, por ayudarme siempre en la resolución de los problemas burocráticos, muchas veces bastante difíciles.

Quiero agradecer a la Dra. Maria Antonietta Vanoni y a todos los miembros de su grupo en especial a la Dra. Paola Morandi, el cálido acogimiento recibido durante las dos estancias que he realizado en el Dipartimento de Fisiologia e Biochimica Generali. Sezione de Chimica Biologica. Università degli Studi di Milano (Italia). A todos mi más sincero agradecimiento.

La financiación de este trabajo se ha realizado a cargo de los proyectos DGICYT PB94-1444 (1995/98) y DGICYT PB97-0732 (1998/2001) de la DGEIC (España) y de la Junta de Andalucía (Grupo CVI-0112), y ha sido posible gracias a la concesión de una beca para la realización de Tesis Doctorales, en sus modalidades A y B (1997 y 1998) de la Fundación Caja de Madrid (España) y a contratos de corta duración con cargo al proyecto CVI-0112 de la Junta de Andalucía.

ÍNDICE GENERAL

	página
ÍNDICE GENERAL	9
ÍNDICE DE FIGURAS	14
ÍNDICE DE TABLAS	16
ABREVIATURAS	17
1. INTRODUCCIÓN	20
1.1. Las cianobacterias	21
1.1.1. Características generales de las cianobacterias	21
1.1.2. Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias	23
1.1.3. El sistema ferredoxina-tiorredoxina reductasa: tiorredoxina en cianobacterias	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1. Organismos y condiciones de cultivo	38
2.1.1. Cianobacterias	38
2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas.	38
2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo de cianobacterias.	38
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	40
2.1.2.1. Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.	40
2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo de <i>Escherichia coli</i> .	41
2.1.3. Métodos de recogida de células	41
2.2. Determinación de actividades enzimáticas	42
2.2.1. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad glutamato sintasa	42
2.2.1.2. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad glutamato sintasa usando ferredoxina como donador de electrones.	42
2.2.2. Determinación de la actividad glutamina sintetasa	42
2.2.2.1. Ensayo de la actividad transferasa de la glutamina sintetasa.	42
2.2.3. Determinación de la actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa	43
2.2.3.1. Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa.	43

	página
2.3. Métodos de purificación y análisis de proteínas	43
2.3.1. Aislamiento de heterocistos de <i>Anabaena</i> 7120	43
2.3.2. Aislamiento de membranas tilacoidales de <i>Synechocystis</i> 6803	44
2.3.3. Expresión de proteínas en <i>E. coli</i> desde el vector pET-3a	45
2.3.4. Preparación de extractos celulares	45
2.3.4.1. Rotura por ultrasonidos.	45
2.3.4.2. Rotura con perlas de vidrio.	46
2.3.4.3. Rotura con nitrógeno líquido.	46
2.3.5. Cuantificación de proteínas por los métodos de Bradford y Lowry	47
2.3.6. Fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio	47
2.3.7. Técnicas cromatográficas usadas en la purificación de la tiorredoxina TrxA de <i>Synechocystis</i> 6803	47
2.3.7.1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE- <i>Sephacel</i> .	47
2.3.7.2. Cromatografía de filtración en gel <i>Sephacryl</i> S-200.	48
2.3.8. Diálisis y cambio de tampones por filtración rápida	48
2.3.9. Concentración de proteínas por ultrafiltración	48
2.3.10. Electroforesis y tinción de proteínas	48
2.3.12. Técnicas inmunológicas	49
2.3.12.1. Obtención de suero de conejo contra la tiorredoxina TrxA de <i>Synechocystis</i> .	49
2.3.12.2. Inmunodetección de proteínas mediante <i>western blot</i> .	50
2.4. Métodos de manipulación y análisis de DNA y RNA	50
2.4.1. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados	50
2.4.2. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	54
2.4.3. Aislamiento de DNA total de cianobacterias	54
2.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
2.4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	55
2.4.6. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa	55
2.4.7. Construcción de una genoteca parcial de DNA genómico	56
2.4.8. Marcaje radiactivo de moléculas de DNA	56
2.4.9. Detección de fragmentos de DNA mediante <i>Southern blot</i>	57
2.4.10. Secuenciación de DNA	58
2.4.11. Manipulaciones enzimáticas del DNA	59

	página
2.4.12. Transformación de células de <i>E. coli</i> con plásmidos	59
2.4.13. Transformación de células de <i>Synechocystis</i> 6803	60
2.4.14. Cuantificación de DNA y RNA	61
2.4.15. Aislamiento de RNA total de cianobacteria	61
2.4.15.1. Aislamiento de RNA total de células de <i>Synechocystis</i> 6803 y de células vegetativas de <i>Anabaena</i> 7120.	61
2.4.15.2. Aislamiento de RNA total heterocistos de <i>Anabaena</i> 7120.	62
2.4.16. Detección de mRNAs mediante <i>northern blot</i>	62
2.4.17. Determinación de las vidas medias específicas de los mRNA	63
2.5. OTROS MÉTODOS	63
2.5.1. Determinación de clorofila	63
2.5.2. Medidas espectrofotométricas	64
2.5.3. Determinación de ficobiliproteínas, ficocianina y ficoeritrina	64
2.5.4. Determinación de la tasa de desprendimiento de oxígeno	64
2.5.5. Tratamiento informático de secuencias de DNA y proteínas	64
3. RESULTADOS	66
3.1. La glutamato sintasa de la cianobacteria <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	67
3.1.1. Clonación y secuencia del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	67
3.1.2. Regulación de la actividad Fd-GOGAT por la fuente de nitrógeno en <i>Anabaena</i> 7120	72
3.1.3. Inmunodetección de Fd-GOGAT en extractos libres de células de <i>Anabaena</i> 7120	73
3.1.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión del gen <i>glsF</i> en células vegetativas y en heterocistos de <i>Anabaena</i> 7120	74
3.2. Las tiorredoxinas de la cianobacteria <i>Synechocystis</i> sp PCC 6803	76
3.2.1. Clonación de los genes que codifican tiorredoxinas y de los genes que codifican la ferredoxina-tiorredoxina reductasa en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	76
3.2.2. Regulación transcripcional de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i>	79
3.2.2.1. Efecto de los cambios luz-oscuridad y de la glucosa sobre los niveles de los mRNA de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> .	79
3.2.2.2. Efecto de inhibidores de la fotosíntesis sobre los niveles de mRNA de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> .	86

	página
3.2.2.3. Efecto de la adición de agentes oxidantes sobre los niveles de los mRNA de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> y <i>trxC</i> de <i>Synechocystis</i> 6803.	88
3.2.3. Purificación y obtención de anticuerpos de la proteína TrxA de <i>Synechocystis</i> 6803	90
3.2.3.1. Purificación de la proteína TrxA.	90
3.2.3.2. Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína TrxA.	91
3.2.4. Generación de mutantes de los genes <i>trxB</i>, <i>trxC</i> y <i>trxQ</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	92
3.2.5. Caracterización de las estirpes STXB1, STXC1 y STXQ1 de <i>Synechocystis</i> 6803	94
3.2.5.1. Análisis de la tasa de crecimiento y de la velocidad del desprendimiento de oxígeno.	94
3.2.5.2. Estudio de la tasa de crecimiento de la estirpe STXC1 bajo distintas intensidades de luz.	97
3.2.5.3. Análisis de la expresión de los genes <i>psbA</i> en las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803.	102
3.2.5.4. Inmunodetección de la proteína D1 en las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803.	105
3.2.5.5. Análisis de los niveles de mRNA de los genes <i>psaA</i> , <i>psaB</i> y <i>psaC</i> de las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803.	106
3.2.5.6. Estudio de los niveles de proteínas del PSI en las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803.	107
3.2.6. Generación de mutantes del gen <i>trxA</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	109
3.2.6.1. Construcción de la estirpe mutante STXA1 de <i>Synechocystis</i> 6803.	109
3.2.6.2. Caracterización de la estirpe mutante STXA1 de <i>Synechocystis</i> 6803.	112
4. DISCUSIÓN	121
4.1. La glutamato sintasa de la cianobacteria <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	122
4.1.1. Clonación y caracterización del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> 7120	122
4.1.2. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína GlSF de <i>Anabaena</i> 7120	123
4.1.3. Caracterización de la actividad Fd-GOGAT en <i>Anabaena</i> 7120	124
4.1.4. Análisis de la presencia de Fd-GOGAT en heterocistos de <i>Anabaena</i> 7120	124
4.2. Las tiorredoxinas de la cianobacteria <i>Synechocystis</i> sp PCC 6803	127
4.2.1. Existencia de distintos genes que codifican tiorredoxinas en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	127

	página
4.2.2. Análisis de la expresión de los genes <i>trxA</i>, <i>trxB</i>, <i>trxC</i>, <i>trxQ</i>, <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	129
4.2.2.1. Regulación a nivel transcripcional de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> , en respuesta a los cambios luz-oscuridad.	129
4.2.2.2. Expresión diferencial de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> , en respuesta a agentes oxidantes.	131
4.2.3. Generación y caracterización de estirpes mutantes de los genes <i>trxB</i>, <i>trxC</i> y <i>trxQ</i>	133
4.2.4. Generación y caracterización de mutantes del gen <i>trxA</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	138
5. CONCLUSIONES	143
6. BIBLIOGRAFÍA	145

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Esquema de las principales rutas metabólicas de asimilación de nitrógeno y carbono en cianobacterias y su interconexión con el proceso fotosintético.	24
Figura 2. Clonación del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> 7120	68
Figura 3. Secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA de <i>Anabaena</i> que contiene el gen <i>glsF</i>	
Figura 4. Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GlSF	70
Figura 5. Inmunodetección de Fd-GOGAT, GS e IDH, en extractos crudos de células vegetativas o en heterocistos de <i>Anabaena</i> 7120	
Figura 6. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de mRNA de los genes <i>glsF</i> , <i>rbcL</i> , <i>nifH</i> , <i>glnA</i> e <i>icd</i> en <i>Anabaena</i> 7120	75
Figura 7. Análisis de la secuencia de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> y <i>trxQ</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	77
Figura 8. Efecto de los cambios luz-oscuridad y de la glucosa sobre la expresión de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	80
Figura 9. Efecto de las transiciones luz-oscuridad sobre la expresión de los genes del sistema ferredoxina-tiorredoxina reductasa:tiorredoxina.	81
Figura 10. Evolución de los niveles de transcrito de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> de <i>Synechocystis</i> 6803 en la oscuridad	83
Figura 11. Efecto de la oscuridad en la estabilidad de los transcritos de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	84
Figura 12. Niveles de mRNA de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i> tras la adición de los inhibidores fotosintéticos DCMU y DBMIB	85
Figura 13. Efecto de los inhibidores fotosintéticos DCMU y DBMIB y de la glucosa sobre la expresión de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> , <i>ftrC</i> y <i>ftrV</i>	87
Figura 14. Efecto de la menadiona y del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de los genes <i>trxA</i> , <i>trxB</i> , <i>trxC</i> , <i>trxQ</i> y <i>ftrC</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	89
Figura 15. Patrones electroforéticos de proteínas de las distintas etapas de purificación de la proteína TrxA recombinante	91
Figura 16. Inmunodetección de la proteína TrxA en extractos crudos de células de <i>Synechocystis</i> cultivadas en distintas condiciones	91
Figura 17. Análisis de la estructura de la región cromosómica de los genes <i>trxB</i> , <i>trxC</i> y <i>trxQ</i> en la estirpe silvestre y en las estirpes mutantes de <i>Synechocystis</i> 6803	93
Figura 18. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes STXB1, STXC1 y STXQ1 y de la estirpe silvestre de <i>Synechocystis</i> 6803	95
Figura 19. Cultivos de las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803 creciendo bajo distintas intensidades de luz	98

	página
Figura 20. Curvas de crecimiento de las estirpes silvestre y STXC1 concentración de clorofila en los cultivos sometidas a distintas intensidades de luz, representadas como	99
Figura 21. Curvas de crecimiento de las estirpes silvestre y STXC1 cultivadas a distintas intensidades de luz, representadas como concentración de proteína total en los cultivos	100
Figura 22. Niveles de transcrito de los genes <i>trxC</i> y <i>psbA</i> en las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803 cultivadas a una intensidad de luz de 10 ó 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	103
Figura 23. Vidas medias de los transcritos de los genes <i>psbA</i> en las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803	104
Figura 24. Inmunodetección de la proteína D1 en membranas tilacoidales de células de las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803	105
Figura 25. Niveles de transcrito de los genes <i>psaA-B</i> y <i>psaC</i> en las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803	107
Figura 26. Inmunodetección de polipéptidos del complejo PSI en membranas tilacoidales aisladas de células de las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803	108
Figura 27. Análisis de la estructura de la región cromosómica del gen <i>trxA</i> , en las estirpes silvestre y STXA1 de <i>Synechocystis</i> 6803	111
Figura 28. Evolución de los niveles de transcrito de los genes <i>trxA</i> , <i>petJ</i> y <i>petE</i> tras la adición de CuSO_4 5 μM	112
Figura 29. Efecto de la adición de CuSO_4 5 μM en los niveles de mRNA del gen <i>trxA</i> en la estirpe STXA1	114
Figura 30. Niveles de transcrito de los genes <i>trxA</i> , <i>petJ</i> y <i>petE</i> y del operón <i>mssA</i> en las estirpes silvestre y STXA1.2 tras la adición de CuSO_4 5 μM	115
Figura 31. Inmunodetección de la proteína TrxA en extractos crudos de las estirpes silvestre y STXA1.2 de <i>Synechocystis</i> 6803	116
Figura 32. Hibridación mediante <i>Southern blot</i> de los DNA genómicos de estirpes silvestre, STXA1.2 y STXA2 de <i>Synechocystis</i> 6803, con la sonda del gen <i>trxA</i>	118
Figura 33. Efecto de la adición de CuSO_4 5 μM sobre los niveles de mRNA de los genes <i>trxA</i> , <i>petJ</i> y <i>petE</i> en las estirpes silvestre y STXA2	119
Figura 34. Esquema de las rutas metabólicas propuestas para los metabolismos del carbono y del nitrógeno en el heterocisto	126
Figura 35. Dendrograma representativo de las relaciones de identidad entre diferentes secuencias de tiorredoxinas	128

ÍNDICE DE TABLAS

	página
Tabla 1. Estirpes silvestres de cianobacterias utilizadas en este trabajo.	38
Tabla 2. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	41
Tabla 3. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.	51
Tabla 4. Plásmidos construidos en este trabajo conteniendo DNA de <i>Anabaena</i> 7120.	51
Tabla 5. Plásmidos construidos en este trabajo conteniendo DNA de <i>Synechocystis</i> 6803.	52
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo sobre DNA de <i>Anabaena</i> .	53
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo sobre DNA de <i>Synechocystis</i> .	53
Tabla 8. Niveles de actividad Fd-GOGAT, GS y NADP-IDH en <i>Anabaena</i> 7120	72
Tabla 9. Velocidad de desprendimiento de oxígeno de las estirpes STXB1, STXC1, STXQ1 y silvestre de <i>Synechocystis</i> 6803	96
Tabla 10. Concentración de ficobiliproteínas; ficocianina y aloficocianina, en células de las estirpes silvestre y STXC1 de <i>Synechocystis</i> 6803 cultivadas bajo 10 o 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz	101

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
Ap	Ampicilina
Ap ^r	Resistencia a la ampicilina
ATP	Trifosfato de adenosina
Chl	Clorofila
Cm	Cloramfenicol
Cm ^r	Resistencia al cloramfenicol
cpm	Cuentas por minuto (unidad de radiactividad)
CTP	Trifosfato de citidina
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DBMIB	2,5-Dibromo-3-metil-6-isopropil- <i>p</i> -benzoquinona
DCMU	3-(3,4-Diclorofenil)-1,1-dimetilurea
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
DEAE	Dietilaminoetil
DEPC	Dietil pirocarbonato
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
dNTP	Mezcla de los 4 desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
DTTred	Ditiotreitol reducido
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
etidio	3, 8-Diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
Fd	Ferredoxina
Fdox	Ferredoxina oxidada
Fdred	Ferredoxina reducida
<i>g</i>	Aceleración de la gravedad terrestre
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
GTP	Trifosfato de guanosina
h	Hora

HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Miles de pares de bases
kDa	Kilodaltons
Km	Kanamicina
Km ^r	Resistencia a la kanamicina
Mb	Millones de pares de bases
min	Minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MTA	Mezcla de bromuros de alquil-trimetilamonio
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido
Nar	Nitrato reductasa
Nir	Nitrito reductasa
OPA	<i>o</i> -Ftaldialdehído
ORF	Pauta abierta de lectura
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso /volumen
pb	Pares de bases
pBS	Plásmido pBluescript II SK(+)
PCC	Colección de cultivos del Instituto Pasteur (París)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
sp.	Especie
SDS	Laurilsulfato sódico
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
U	Unidad de actividad enzimática
v/v	Relación volumen/volumen
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Bases nitrogenadas

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timina

Aminoácidos

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

1. INTRODUCCIÓN



1.1. Las cianobacterias

1.1.1. Características generales de las cianobacterias

Las cianobacterias constituyen el único grupo de organismos procariotas capaz de llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica similar a la que realizan las plantas superiores (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Blankenship, 1992), contribuyendo de forma considerable a la productividad primaria de la Biosfera. Las cianobacterias ocupan hábitats muy diversos, encontrándose en aguas oceánicas y continentales, en suelos, y en ambientes extremos como desiertos y fuentes termales (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993). Aunque las proclorofitas, consideradas actualmente como cianobacterias, poseen clorofila *b* como los cloroplastos (Burger-Wiersman y Post, 1989; Morden y Golden, 1991), sin embargo, el resto de las cianobacterias carecen de ésta y presentan pigmentos antena alternativos denominados ficobiliproteínas (Sherman *et al.*, 1987) los cuales aparecen también en los cloroplastos de algas rojas (Wolfe *et al.*, 1994).

El origen de las cianobacterias se remonta al Precámbrico, hace 3500 millones de años, siendo de cianobacterias los restos fósiles de organismos más antiguos que se conocen (Schopf, 1993), probablemente fue en este grupo biológico en el que se desarrolló por primera vez la fotosíntesis oxigénica, y debido a ello y a la proliferación que probablemente tuvieron sobre la tierra, se produjo un cambio sustancial en la atmósfera terrestre (Buick, 1992; Des Marais, 2000) que se enriqueció en oxígeno y condicionó así la evolución del resto de organismos. Además de la fotosíntesis oxigénica, algunas cianobacterias son también capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica, utilizando H₂S como donador de electrones (Schmidt, 1988). Por otra parte, el análisis de secuencias génicas, tanto del genomio nuclear como cloroplastídico de plantas, evidencia el origen cianobacteriano del cloroplasto (Giovannoni *et al.*, 1988; Douglas y Turner, 1991). Actualmente se considera que durante el origen y la evolución de los organismos fotosintéticos, la fagocitosis de determinados grupos cianobacterianos fue un proceso bastante generalizado. Estas teorías basadas en la conservación de las secuencias y el orden de los genes en los cromosomas de cloroplastos y cianobacterias (Melkonian, 1996; Martin *et al.*, 1998; Bhattacharya y Medlin, 1998), apoyan fuertemente la teoría del endosimbionte del origen del cloroplasto (Gray, 1989).

Desde el punto de vista morfológico, se considera a las cianobacterias dentro de las bacterias Gram negativas, debido a la existencia en su pared de una membrana externa y una capa de peptidoglicano (Woese, 1987), aunque su pared celular posee también algunas características similares a las de las bacterias Gram positivas (Jürgens *et al.*, 1983). La morfología de las

cianobacterias es muy variada, pudiéndose distinguir de forma general entre unicelulares y filamentosas. La clasificación taxonómica más aceptada (Rippka *et al.*, 1979) divide a las cianobacterias, en 5 secciones basándose principalmente en criterios morfológicos y en la forma de división celular. Las secciones I y II engloban a cianobacterias unicelulares que se dividen por fusión binaria o múltiple respectivamente. La sección III agrupa a cianobacterias filamentosas no formadoras de heterocistos, mientras que las secciones IV y V engloban especies filamentosas que desarrollan heterocistos y que se dividen en uno (sección IV) o en más de un plano (sección V). El cálculo de las distancias evolutivas a partir de las secuencias de los RNA ribosómicos (rRNA) 16S ha permitido determinar que sólo la sección II, y conjuntamente las secciones IV y V son filogenéticamente coherentes (Giovannoni *et al.*, 1988).

Respecto a sus características genéticas, las cianobacterias presentan una amplia variedad en el contenido G+C (32-71%), cubriendo el rango de valores encontrados en procariotas. Sus genomios pueden exceder el tamaño del de cualquier otro grupo bacteriano (2-13 Mb) (Herdman *et al.*, 1979), siendo la mayoría de las cianobacterias estudiadas altamente poliploides, ya que poseen en torno a 12 copias cromosómicas por célula (Labarre *et al.*, 1989).

A pesar de esta diversidad, las cianobacterias constituyen un grupo metabólicamente muy homogéneo, siendo la mayor parte de ellas autótrofas estrictas, si bien algunas especies son capaces de crecer mixotróficamente (utilizando azúcares como fuente de carbono y energía a la vez que realizan fotosíntesis), fotoheterotróficamente (utilización de sustratos orgánicos manteniéndose inhibido el flujo no cíclico de electrones) o heterotróficamente (utilización de sustratos orgánicos en oscuridad) (Rippka *et al.*, 1979; Smith, 1982), siendo la fotosíntesis el proceso energético y metabólico central de las cianobacterias, y de ella depende la asimilación de compuestos inorgánicos oxidados de carbono, nitrógeno y azufre. Hay que destacar que algunas cianobacterias presentan la capacidad de fijar dinitrógeno atmosférico, y en algunas de ellas dicha fijación tiene lugar en células especializadas llamadas heterocistos. La fijación de CO₂ tiene lugar mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato o ciclo de Calvin (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), si bien existe una vía cuantitativamente minoritaria a través de la fosfoenol piruvato carboxilasa (Weathers y Allen, 1978) y después a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el cual es incompleto debido a la carencia de la actividad 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), por tanto, la funcionalidad del ciclo de Krebs en estos organismos es más de carácter anabólico que catabólico, basándose el metabolismo respiratorio en el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), el cual está sujeto a una estricta regulación por luz.

El presente trabajo se ha llevado a cabo en dos especies distintas de cianobacterias. La primera parte se ha centrado en la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. PCC 7120, perteneciente

a la sección taxonómica IV de la clasificación propuesta por Rippka *et al.*, 1979; que presenta la capacidad de formar heterocistos y por tanto de fijar dinitrógeno. Y la segunda parte se ha realizado en la cianobacteria unicelular heterótrofa facultativa y no fijadora de dinitrógeno *Synechocystis* sp. PCC 6803, perteneciente a la sección I de la citada clasificación. *Synechocystis* 6803 presenta una capacidad natural para ser transformada con DNA exógeno (Gregorieva y Shestakov, 1982), lo que la hace un organismo idóneo para realizar estudios genéticos.

Cuando se comenzaba este trabajo, se hizo disponible la secuencia completa del cromosoma de la cianobacteria unicelular heterótrofa facultativa *Synechocystis* sp PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996). Posteriormente, también se ha secuenciado completamente el cromosoma de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120, aunque las distintas regiones de éste aún no se han ensamblado.

1.1.2. Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias

Aunque algunas cianobacterias pueden utilizar fuentes orgánicas de nitrógeno como ciertos aminoácidos (principalmente Arg, Asn y Gln) o derivados de la urea, todas ellas destacan por su capacidad para asimilar distintas fuentes de nitrógeno inorgánico, siendo las principales nitrato, nitrito y amonio (revisado por Flores y Herrero, 1994). Además, muchas cianobacterias son capaces de crecer a expensas de N₂ atmosférico como única fuente de nitrógeno, convirtiéndolo en amonio por acción del complejo enzimático de la nitrogenasa. La asimilación de todas las fuentes de nitrógeno, pasa por su conversión a amonio, que se incorpora a esqueletos carbonados principalmente mediante la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), ruta que se conoce abreviadamente como ciclo GS-GOGAT (Wolk *et al.*, 1976; Thomas *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1978). La GS cataliza la síntesis de glutamina dependiente de ATP a partir de glutamato y amonio (Stadtman y Ginsburg, 1974); a su vez la GOGAT transfiere el grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato, con la utilización de 2 equivalentes de poder reductor, generando 2 moléculas de glutamato. Como resultado del ciclo, por cada mol de amonio asimilado se genera un mol de glutamato (Fig. 1). Una característica que parece común a todas las cianobacterias es la preferencia por el amonio como fuente de nitrógeno frente a otros compuestos nitrogenados, al requerir éste menos gasto energético para su asimilación. Esto se traduce en una inhibición por amonio de la utilización de las otras fuentes de nitrógeno alternativas. Cuando el ciclo GS-GOGAT se inhibe, se suprimen los comentados efectos del amonio, sugiriendo que deben ser productos de metabolización del mismo, a través de esta ruta, los responsables de esta represión (Flores y Herrero, 1994).

El amonio en su forma no cargada (amoniaco), a determinados pH y concentraciones, puede permear libremente al interior celular (Kleiner, 1981), sin embargo se han descrito sistemas de transporte de amonio en las cianobacterias *Anabaena variabilis* (Rai *et al.*, 1984) y *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Boussiba *et al.*, 1984), sugiriéndose la participación de una permeasa dependiente del potencial de membrana como medio de transporte (Boussiba *et al.*, 1984). Recientemente se han identificado en *Synechocystis* 6803 tres genes cuyos productos son las primeras permeasas de amonio descritas en cianobacterias. Describiéndose el producto del gen *amt1* como el principal responsable del transporte de amonio/metilamonio en esta cianobacteria (Montesinos *et al.*, 1998).

En cianobacterias, la incorporación de nitrato al interior celular puede ocurrir mediante dos mecanismos distintos: uno de baja afinidad, descrito en *Synechococcus* 7942 (Omata, 1995) y cuya velocidad aumenta linealmente al aumentar la concentración de nitrato extracelular, lo que sugiere que se trata de una difusión; y otro de alta afinidad, que requiere el transporte activo del mismo al interior celular (Flores *et al.*, 1983; Lara *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1992). El transporte activo de nitrato y el nitrito tiene lugar en *Synechococcus* 7942, a través del mismo sistema transportador (Madueño *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1992), el cual está formado por 4 polipéptidos, productos de los genes *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* y *nrtD* (Omata *et al.*, 1993), estos genes forman en las cianobacterias *Synechococcus* 7942 (Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993), y *Anabaena* 7120 (Frias *et al.*, 1997), una unidad transcripcional con los genes estructurales para la nitrato (*narB*) y la nitrito reductasas (*nirA*), constituyendo el operón *nirAnrtABCDnarB*. En el caso de *Synechocystis* 6803, estos genes no forman una unidad transcripcional, pues el gen *narB* se encuentra alejado del resto (Kaneko *et al.*, 1996). El nitrato incorporado es reducido hasta nitrito mediante la acción de la nitrato reductasa, proceso que requiere la utilización de 2 electrones, y el nitrito es a su vez, reducido hasta amonio por la nitrito reductasa, que incorpora 6 electrones más, donados en ambos casos por la ferredoxina (Manzano *et al.*, 1976; Candau *et al.*, 1976; Guerrero *et al.*, 1981).

En las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno, éste se reduce hasta amonio mediante el complejo enzimático de la nitrogenasa. Dicho complejo se inactiva irreversiblemente por O₂, por lo que estos organismos han desarrollado diversas estrategias para proteger la maquinaria de fijación de nitrógeno molecular. Una de ellas consiste en la diferenciación de células especializadas denominadas heterocistos, que poseen una serie de peculiaridades que permiten mantener en su interior un ambiente microaeróbico (revisado por Wolk *et al.*, 1994). En otros casos, la fijación de dinitrógeno opera separada temporalmente de la producción fotosintética de O₂, por lo que la nitrogenasa sólo es funcional en la oscuridad (Mullineaux *et al.*, 1981).

El complejo enzimático de la nitrogenasa consta de dos componentes proteicos distintos: la dinitrogenasa (Fe-Mo proteína) y la dinitrogenasa-reductasa (Fe proteína). La Fe-Mo proteína es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ en el que se unen 4 centros [4Fe-4S] y dos cofactores Fe-Mo. Las subunidades α y β de la dinitrogenasa están codificadas por los genes *nifD* y *nifK*, respectivamente. La Fe proteína es a su vez, un dímero de subunidades idénticas, codificadas por el gen *nifH*, y consta además de un centro [4Fe-4S] (Wolk *et al.*, 1994). La reducción de N_2 a amonio catalizada por la nitrogenasa es una reacción fuertemente endergónica que, además de requerir el aporte de 6 electrones por cada dos moléculas de amonio y una de hidrógeno generadas (Lowe *et al.*, 1985), requiere el aporte de energía en forma de ATP (entre 15 y 20 moléculas). Este ATP puede ser producido por fotofosforilación cíclica o por fosforilación oxidativa (Böhme, 1998). Es posible que el NADPH funcione como donador de electrones para la nitrogenasa a través de las proteínas ferredoxina (Fd) o flavodoxina (Wolk *et al.*, 1994). En *Anabaena* 7120 y en otras especies formadoras de heterocistos se ha identificado un gen (*fdxH*) que codifica una Fd específica del heterocisto y que funciona como donador inmediato de electrones para la nitrogenasa (Böhme y Haselkorn, 1988; Schrautemeier y Böhme, 1985 y 1992; Masepohl *et al.*, 1997).

El heterocisto, como ya se ha mencionado con anterioridad, es una célula especializada en la fijación de N_2 , que se diferencia a intervalos semirregulares, (aproximadamente una de cada doce células de *Anabaena* 7120, se diferencia en heterocistos) en algunas cianobacterias filamentosas, en respuesta a la ausencia de nitrógeno combinado (Wolk, 1989). Las principales características que definen al heterocisto, están orientadas a la generación del ambiente microaeróbico necesario para el desarrollo de la actividad nitrogenasa. Entre ellas están: 1) la formación alrededor de la membrana externa, de una doble envuelta formada por una capa externa de polisacáridos y una capa interna de glucolípidos, que constituye una barrera a la permeabilidad del oxígeno; 2) cambios en la estructura de los tilacoides asociados con la desaparición de la actividad del fotosistema II (PSII), que evita la producción de oxígeno por fotólisis del agua (Giddings y Staehelin., 1978); 3) incapacidad de fijación de CO_2 debido a la ausencia de la actividad ribulosa 1,5-bisfato carboxilasa, Rubisco y 4) alta actividad respiratoria, de consumo de hidrógeno y de catabolismo de azúcares, que elimina el oxígeno que difunde al heterocisto (Wolk *et al.*, 1994). El proceso de desarrollo del heterocisto conlleva tanto la activación de la expresión de determinados genes, como el cese de la expresión de otros, lo que implica profundos cambios tanto en el metabolismo, como en la estructura de la célula.

Los heterocistos tienen que aportar el nitrógeno fijado al resto de células del filamento, y necesitan del abastecimiento por parte de las células vegetativas de compuestos reducidos de carbono, que serían fuente de electrones para la fijación de nitrógeno y de esqueletos carbonados para la asimilación del nitrógeno fijado, para lo cual se requiere de una comunicación intercelular

con las células vegetativas. Se postula que esta comunicación ocurre a través de un poro provisto de un microplasmodesmo (Roussard-Jacquemin, 1983) que permitiría el intercambio de metabolitos entre el heterocisto y las células vegetativas.

Por otra parte, la síntesis de ATP en el heterocisto no está completamente definida. El ATP podría ser sintetizado en condiciones de iluminación, tanto por fosforilación cíclica, como por fosforilación oxidativa, este último proceso consume oxígeno y utiliza piridín nucleótidos o hidrógeno como fuente de electrones. Los piridín nucleótidos reducidos podrían ser generados en el metabolismo de los carbohidratos importados de las células vegetativas. La naturaleza de estos carbohidratos es desconocida, pero se piensa que la sacarosa podría estar implicada (Wolk *et al.*, 1994). La sacarosa debería ser fosforilada y convertida a glucosa-6-fosfato y posteriormente degradada, vía las enzimas del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, el cual es particularmente activo en el heterocisto, produciendo NADPH y CO₂ (Wolk *et al.*, 1982). Se ha sugerido que el NADPH donaría electrones a la nitrogenasa a través de la ferredoxina específica del heterocisto (FdxH) y de la ferredoxina: NADP⁺ oxidoreductasa (FNR), mediante un transporte inverso de electrones. Para que esto ocurriese, la relación NADPH/NADP⁺ debería ser alta, lo cual es consistente con los niveles medidos en heterocistos, en condiciones de fijación de nitrógeno (Böhme, 1987) y con los altos niveles de FNR detectados.

La identidad de los compuestos nitrogenados que se transfieren a las células vegetativas también es desconocida, se considera que este transporte ocurre en forma de aminoácidos (Wolk *et al.*, 1974) y se apunta a la glutamina como posible vehículo de nitrógeno combinado desde los heterocistos hasta las células vegetativas, debido a la elevada actividad glutamina sintetasa (GS) del heterocisto. Por otra parte, también se han detectado altos niveles de actividad isocitrato deshidrogenasa (IDH) en condiciones de fijación de nitrógeno (Muro-Pastor *et al.*, 1992), esta enzima genera 2-oxoglutarato, en una reacción dependiente de NADP⁺. A partir de 2-oxoglutarato y glutamina, se generan 2 moléculas de glutamato, mediante la acción de la glutamato sintasa (GOGAT), sin embargo la presencia de esta enzima en el heterocisto no esta clara. Mientras que Thomas *et al.*, 1977, no detectaron actividad GOGAT en heterocistos de *Anabaena variabilis*, otros autores sí observaron formación de glutamato en extractos crudos de heterocistos (Gupta y Carr, 1981; Häger *et al.*, 1983) atribuyendo esta reacción a la GOGAT, no obstante Rai *et al.*, 1982, adscribieron estos resultados a una actividad glutaminasa. Dado que el mecanismo por el cual ocurre la asimilación de amonio en el heterocisto no está establecido, tampoco se conoce la naturaleza exacta de los aminoácidos transferidos.

Como se ha comentado con anterioridad, el amonio finalmente se incorpora a esqueletos carbonados principalmente, mediante el ciclo GS-GOGAT (Wolk *et al.*, 1976; Thomas *et al.*, 1977;

Meeks *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1978), existe en algunas cianobacterias una ruta alternativa de asimilación de amonio que implica a la glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima dependiente de NADH o NADPH, que cataliza la síntesis de glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato (Neilson y Doudoroff, 1973; Reitzer y Magasanik, 1987). En *Synechocystis* 6803 se han caracterizado una NAD-GDH y una NADP-GDH (Florencio *et al.*, 1987; Chávez y Candau, 1991). Dada la baja afinidad que presenta esta enzima por el amonio, sólo se le ha atribuido una función sintética de glutamato en altas concentraciones de amonio (Reitzer y Magasanik, 1987), aunque en *Synechocystis* 6803 también podría aportar alguna ventaja selectiva en el caso de condiciones de crecimiento estacionario (Chávez *et al.*, 1999).

Las cianobacterias presentan una GS típicamente procariota, denominada GS tipo I (GSI); esta enzima está compuesta por 12 subunidades idénticas de aproximadamente 50 kDa, codificadas por el gen *glnA* y requiere de cationes divalentes para su actividad (Sampaio *et al.*, 1979; Florencio y Ramos, 1985; Mérida *et al.*, 1990). La actividad de la enzima GSI en diversas cianobacterias es máxima en condiciones de carencia de nitrógeno combinado y disminuye lentamente tras la adición de amonio a los cultivos, llegando al 50% a las 10-20 h (Flores y Herrero., 1994). Sin embargo en *Synechocystis* 6803, este descenso es rápido, alcanzando un 10% del nivel inicial en 20-30 min. (Mérida *et al.*, 1991), esta rápida inactivación está debida a la unión no covalente a la GSI de dos péptidos de 7 y 17 kDa respectivamente, denominados IF7 e IF17 (García-Domínguez *et al.*, 1999). La inactivación de la GSI se ha observado, igualmente, en cultivos de *Synechocystis* 6803 sometidos a oscuridad o incubados con inhibidores fotosintéticos, lo que sugiere que la actividad de esta enzima está también regulada por el estado redox celular (Reyes, *et al.*, 1995). El gen *glnA* ha sido clonado en varias cianobacterias, tanto unicelulares como filamentosas, este gen se expresa desde distintos promotores, unos constitutivos y otros regulados por la fuente de nitrógeno disponible (Tumer *et al.*, 1983), con un patrón de expresión similar al presentado por la actividad enzimática.

Por otra parte, se ha demostrado la existencia en *Synechocystis* 6803 del gen *glnN*, que codifica una GS tipo III, aunque esta enzima representa solo un 20% de la actividad GS total de la célula en condiciones de carencia de nitrógeno, siendo sus niveles despreciables en presencia de nitrato o amonio (Reyes y Florencio, 1994a; García-Domínguez *et al.*, 1997). También se ha establecido que dicha GS tipo III no está presente en cianobacterias fijadoras de N₂, pero está ampliamente distribuida en el resto (Reyes y Florencio, 1994). Recientemente se ha descrito que la GSIII es la única existente en la cianobacteria *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 (Crespo *et al.*, 1998).

En cianobacterias se han descrito dos tipos de glutamato sintetas: las que utilizan ferredoxina reducida como donador de electrones (Fd-GOGATs) y las dependientes de NADH,

(NADH-GOGATs). Se han caracterizado enzimas con actividad Fd-GOGATs en las cianobacterias *Synechococcus* 6301, *Synechocystis* 6803 y *Plectonema boryanum* (Marqués *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1995; Okuhara *et al.*, 1999), y se han clonado los genes que codifican estas enzimas en las cianobacterias *Synechocystis* 6803 y *P. boryanum* (Navarro *et al.*, 1995; Okuhara *et al.*, 1999). Aunque inicialmente se describieron las dos enzimas de *Synechocystis* como Fd-GOGATs, un análisis detallado ha demostrado que solamente la enzima codificada por el gen *gltS* (actualmente denominado *glsF*) es dependiente de ferredoxina, mientras que el gen *gltB* codifica la subunidad grande de una NADH-GOGAT (Navarro *et al.*, sin publicar), la cual contiene además una subunidad pequeña codificada por el gen *gltD* (Kaneko *et al.*, 1996). Al igual que en *Synechocystis*, una de las GOGATs descritas en la cianobacteria *P. boryanum* es dependiente de ferredoxina y la otra de NADH (Okuhara *et al.*, 1999). Las Fd-GOGATs cianobacterianas son enzimas monoméricas con un peso molecular alrededor de 170 kDa (Marqués *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 2000), mientras que las NADH-GOGATs son enzimas diméricas formadas por una subunidad mayor con un peso molecular de 160 kDa, y una subunidad menor con un tamaño deducido de 60 kDa (Okuhara *et al.*, 1999).

Al igual que ocurre en cianobacterias, en plantas también se han descrito glutamato sintasas dependientes de ferredoxina y de NADH, aunque en este caso las NADH-GOGATs son enzimas monoméricas de aproximadamente 220 kDa, siendo el monómero similar al conjunto de las dos subunidades de las NADH-GOGATs. Estas enzimas aparecen tanto en plantas (Gregerson *et al.*, 1993) como en levaduras (Cogoni *et al.*, 1995) y en algas (Miyatake y Kitaoka, 1981; Marqués *et al.*, 1984). Las NADH-GOGATs de alfalfa y *Phaseolus vulgaris* han sido bien caracterizadas, estas enzimas han sido localizadas en plastos, preferentemente en tejidos no fotosintéticos, como raíces (Suzuki *et al.*, 1984) y nódulos (Anderson *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1987; Chen y Cullimore, 1988; Gregerson *et al.*, 1993).

Las Fd-GOGATs, están presentes en los tejidos fotosintéticos, más específicamente en los cloroplastos, tanto de plantas (Lea y Mifflin, 1974; Suzuki y Gadal, 1982; Botella *et al.*, 1988; Knaff e Hirasawa, 1992; Lam *et al.*, 1995) como de algas (Galván *et al.*, 1984; Valentin *et al.*, 1993), además de en cianobacterias (Marqués *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 1995; Okuhara *et al.*, 1999). La caracterización bioquímica de estas enzimas, muestra la presencia de un centro [3Fe-4S] en las enzimas de las cianobacterias *Synechococcus* 6301 y *Synechocystis* 6803 (Marqués *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 2000), de espinaca (Knaff *et al.*, 1991) y del alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Márquez *et al.*, 1985). En estas Fd-GOGATs se ha determinado además la presencia de una molécula de FMN (Marqués *et al.*, 1992; Navarro *et al.*, 2000; Hirasawa *et al.*, 1996) y en el alga *C. reinhardtii* además una molécula de FAD (Márquez *et al.*, 1986).

Finalmente existe un tercer tipo de glutamato sintasa, presente solamente en bacterias, que utiliza NADPH como donador de electrones (NADPH-GOGATs). Estas enzimas están compuestas por dos subunidades, una subunidad α (mayor) con un peso molecular que varía entre 135 y 170 kDa y una subunidad β (pequeña) con un peso molecular entre 45 y 55 kDa. Estas enzimas han sido bien caracterizadas en *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium*, *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter capsulatum* (Miller y Stadman, 1972; Vanoni *et al.*, 1991; Hemmilä y Mäntsälä, 1978; Carlberg y Nordlund, 1991; Igeño *et al.*, 1993) y el protómero $\alpha\beta$, contiene una molécula de FAD, una de FMN y tres centros Fe/S.

El papel fisiológico de la existencia de distintas GOGATs en organismos fotosintéticos no está bien establecido. Estudios llevados a cabo en guisantes, cebada y plantas de *Arabidopsis* parecen indicar que las Fd-GOGATs podrían estar implicadas en la asimilación primaria del nitrógeno y del amonio procedente de la fotorrespiración (Matoh *et al.*, 1982; Wallsgrove *et al.*, 1982; Lam *et al.*, 1995). Por el contrario, las NADH-GOGATs, podrían ser enzimas auxiliares de la ruta anterior o funcionar como fuente de síntesis de glutamato para el transporte intracelular (Lam *et al.*, 1995). Por otro lado, en la cianobacteria *P. boryanum*, solamente la inactivación del gen *glsF* provoca un fenotipo detectable, cuando las células están creciendo bajo condiciones de alto CO₂ y alta intensidad de luz, siendo este similar al provocado por la carencia de nitrógeno. Este efecto parece estar provocado por una incapacidad para asimilar el carbono y el nitrógeno de una forma coordinada (Okuhara *et al.*, 1999), mientras que la inactivación de los genes *gltB* y *gltD*, no causa ningún efecto detectable, sugiriendo que en esta cianobacteria, podría ser la Fd-GOGAT la principal responsable de la asimilación del amonio.

1.1.3. El sistema ferredoxina-tiorredoxina reductasa: tiorredoxina en cianobacterias

Como se ha comentado con anterioridad, en cianobacterias la fotosíntesis constituye el proceso energético central del metabolismo. Obviamente en estos organismos y en general en todos los organismos fotosintéticos, la luz actúa como un potente efector de todos los procesos metabólicos, siendo un activador general de la transcripción, de la traducción y de la actividad enzimática. Este efecto activador de la luz, tiene lugar la mayor parte de las veces de una forma indirecta y es transmitido por diferentes mecanismos a las dianas apropiadas. De hecho está claramente establecido que una fracción de los electrones generados fotosintéticamente son derivados con fines reguladores. El sistema que se ha caracterizado como responsable de esta señalización es el conocido como sistema ferredoxina: ferredoxina-tiorredoxina reductasa: tiorredoxina. En este sistema, la señal producida por la luz se transfiere vía el flujo fotosintético de

electrones a proteínas denominadas tiorredoxinas. La transferencia de electrones entre la ferredoxina y las tiorredoxinas es mediada por la enzima ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR).

Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas con un tamaño de aproximadamente 12 kDa, cuyas estructuras y secuencias se hallan bastante conservadas en la mayor parte de los organismos conocidos desde arqueobacterias hasta mamíferos (Arnér y Holmgren, 2000). Se caracterizan por presentar el sitio activo en la secuencia conservada -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys- (Holmgren, 1968), donde las dos cisteínas pueden formar en su estado reducido, puentes sulfhidrilos altamente reactivos, con potenciales redox entre -270 y -210 mV (Krause *et al.*, 1991; Salamon *et al.*, 1995) que son capaces de reducir puentes disulfuro en otras proteínas dianas. Sin embargo, la capacidad para reducir un puente disulfuro en otra proteína, no reside solamente en la diferencia de potencial de los enlaces, sino también en interacciones específicas entre ambas proteínas.

Las tiorredoxinas fueron descritas inicialmente, como agentes reductores en el metabolismo del azufre en levaduras (Wilson *et al.*, 1961), aunque la proteína mejor caracterizada es la de *E. coli* donde fue inicialmente aislada como un donador de hidrógeno en la reacción de la ribonucleótido reductasa (Laurent *et al.*, 1964). Desde entonces se han hallado en la mayoría de los organismos estudiados y aunque presentan una gran variedad de funciones, se ha demostrado que la mayor parte de éstas, se basan en la alta capacidad que tienen para actuar como donador de hidrógeno y de electrones en muchos procesos, que incluyen por ejemplo, la activación y la inhibición de proteínas, la replicación del DNA (Holmgren, 1989) y también ejercen como agentes reductores en muchas rutas biosintéticas (Jacquot *et al.*, 1997). Estudios recientes han demostrado que también están implicadas en la protección contra el estrés oxidativo y en la apoptosis (Zhang *et al.*, 1997). Por último se han encontrado factores de transcripción regulados por tiorredoxinas (Schenk *et al.*, 1994; Hirota *et al.*, 1997; Hirota *et al.*, 1999), lo que aumenta aún más la diversificación de funciones llevadas a cabo por estas proteínas.

Mientras que en los organismos no fotosintéticos, las tiorredoxinas son reducidas exclusivamente a partir de NADPH por la acción de la flavoproteína, NADPH-tiorredoxina reductasa (NTR), todos los organismos fotosintéticos aeróbicos presentan un sistema de reducción de tiorredoxinas alternativo, que implica a la cadena de transporte de electrones fotosintética, a través de la ferredoxina y de la enzima ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) (Buchanan, 1991). Aunque la NTR ha sido extensamente estudiada en *E. coli* (revisado por Willians, 1995), también se ha aislado y caracterizado esta enzima en diversas plantas y algas (Johnson *et al.*, 1987; Florencio *et al.*, 1988; Huppe *et al.*, 1991; Van Langendonck y Van den Driessche, 1992). Mediante difracción de rayos-X se ha resuelto la estructura de la NTR de *Arabidopsis thaliana* (Day *et al.*, 1996). Esta

proteína está formada por dos subunidades idénticas de 333 aminoácidos con un peso molecular de 35 kDa (Jacquot *et al.*, 1994). Cada subunidad contiene un dominio de unión a FAD y uno de unión a NADPH. La estructura tridimensional de la enzima de *A. thaliana* es muy parecida a la de la enzima de *E. coli* (Waksman *et al.*, 1994), excepto por un posicionamiento diferente de los dominios de unión a NADPH y FAD (Day *et al.*, 1996). En eucariotas fotosintéticos coexisten ambos sistemas de reducción, pero en cianobacterias sólo está presente el sistema conocido como ferredoxina: ferredoxina-tiorredoxina reductasa: tiorredoxina o sistema ferredoxina/tiorredoxina (Jacquot *et al.*, 1997). Este sistema vincula la regulación enzimática con la absorción de energía por los fotosistemas. De hecho las tiorredoxinas reducidas por la FTR activan mediante la reducción de puentes disulfuro, enzimas que incluyen miembros del ciclo de Calvin, como por ejemplo, la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Wolosiuk y Buchanan 1977), la pseudoheptulosa-1,7- bisfosfatasa (Cadet *et al.*, 1987), o la fosforibuloquinasa (Porter *et al.*, 1976) y también enzimas que no están relacionadas con el ciclo, como a la NADP-malato deshidrogenasa (Jacquot *et al.*, 1976; Buchanan *et al.*, 1978; Jacquot *et al.*, 1978) o la fenilalanina amonio liasa.

La FTR es una enzima dimérica, con un peso molecular aparente de aproximadamente 30 kDa, formada por dos subunidades distintas llamadas respectivamente subunidad catalítica (codificada por el gen *ftrC*) y subunidad variable (codificada por el gen *ftrV*) (Droux *et al.*, 1987a). La subunidad catalítica está bastante conservada en todos los organismos donde se ha estudiado (Huppe *et al.*, 1990), presenta un tamaño de aproximadamente 14 kDa. Esta subunidad además de contener el puente disulfuro implicado en la reducción de las tiorredoxinas (Droux *et al.*, 1987a; Szekeres *et al.*, 1991; Marc-Martin *et al.*, 1993), presenta un centro sulfoférrico del tipo [4Fe-4S] (Droux *et al.*, 1987b), cuya función parece estar implicada en la estabilización del radical tiilo, formado por la reducción inicial del puente disulfuro con un electrón donado por la ferredoxina (Staples *et al.*, 1996). La subunidad variable no está tan conservada a lo largo de la evolución, presenta tamaños que varían entre los 16 kDa en las enzimas de plantas y algas, y los 7 kDa de las enzimas cianobacterianas, aunque de todas formas existen regiones bastante conservadas entre las subunidades variables de plantas y cianobacterias. La FTR de cianobacterias también está formada por dos subunidades distintas, con pesos moleculares de 14 y 7 kDa respectivamente (Droux *et al.*, 1987a), siendo la subunidad de 14 kDa la catalítica. Esta subunidad presenta características bastante similares a la subunidad catalítica de plantas y algas. La subunidad variable muestra un tamaño de 7 kDa, y parece ser específica de este tipo de organismos (Gleason, 1994). Recientemente se ha determinado la estructura de la FTR de *Synechocystis* 6803 a una resolución de 1,6 Å (Dai *et al.*, 2000). La estructura de la FTR sugiere que la subunidad variable está implicada principalmente en la estabilización de la agrupación Fe-S. Los átomos de Fe del centro sulfoférrico, están coordinados por las cisteínas 55, 74, 76 y 85 de la subunidad catalítica y prácticamente todos los

residuos de la subunidad catalítica que participan en la interacción con la subunidad variable están estrictamente conservados.

Los eucariotas fotosintéticos (algas y plantas superiores), además de contener los dos sistemas de reducción, presentan la peculiaridad de contener varias isoformas de tiorredoxinas. Por ejemplo; el análisis de la secuencia del genomio de *A. thaliana* ha mostrado la existencia de al menos 7 genes que codifican tiorredoxinas cloroplastídicas (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001), y anteriormente se había descrito la existencia de al menos 5 tiorredoxinas de localización citosólica (Rivera-Madrid *et al.*, 1995). Por otra parte, un exhaustivo estudio de fraccionamiento y ensayo para todas las tiorredoxinas presentes en soja (Häberlein 1991; Konrad *et al.*, 1996), muestra la existencia en esta planta de seis tiorredoxinas distintas. Aparte de las citadas, se han clonado y secuenciado genes de tiorredoxinas de una gran diversidad de plantas, como por ejemplo: de espinaca, guisante, maíz, tabaco, trigo o arroz (Kamo *et al.*, 1989; Wedel *et al.*, 1992; Lepiniec *et al.*, 1982; Lopez-Jaramillo *et al.*, 1994; Trevanior y Ashton, 1995; Gautier *et al.*, 1998; Uchimiya *et al.*, 1993), así como de algas (Reynolds *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1995). Es también interesante mencionar que se han descrito tiorredoxinas presentes en mitocondrias, tanto de animales como de plantas (Bodenstein-Lang *et al.*, 1989).

El análisis de las secuencias de las distintas tiorredoxinas de plantas, engloba a éstas dentro de tres grupos diferenciados. El primer grupo comprende las proteínas similares en estructura a las tiorredoxinas procariotas (tomando como modelo la de *E. coli*), éstas proteínas tienen localización cloroplástica, pero están codificadas por genes nucleares, e *in vitro* estas tiorredoxinas catalizan eficientemente la reducción de la enzima NADP-malato deshidrogenasa; en base a esta propiedad se les ha denominado tiorredoxinas tipo-*m*. Hay que destacar que se ha localizado en el cloroplasto del alga *Porphyra yezoensis* un gen que codifica una tiorredoxina tipo-*m* (Reynolds *et al.*, 1994), lo que sugiere un origen cianobacteriano de estas proteínas en algas y plantas. El segundo grupo lo forman también tiorredoxinas cloroplastídicas, codificadas en el núcleo. Estas tiorredoxinas se caracterizan por activar eficientemente a la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) de plantas, por lo que se las ha denominado tipo-*f*. La FBPasa cloroplástica contiene dos residuos de cisteína, separados por 4 aminoácidos, que podrían formar un puente disulfuro factible de ser reducido por tiorredoxinas (Marcus *et al.*, 1990). Estas tiorredoxinas tipo-*f* difieren de las anteriores en la estructura primaria, una característica que está relacionada con sus propiedades catalíticas (Tsugita *et al.*, 1983). Ambos grupos de tiorredoxinas (-*m* y -*f*) son reducidas por el sistema ferredoxina: ferredoxina-tiorredoxina reductasa. El tercer tipo lo constituyen también tiorredoxinas codificadas por genes nucleares, pero de localización citosólica (Wolosiuk *et al.*, 1979), y están presentes además en tejidos no fotosintéticos, este grupo se ha designado como tipo-*h* (tipo heterotrófico), son las que se presentan

en mayor número y están más ampliamente distribuidas. Las tiorredoxinas tipo-*h* son reducidas por NADPH, por medio de la enzima NADPH-tiorredoxina reductasa, (Buchanan *et al.*, 1994). El análisis de las secuencias de estas tiorredoxinas demuestra que presentan un alto grado de identidad con las tiorredoxinas presentes en mamíferos (Rivera-Madrid *et al.*, 1995; Sahrawy *et al.*, 1996).

Debido al relativamente pequeño tamaño y la alta estabilidad que presentan las tiorredoxinas, éstas han sido un buen modelo para llevar a cabo estudios estructurales, habiéndose determinado la estructura de estas proteínas en varios organismos, que incluyen procariotas y eucariotas. Todas estas proteínas presentan la sucesión conservada de estructuras secundarias, $\beta 1$, $\alpha 1$, $\beta 2$, $\alpha 2$, $\beta 3$, $\alpha 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, y $\alpha 4$, que forman el núcleo central de láminas plegadas β , rodeado por 4 α hélices, el sitio activo se localiza entre la hoja $\beta 2$ y la hélice $\alpha 2$ formando un motivo saliente (Bréhélin *et al.*, 2000). Entre las estructuras resueltas se encuentran las de tiorredoxinas de los tres tipos presentes en los eucariotas fotosintéticos (Mittard *et al.*, 1997; Lancelin *et al.*, 2000; Capitani *et al.*, 2000), mostrando que las relaciones encontradas entre la secuencias de aminoácidos de las diferentes tiorredoxinas, se mantienen también a nivel de las estructuras.

A pesar del gran número de secuencias y tipos de tiorredoxinas descritas en plantas, solamente se han clonado dos tiorredoxinas distintas en la cianobacteria *Anabaena* 7120 (Lim *et al.*, 1986; Alam *et al.*, 1989; Gleason, 1982). En las otras dos cianobacterias donde se han descrito genes de tiorredoxinas; *Anacystis nidulans* (*Synechococcus* 7942) y *Synechocystis* 6803, se ha clonado solamente un gen (Muller y Buchanan, 1989; Navarro y Florencio, 1996).

Estas tiorredoxinas se engloban dentro del tipo-*m*, aunque la secuencia de la segunda tiorredoxina localizada en *Anabaena* 7120 diverge significativamente de las otras tiorredoxinas halladas en cianobacterias. Las tiorredoxinas tipo 1 cianobacterianas presentan entre sí identidades superiores al 80%, siendo también alta (60-70%) la identidad con las tiorredoxinas tipo-*m* de plantas (Gleason, 1994; Navarro y Florencio, 1996). La segunda tiorredoxina de *Anabaena* muestra por el contrario una identidad basal del 40%, tanto con las tiorredoxinas cianobacterianas, como con las tiorredoxinas-*m* de plantas. Aunque las secuencias de estas proteínas claramente las incluye dentro del tipo-*m*, curiosamente en cianobacterias, la actividad NADP-malato deshidrogenasa es muy baja y no es susceptible de regulación redox (Ip *et al.*, 1984). Asimismo estas tiorredoxinas muestran reactividad *in vitro* con la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica, y aunque esta enzima no presenta en cianobacterias dos residuos de cisteína cercanos, sí se ha demostrado activación por tiorredoxinas de esta enzima en extractos crudos de *Anabaena cylindrica* (Ip *et al.*, 1984), sugiriendo también una regulación redox de la FBPasa en cianobacterias (Crawford *et al.*, 1984; Whittaker y Gleason, 1984). Otra enzima que parece estar regulada en cianobacterias por la acción de tiorredoxinas es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), esta enzima que cataliza el primer paso de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato es inhibida *in vivo* por luz, presumiblemente para

prevenir un consumo de glucosa improductivo, esta inactivación parece estar mediada por la acción de tiorredoxinas, ya que una preparación conteniendo tiorredoxina reducida con DTT es capaz de inhibir *in vitro* la actividad de esta enzima en *Anabaena variabilis* (Udvardy *et al.*, 1984).

Cabe destacar que todas estas funciones adscritas a la actividad de tiorredoxinas en cianobacterias están basadas en actividades determinadas *in vitro*. Esto unido a la imposibilidad de obtener mutantes de tiorredoxinas en cianobacterias (Muller y Buchanan, 1989; Navarro y Florencio, 1996), ni siquiera en condiciones de crecimiento heterotrófico (Navarro y Florencio, 1996), hacía interesante la búsqueda en cianobacterias de otros procesos regulados por luz, aparte de las ya mencionadas actividades, donde se estuviese ejerciendo una regulación redox mediada por tiorredoxinas.

La reciente secuenciación del genomio de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996), ha mostrado la existencia en esta cianobacteria, de tres fases abiertas de lectura (ORFs) adicionales al gen *trxA* (Navarro, y Florencio, 1996), cuyos productos presentaban homología con tiorredoxinas. Estas ORFs; *slr0233*, *slr1139* y *sll1057* se encontraban alejadas entre sí, en el genomio de *Synechocystis*, y en principio no se localizaban próximas a ninguna ORF cuyo producto hubiese sido previamente descrito (Kaneko *et al.*, 1996).

Por otra parte, *Synechocystis* 6803 presenta la capacidad que de ser transformado de modo natural con DNA exógeno (Grigorieva y Shestakov, 1982), por lo que ha sido un organismo en el cual se han generado diversos mutantes del aparato fotosintético (Willians, 1988; Pakrasi *et al.*, 1988; Smart *et al.*, 1994). Esto junto con la disponibilidad de la secuencia completa de su genomio, hacían de *Synechocystis* un organismo idóneo para realizar un estudio amplio del papel llevado a cabo por las tiorredoxinas en esta cianobacteria.

1.2. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO

El objetivo de este trabajo ha sido en primer lugar, el estudio de la actividad glutamato sintasa en la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. PCC 7120. Este estudio incluiría la caracterización del gen o de los genes que codifican glutamato sintasas en dicha cianobacteria, así como la caracterización de la regulación tanto a nivel transcripcional, como de la actividad GOGAT, en respuesta a la disponibilidad de distintas fuentes de nitrógeno.

Por otro lado la secuenciación del genomio de la cianobacteria *Synechocystis* 6803, nos brindaba la posibilidad de completar el estudio comenzado en nuestro grupo sobre el análisis de los genes que codifican tiorredoxinas en esta cianobacteria. Este estudio comprendería la caracterización de la expresión de estos genes en respuesta a diversos factores ambientales,

principalmente relacionados con el proceso fotosintético y por otra parte, la obtención de mutantes de los diferentes genes sería la herramienta idónea para intentar analizar el papel fisiológico de cada proteína. Con objeto de realizar un estudio más completo del sistema ferredoxina/tiorredoxina, también se ha llevado a cabo un análisis de la regulación transcripcional de los genes *ftrC* y *ftrV* que codifican las subunidades catalítica y variable de la FTR de *Synechocystis* 6803.

2. MATERIALES Y MÉTODOS



2.1. Organismos y condiciones de cultivo

2.1.1. Cianobacterias

2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias utilizadas.

La realización del presente trabajo se ha centrado en dos especies distintas de cianobacterias, *Anabaena* sp. PCC 7120, cianobacteria filamentosas, fijadora de dinitrógeno y formadora de heterocistos perteneciente a la sección IV de la clasificación taxonómica de las cianobacterias propuesta por Rippka *et al.*, 1979 y *Synechocystis* sp. PCC 6803, cianobacteria unicelular heterótrofa facultativa y no fijadora de dinitrógeno, perteneciente a la sección I de la citada clasificación. Las estirpes silvestres de cianobacterias y las estirpes mutantes de *Synechocystis* sp. PCC 6803 utilizadas en este trabajo y sus características más relevantes se presentan en la Tabla 1.

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

Estirpe	Características	Referencia
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Tipo silvestre	Rippka <i>et al.</i> , 1979
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Tipo silvestre	Rippka <i>et al.</i> , 1979
STXA1	$\Delta ptrxA::ppetJ::npt$. Km ^r	Este trabajo
STXA2	$glnN::trxA::cat$. Km ^r , Cm ^r . Derivada de STXA1	Este trabajo
STXB1(+/-) ^a	$trxB::npt$. Km ^r	Este trabajo
STXC1(+/-) ^a	$trxC::cat$. Cm ^r . No totalmente segregado	Este trabajo
STXQ1(+/-) ^a	$trxQ::npt$. Km ^r	Este trabajo

(+/-)^a indica el sentido de inserción de los casetes C.C1 y C.K1 con relación al sentido de transcripción de los respectivos genes.

2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo de cianobacterias.

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

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

Este medio suplementado con NaHCO₃ 12 mM se denomina BG11c. BG11_{0c} hace referencia al medio BG11c sin fuente de nitrógeno combinada. Cuando la fuente de nitrógeno era amonio, el NaNO₃ se sustituía por NH₄Cl a una concentración de 10 mM, añadiéndose entonces tampón TES-NaOH (pH 7,5) a una concentración final de 20 mM. Para el crecimiento tanto en condiciones mixotróficas como heterotróficas y fotoheterotróficas se utilizaba medio BG11c suplementado con glucosa a una concentración final de 10 mM. Los medios conteniendo todos sus componentes excepto el tampón TES-NaOH y/o la glucosa en su caso, se esterilizaban por autoclavado durante 20 min a 1 atm de sobrepresión y 121 °C de temperatura (autoclave Sanyo modelo P). La solución de glucosa y el tampón TES-NaOH se esterilizaban separadamente por filtración a través de filtros Acrodisc (Gelman, 0,2 µm de diámetro de poro).

La adición de otros compuestos como aminoácidos o antibióticos se realizaba previa esterilización de los mismos.

Salvo indicación de lo contrario las concentraciones finales empleadas de los distintos compuestos añadidos a los medios de cultivo fueron: cloramfenicol 20 y 40 µg/ml, kanamicina 50 y 200 µg/ml según la estirpe utilizada, glucosa 10 mM, DCMU y DBMIB 5 µM. Las concentraciones usadas, de otras soluciones más específicas, se detallan en la sección correspondiente del apartado Resultados. Las condiciones de oscuridad se simulaban mediante el total recubrimiento del recipiente de cultivo con varias capas de papel de aluminio.

El crecimiento de los cultivos en medio líquido tenía lugar, bien en condiciones de burbujeo con una mezcla aire-CO₂ en proporción 99:1 (v/v), a 30 °C bajo iluminación continua, 50 µE·m⁻²·s⁻¹, suministrada por paneles de tubos fluorescentes de luz blanca (Sylvania daylight F20w/D o similares), o bien en matraces Erlenmeyer incubados a 50 rpm en incubadores orbitales Gallenkamp

(Gran Bretaña) modelo INR.401.010W, termostatzados a 30 °C y bajo condiciones de iluminación continua de 25 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En todos los experimentos fisiológicos (determinación de actividades enzimáticas y aislamiento de RNA para estudios de regulación transcripcional) se utilizaron cultivos en medio líquido en las condiciones de burbujeo anteriormente descritas. Para los aislamientos de DNA y para los experimentos de transformación se utilizaron cultivos en matraces.

Para el cultivo en medio sólido, el medio líquido se suplementaba con agar al 1% (p/v). Para ello, se disolvían las sales en la mitad del volumen de agua a utilizar y el agar (Bacto-Agar Difco) en la otra mitad. Una vez esterilizados todos los componentes, se mezclaban y el medio se vertía en cajas de Petri a razón de 45 ml por caja. La utilización de antibióticos y las condiciones de iluminación fueron las descritas para los cultivos líquidos.

En todos los experimentos se utilizaron cultivos en mitad de la fase exponencial de crecimiento (2,5-4 $\mu\text{g Chl/ml}$).

2.1.2. *Escherichia coli*

2.1.2.1. Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas.

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

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

Estirpe	Características	Referencia
K12	Silvestre	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (mK ⁺ , rK ⁻), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , Δ <i>lacU169</i> , (ϕ 80- <i>lacZ</i> Δ M15).	Hanahan, 1983
MC1061	<i>hsdR</i> , <i>mcrB</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>araABC-leu</i>) 7679, Δ <i>lacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i> .	Meissner <i>et al.</i> , 1987
CLR207 <i>RecA</i>	<i>hsdR</i> , <i>mcrB</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>araABC-leu</i>) <i>gltB31</i> , <i>gdhA1</i> , <i>lacY1</i> , <i>gal-6</i> , <i>xyl-7</i> , <i>mtl-2</i> , <i>rpsL9</i> , <i>trp</i> , <i>tonA2</i> , <i>tsx-68</i> , <i>supE44</i> , <i>hsdR</i> , (mK ⁺ , rK ⁻).	Mattaj <i>et al.</i> , 1982
BL21(DE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ cIts857, <i>ind1</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lac UV5-T7 gene1</i>).	Studier y Moffat, 1986

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

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

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

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

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

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

El medio se esterilizaba en autoclave, como ya se ha descrito, excepto las sales de magnesio que se esterilizaban separadamente por filtración y una vez frío se añadían al resto del medio.

Los antibióticos, esterilizados por filtración, se añadían en caso necesario, a las siguientes concentraciones: ampicilina, 100 µg/ml, cloramfenicol 25 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml.

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

2.1.3. Métodos de recogida de células

La recogida de células tanto de cianobacteria como de *E. coli* se hizo por centrifugación, bien en microcentrífuga Eppendorf (12.000 x g, 3 min) bien en centrífuga refrigerada Sorvall (EE.UU.) modelo RC5-C (7.000 x g, 10 min); según el volumen del cultivo, bien a temperatura ambiente o a 4 °C, según se requiriese.

2.2. Determinación de actividades enzimáticas

2.2.1. Ensayo *in vitro* de la actividad glutamato sintasa

2.2.1.2. Ensayo *in vitro* de la actividad glutamato sintasa usando ferredoxina como donador de electrones.

La actividad Fd-GOGAT se determinó cuantificando la formación de glutamato por HPLC, según el método descrito por Marqués *et al.*, 1989.

La mezcla de ensayo contenía en un volumen final de 0,9 ml: 45 μ mol de tampón fosfato potásico pH 7,5; 5 μ mol de glutamina; 1 μ mol de 2-oxoglutarato; 1 μ mol de aminooxiacetato, una cantidad apropiada de extracto libre de células y como transportador de electrones, 10 nmol de ferredoxina. La reacción se inició por la adición de 0,8 mg de ditionito sódico recién disueltos en 0,1 ml de NaHCO₃ 0,12 M y se detuvo tras incubarlo a 30 °C el tiempo indicado, añadiendo 0,25 ml de la mezcla de reacción a 0,15 ml de HCl 1 mM, en hielo. Tras centrifugar a 12.000 x g, 4 min a 4°C, la muestra se neutralizó diluyendo 25 μ l del sobrenadante con 600 μ l de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,5. Una unidad (U) de actividad glutamato sintasa corresponde a la formación de 1 μ mol de glutamato por minuto.

2.2.2. Determinación de la actividad glutamina sintetasa

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

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se estimó según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970). Para el ensayo *in situ*, un volumen de cultivo de células equivalente a 5-10 μ g de clorofila se recogía por centrifugación a 12.000 x g, durante 1 minuto a temperatura ambiente y las células se resuspendían en 0,8 ml de una mezcla de ensayo que contenía: 66,7 μ mol de tampón HEPES-NaOH (pH 7); 40 μ mol de L-glutamina; 4 μ mol de MnCl₂ y 0,5 mmol de ADP. A esta suspensión se le añadieron 0,1 ml de una mezcla recién preparada de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M en proporción 1:1 y 20 μ l de una solución de MTA al 1,25 % en agua, para permeabilizar las células. Después de agitar vigorosamente durante 10 s, la reacción se iniciaba por adición de 50 μ l de una solución Na₂HAsO₄ 0,4 M.

Como testigos (o blancos) se realizaban ensayos en paralelo que contenían agua en lugar de arseniato. La mezcla de reacción se incubaba durante 5 ó 10 min a 30 °C y la reacción se detenía por adición de 2 ml de una disolución de FeCl₃ en medio ácido (7,73 ml de HCl al 37%, 12 g de

ácido tricloroacético y 33,3 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, llevados a un volumen final de 1 l con H_2O); esta solución revela el γ -glutamihidroxamato producido, formándose un producto coloreado cuya concentración se determinaba espectrofotométricamente aplicando un coeficiente de extinción a 500 nm de $0,89 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Shapiro y Stadtman, 1970). Para el ensayo *in vitro* se utilizaba la misma mezcla de ensayo suprimiendo el MTA y añadiendo, en lugar de células, una cantidad apropiada de preparación proteica.

Una unidad de actividad transferasa de la GS se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de γ -glutamihidroxamato por minuto, en estas condiciones de ensayo.

2.2.3. Determinación de la actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa

2.2.3.1. Ensayo *in vitro* de la actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa.

La actividad NADP-isocitrato deshidrogenasa se ensayaba *in vitro* a 30 °C. Para ello se seguía espectrofotométricamente a 340 nm la reducción de NADP a NADPH dependiente de isocitrato (Muro-Pastor y Florencio, 1992). 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 MnCl_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 de actividad NADP-IDH se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de NADP por minuto en estas condiciones de ensayo.

2.3. Métodos de purificación y análisis de proteínas

2.3.1. Aislamiento de heterocistos de *Anabaena* 7120

Para el aislamiento de heterocistos de *Anabaena* 7120 se utilizaron dos métodos diferentes según la finalidad para la cual se requiriesen. Ambos métodos estaban basados en la mayor resistencia que presentan los heterocistos a la rotura en comparación con las células vegetativas.

Cuando se requerían extractos libres de células para ensayos enzimáticos u otras preparaciones proteicas, los heterocistos se aislaban a partir de 5 l de cultivo de *Anabaena* 7120 en condiciones de fijación de nitrógeno. Cuando éstos habían alcanzado la fase exponencial de crecimiento (2,5-4 $\mu\text{g Chl/ml}$), se comprobaba al microscopio la presencia de dichas células en los

filamentos y la proporción de éstos con respecto a las células vegetativas, considerándose como óptimo la presencia de un heterocisto por cada 10 ó 12 células vegetativas. Una vez comprobado que el cultivo se encontrase en estas condiciones, se recogía por centrifugación, a 3500 x g y 4 °C y el sedimento de células se resuspendía en 100 ml de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 14 mM, PMSF 1 mM (tampón A), y se volvía a centrifugar en las condiciones anteriormente descritas. Finalmente el sedimento resultante se resuspendía en tampón A en la proporción de 1 ml tampón A/100 µg Chl.

La suspensión de células resultante se sometía a rotura mediante un paso a través de la prensa de French a 20.000 psi y a continuación se centrifugaba durante 3 min a 150 x g y 4 °C. El precipitado se volvía a resuspender en tampón A y se centrifugaba de nuevo en las mismas condiciones con objeto de eliminar restos celulares. Tras este paso se obtiene un sobrenadante de color verde claro y un precipitado de tonos amarillentos, que considerábamos como preparación de heterocistos aislados. El enriquecimiento en heterocistos de las preparaciones se comprobaba por análisis al microscopio óptico, obteniéndose así preparaciones de heterocistos enriquecidas aproximadamente en un 90%.

Cuando se requerían heterocistos para el posterior aislamiento de RNA, se seguía un método basado en el descrito por Golden *et al.* (1991). Una vez recogidos los 5 l de cultivo como se ha descrito anteriormente, el precipitado de células se resuspendía de forma homogénea en 10 ml de STET (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, Tritón X-100 al 5%, EDTA 1 mM), intentando que no quedasen grumos. Posteriormente se añadía lisozima de huevo de gallina, suministrada por Sigma, a una concentración final de 1mg/ml y la mezcla se sometía a 1 ciclo de agitación vigorosa de 3 min en agitador automático y a posterior rotura por ultrasonidos, utilizando un sonicador Branson (Reino Unido) modelo B12, aplicando una frecuencia de ultrasonidos de 20 KHz a una potencia de 75 W durante 5 min. Tras este proceso, la solución resultante se centrifugaba durante 3 min a 150 x g y 4 °C y el precipitado obtenido se resuspendía en 10 ml de SET (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM) y se volvía a centrifugar a 150 x g y 4 °C. Este último proceso se repetía al menos tres veces, con objeto de minimizar la presencia de restos celulares. El precipitado resultante, se pasaba a tubos Eppendorf, se congelaba en nitrógeno líquido y se mantenía a -80 °C, hasta que se fuera a iniciar la extracción de RNA.

2.3.2. Aislamiento de membranas tilacoidales de *Synechocystis* 6803

Para la obtención de membranas tilacoidales de *Synechocystis* 6803, se siguió el método descrito por Berger *et al.* 1991, con modificaciones. Células de *Synechocystis* 6803 creciendo en frascos de 750 ml en burbujeo continuo, cuando alcanzaban la fase exponencial de crecimiento se

recogían por centrifugación durante 5 min a 7500 x g y 4 °C y se resuspendían a una concentración final de 100 µgChl/ml en tampón HEPES-NaOH 25 mM pH 7, conteniendo: CaCl₂ 15 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 15% (v/v), DMSO 0,5% (v/v), PMSF 1mM, benzamidina 1 mM (tampón T), en hielo y a continuación se añadía a la suspensión DNasa I de páncreas bovino (Boehringer Mannheim, Alemania), a una concentración final de 100 µg/ml. La rotura de las células tenía lugar, mediante agitación vigorosa durante 5 periodos consecutivos de 20 s alternados con periodos de 1 min en hielo en agitador automático, tras la adición de un volumen igual de perlas de vidrio de 0,25-0,3 mm de diámetro (Braun, Melsungen, Alemania) previamente tratadas con agua regia. Las células no rotas y otros restos celulares se eliminaban mediante centrifugación a 5000 x g y 4 °C, durante 10 min. Finalmente el sobrenadante resultante se centrifugaba 10 min a 15000 x g y 4 °C, constituyendo el sedimento la preparación de membranas tilacoidales aisladas.

2.3.3. Expresión de proteínas en *E. coli* desde el vector pET-3a

El sistema de expresión de proteínas con el vector pET-3a (Novagen, Reino Unido) se basa en la clonación del gen que codifica la proteína a expresar bajo el control del promotor del fago T7. Para ello, se usaron células de *E. coli* BL21 (DE3) que porta en el cromosoma el gen que codifica RNAPol del fago T7, bajo el control del promotor *Lac*, dicha construcción es inducible por IPTG. Las células se cultivaban a 37 °C en medio LB con Ap hasta una DO₆₀₀ de 0,5 y a continuación se inducía la expresión del gen por adición de IPTG 1 mM y se mantenía durante 4 h más en condiciones de cultivo, antes de recoger las células.

2.3.4. Preparación de extractos celulares

Los extractos crudos de células de cianobacteria o de *E. coli* se obtuvieron siguiendo dos procedimientos alternativos, según la cantidad de extracto necesario, excepto cuando se trataba de células de *Anabaena* donde se seguía principalmente el método de rotura con nitrógeno líquido.

2.3.4.1. Rotura por ultrasonidos.

Para volúmenes de extractos superiores a 2 ml se utilizó un tratamiento con ultrasonidos. Una vez recogidas las células por centrifugación, se resuspendían en el tampón correspondiente a cada caso, a razón de 5 ml/g células y se suplementaba con PMSF a una concentración final de 1 mM (a partir de una solución 100 mM en isopropanol). Las suspensiones, mantenidas en hielo, se sometían a un tratamiento con ultrasonidos durante 2 min y 30 s en ciclos de 30 s, alternados con

ciclos de 1 min en los que se cesaba el tratamiento, con objeto de evitar un calentamiento excesivo. La frecuencia de los ultrasonidos, producidos por un sonicador Branson (Reino Unido) modelo B12, fue de 20 KHz y su potencia de 75 W. Una vez concluido el tratamiento de rotura, la suspensión celular se sometió a centrifugación durante 15 min a 18.000 x g y 4 °C . El sobrenadante obtenido constituía el extracto crudo libre de células.

2.3.4.2. Rotura con perlas de vidrio.

En el caso de requerir pequeñas cantidades de extracto con objeto de someter las muestras a electroforesis o para determinar actividades enzimáticas, se utilizaba un método de rotura con perlas de vidrio.

Para ello, un volumen de 1 ó 2 ml de cultivo se centrifugaba en tubos Eppendorf y el precipitado celular se lavaba con 200 µl del tampón requerido en cada caso. Tras volver a centrifugar se resuspendía entre 100 y 500 µl del mismo tampón suplementado con 1 mM de PMSF, según la cantidad de células. A esta suspensión se le añadía una cantidad equivalente a 50 µl de perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro; Sigma EE.UU.) por cada 100 µl de tampón. En el caso de extractos de células de cianobacteria se sometía la suspensión celular a 4 periodos consecutivos de 30 s de agitación vigorosa en agitador automático, alternados con periodos de 1 min en hielo. Cuando se trataba de un extracto de células de *E. coli*, el tratamiento consistía en dos periodos de 15 s de agitación vigorosa, alternados con periodos de 30 s en hielo. Los restos celulares se eliminaban por centrifugación durante 10 min a 12.000 x g y 4 °C, constituyendo el sobrenadante el extracto crudo libre de células.

2.3.4.3. Rotura con nitrógeno líquido.

Cuando se requerían extractos de células de *Anabaena* especialmente en los casos en los que se realizaban preparaciones de heterocistos, se seguía el método de rotura con nitrógeno líquido. Las células, una vez recogidas por centrifugación, se resuspendían en un volumen apropiado del tampón correspondiente, se les añadía PMSF a una concentración final de 1 mM y se sometían a congelación con nitrógeno líquido, triturándose en un mortero hasta reducir las a polvo antes de llegar a descongelarse. El polvo de células se recogía en tubos Eppendorf y tras su descongelación se centrifugaba la preparación durante 15 min a 12.000 x g y 4 °C para conseguir el extracto crudo libre de células.

2.3.5. Cuantificación de proteínas por los métodos de Bradford y Lowry

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 cantidades conocidas de ovoalbúmina de gallina como patrón.

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.

2.3.6. Fraccionamiento de proteínas con sulfato de amonio

Los fraccionamientos con sulfato de amonio se hacían añadiendo las cantidades necesarias de sulfato de amonio a las soluciones de proteína e incubando durante 1 h con agitación suave sobre hielo. Posteriormente las preparaciones se centrifugaban a 20.000 x g durante 15 min a 4 °C. En unos casos se seleccionaba el sobrenadante y en otros el precipitado, pero en ambos casos se dializaban antes de ser aplicados a alguna matriz en pasos posteriores de purificación, o bien se sometían a filtración en gel.

2.3.7. Técnicas cromatográficas usadas en la purificación de la tiorredoxina TrxA de *Synechocystis* 6803

Los tampones usados en la purificación de la tiorredoxina TrxA de *Synechocystis* 6803 consistieron siempre en tampones Tris-HCl 30 mM, pH 7,9 y dependiendo del paso de purificación que se estuviera realizando, se suplementaba con NaCl a las concentraciones requeridas.

2.3.7.1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-*Sephacel*.

Se emplearon matrices DEAE-*Sephacel* suministradas por Sigma, (EE.UU.) equilibradas inicialmente con tampón concentrado Tris/HCl 0,5 M (pH 7,5) y reequilibradas posteriormente en la columna con el tampón adecuado (Aptd. 3.2.3.1). Las columnas utilizadas fueron de vidrio y de tamaño variable, según la cantidad de extracto de partida. El flujo de aplicación de las muestras y el de los solventes de lavado y elución se regulaba por medio de una bomba peristáltica Pharmacia Biotech modelo P-1 (Suecia). Las fracciones del eluato se recogían automáticamente con un colector Pharmacia Biotech modelo Frac-100 (Suecia).

2.3.7.2. Cromatografía de filtración en gel *Sephacryl* S-200.

En el caso de la cromatografía de filtración en gel usada como paso de purificación de la tiorredoxina TrxA de *Synechocystis*, se usó una columna de vidrio calibrado de Pharmacia (Suecia) de 1 cm de diámetro por 50 cm de altura, conteniendo un lecho de gel *Sephacryl* S-200 de Pharmacia (Suecia) y equilibrada con tampón Tris-HCl 30 mM, pH 7,9. La salida de la columna estaba conectada a un detector de absorbancia Pharmacia-LKB modelo 486 cuyos datos se procesaron automáticamente mediante un integrador Pharmacia-LKB modelo REC-1. El resto de las condiciones de la cromatografía fueron las descritas en el apartado 2.3.7.1.

2.3.8. Diálisis y cambio de tampones por filtración rápida

La diálisis de las soluciones de proteínas se realizaban en tripas de diálisis Visking® de 3 kDa de corte suministradas por Serva (Alemania). El proceso tenía lugar en dos pasos, el primero de 3-4 h y el segundo de una noche de duración. En ambos casos la muestra se dializaba frente a 100 volúmenes de tampón final.

2.3.9. Concentración de proteínas por ultrafiltración

La concentración de proteínas se realizó por ultrafiltración durante el tiempo requerido en concentradores Amicon (EE.UU.) utilizando membranas de ultrafiltración de 3 kDa de corte suministradas por Millipore (EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.10. Electroforesis y tinción de proteínas

Las separaciones analíticas de proteínas en condiciones desnaturalizantes mediante electroforesis en placa se realizaron en geles de poliacrilamida basados en el sistema de Laemmli (1970) en geles discontinuos (Jovin *et al.*, 1964), utilizando aparatos Vertical Slab Gel Electrophoresis Units modelos SE250 y SE600 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.).

El gel de separación, el de concentración y el tampón de electrodo contenían dodecil sulfato sódico al 0,1 %. La concentración de acrilamida en los geles de separación variaba dependiendo de la masa molecular de la proteína a analizar. Las muestras se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga, que contenía: tampón Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), glicerol al 20 % (v/v), SDS al 4 %, 2-mercaptoetanol al 10 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,0025 %, todo ello en agua destilada.

La desnaturalización de las muestras se llevó a cabo calentando a 100 °C durante 3 min y la electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente.

Se utilizaron como patrones de masas los suministrados por Bio-Rad (EE.UU.) en sus marcas comerciales Molecular Weight Standard High y Low Range[®], que presentan las siguientes proteínas: miosina (200 kDa), β-galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B de músculo de conejo (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa) y ovoalbúmina de gallina (45 kDa), en High Range[®], y 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), en Low Range[®]. Para la determinación de las masas moleculares se representaba 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 así una curva patrón.

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

2.3.12. Técnicas inmunológicas

2.3.12.1. Obtención de suero de conejo contra la tiorredoxina TrxA de *Synechocystis*.

Aproximadamente 1 mg de la proteína TrxA purificada hasta homogeneidad se diluyó hasta 0,5 ml con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,9) y se le añadió una cantidad equivalente de adyuvante incompleto de Freund. Se homogeneizó la suspensión hasta conseguir una emulsión uniforme y se inyectó en varios puntos del cuerpo de un conejo albino neozelandés de aproximadamente 1,5 kg de peso, de forma subcutánea. Transcurridos 35 días de esta primera inmunización se realizaron nuevas inyecciones subcutáneas, con 0,5 mg de enzima purificada cada una y preparada de la misma forma que se ha descrito previamente. A los 15 días de la última inyección de antígeno, se realizó la extracción de sangre al conejo. Tras coagulación y centrifugación de la sangre a 12.000 x g, 15 min a 4 °C, se tomó el sobrenadante y se procedió a la inactivación del complemento por calentamiento a

55 °C durante 15 min, tras lo cual se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, constituyendo el sobrenadante el suero inmune.

2.3.12.2. Inmunodetección de proteínas mediante *western blot*.

Las muestras de proteínas sometidas a electroforesis se detectaron mediante inmunorreacción con anticuerpos policlonales monoespecíficos. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transferían a membranas de nitrocelulosa Bio-Rad (EE.UU.) de 0,45 µm de diámetro de poro, en un sistema de transferencia semiseco de Pharmacia (Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevaba a cabo a temperatura ambiente durante 1 h y 30 min a 0,8 mA por cm² de gel utilizando como tampón de electrodo: Tris 5,89 g/l, glicina 2,93 g/l, SDS 0,375 g/l y metanol al 20% (v/v). El proceso de transferencia se comprobaba mediante el empleo en la electroforesis de patrones de masa molecular preteñidos. Seguidamente la membrana se incubaba durante dos horas en una solución bloqueante de leche desnatada en polvo Molico-Sveltesse de Nestlé (España) al 5% (p/v) en tampón TBS (Tris/HCl 15 mM (pH 7,4) y NaCl 0,2 M). A continuación se incubaba la membrana con el antisuero correspondiente diluido en solución de bloqueo durante 1,5 h a temperatura ambiente y agitación constante. Se sometía la membrana a cuatro lavados de 15 min cada uno en tampón TBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (v/v) y se incubaba la misma con una solución de anticuerpos (inmunoglobulina G) de oveja anti-inmunoglobulina G de conejo, conjugados con peroxidasa de rábano de Sigma (EE.UU.) diluidos (1:2.000) en solución de lavado durante dos horas a temperatura ambiente y agitación constante. A continuación se repetía el proceso de lavado descrito anteriormente y se revelaba mediante el sistema ECL de Amersham (Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4. Métodos de manipulación y análisis de DNA y RNA

2.4.1. Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Los plásmidos utilizados no construidos en este trabajo se detallan en la Tabla 4. Los plásmidos usados y construidos en este trabajo que contienen DNA de *Anabaena* se detallan en la Tabla 5 y los que contienen genes de *Synechocystis* se detallan en la Tabla 6. Los oligonucleótidos usados para las amplificaciones de PCR sobre DNA de *Anabaena* se detallan en la Tabla 7, y los usados sobre DNA de *Synechocystis* se detallan en la Tabla 8, algunos de ellos fueron usados también en reacciones de secuenciación o de extensión de cebadores.

Tabla 3. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencias
pBlueScript II SK(+)	Ap ^r , oriF1 colE1ori, lacZ	Stratagene
pRL161	Ap ^r , Km ^r , (<i>npt</i> de Tn5), derivado de pBR322, utilizado para obtener la casete C.K1	Elhai y Wolk, 1988
pRL171	Ap ^r , Cm ^r , (<i>cat</i> de pKT210), derivado de pBR322, utilizado para obtener la casete C.C1	Elhai y Wolk, 1988
pGEM-T	Ap ^r , oriF1 colE1ori, lacZ, diseñado para clonar productos de PCR	Promega
pET-3a	Ap ^r , ori de pBR322, promotor T7	Novagen
pFNT4	Contiene el gen <i>trxA</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	Navarro y Florencio, 1996
pGS2.4	Contiene el gen <i>glnN</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	García-Domínguez <i>et al.</i> , 1996
pAV1100	Contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Synechocystis</i> 6803	Vioque, 1992
pAV2000	Contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Anabaena</i> 7120	Vioque, 1992

Tabla 4. Plásmidos construidos en este trabajo conteniendo DNA de *Anabaena* 7120.

Plásmido	Características
pGLSF1	Fragmento de PCR de 1,2 kb del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> 7120 sintetizado con los oligonucleótidos <i>pfn1</i> y <i>pfn2</i> , clonado en el sitio <i>EcoRV</i> de pBS
pGLSF2	Fragmento <i>HpaII</i> de 4,5 kb conteniendo parte del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> 7120, clonado en el sitio <i>ClaI</i> de pBS
pGLSF3	Fragmento <i>EcoRV</i> de 5,3 kb conteniendo parte del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el sitio <i>EcoRV</i> de pBS
pGLSF4	Fragmento <i>EcoRI</i> de 2,2 kb de pGLSF3 clonado en el sitio <i>EcoRI</i> de pBS. Contiene el único sitio <i>EcoRI</i> que presenta el gen <i>glsF</i>
pGLSF5	Fragmento <i>EcoRI-XhoI</i> de 5,9 kb procedente de la unión de pGLSF4 y pGLSF5, por el sitio único <i>EcoRI</i> de <i>glsF</i> clonado en pBS. Contiene la secuencia completa del gen <i>glsF</i>
pGLSF6	Fragmento de 1,4 kb conteniendo la región promotora del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>gls1</i> y <i>gls8</i> . Clonado en pGEM-T

Tabla 5. Plásmidos construidos en este trabajo conteniendo DNA de *Synechocystis* 6803.

Plásmido	Características
pTXA1	Fragmento de PCR de 560 pb conteniendo el gen <i>trxA</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>txaNde</i> y <i>txaBHI</i> , clonado en pET-3a
pTXA2	Fragmento de PCR de 710 pb conteniendo el gen <i>trxA</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>txaNdeI</i> y <i>txaXhoI</i> , clonado en pGEM-T
pPEJ1	Fragmento de PCR de 423 pb conteniendo el gen <i>petJ</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>pejNdeI</i> y <i>pejSall</i> , clonado en pGEMT
pPJCK1	Derivado de pPEJ1 contiene la casete C.K1 delante del promotor del gen <i>petJ</i> en el sentido contrario a éste
pTXA3	Derivado de pTXA2, contiene la casete C.K1 y el promotor del gen <i>petJ</i> delante del gen <i>trxA</i> . El promotor del gen <i>petJ</i> en el mismo sentido que el gen <i>trxA</i>
pTXA4	Delección del fragmento <i>HincII-XhoI</i> de pFNT4
pTXA5	Derivado de pTXA4, contiene insertado en los sitios <i>HincII</i> y <i>XhoI</i> , la casete C.K1, el promotor del gen <i>petJ</i> y el gen <i>trxA</i>
pTXA6	Derivado de pFNT4, contiene insertado en el sitio <i>EcoRI</i> la casete C.C1 en el mismo sentido que el gen <i>trxA</i>
pTXA7	Derivado de pGS2.4, contiene insertado en el sitio <i>EcoRI</i> la construcción que lleva el casete C.C1 en el mismo sentido que el gen <i>trxA</i>
pTXC1	Fragmento de PCR de 1170 pb conteniendo el gen <i>trxC</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>txcHdIII</i> y <i>txcXhoI</i> , clonado en pBS
pTXC2(+/-) ^a	Derivado de pTXC1, contiene insertado en los sitios <i>HincII</i> del gen <i>trxC</i> , el casete C.C1
pTXC3	Fragmento de PCR de 374 pb conteniendo el gen <i>trxC</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>txcNde</i> y <i>txcBHI</i> , clonado en pET-3a
pTXQ1	Fragmento de PCR de 631 pb conteniendo el gen <i>trxQ</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>txqBHI</i> y <i>txqHdIII</i> , clonado en pBS
pTXQ2(+/-) ^a	Derivado de pTXQ1, contiene insertado en el sitio único <i>RsaI</i> del gen <i>trxQ</i> , el casete C.K1
pTXB1	Fragmento de PCR de 959 pb conteniendo el gen <i>trxB</i> sintetizado con los oligonucleótidos <i>txbSacI</i> y <i>txbXhoI</i> , clonado en pBS
pTXB2(+/-) ^a	Derivado de pTXB1, contiene insertado en el sitio único <i>BamHI</i> del gen <i>trxB</i> , el casete C.K1

(+/-)^a indica el sentido de inserción de los casetes C.C1 y C.K1 en relación al sentido de transcripción de los respectivos genes.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo sobre DNA de *Anabaena*.

Oligonucleótido	Características
pfn1 y pfn2	Utilizados para amplificar un fragmento interno del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> 7120. (Navarro <i>et al.</i> , 1995)
gls1-gls7	Utilizados en las reacciones de secuenciación del gen <i>glsF</i> de <i>Anabaena</i> 7120
glspl	Utilizado en las reacciones de secuenciación del gen <i>glsF</i>
gls8	Utilizado en las reacciones de secuenciación del gen <i>glsF</i> . Usado junto con <i>glspl</i> para amplificar la región promotora del gen <i>glsF</i>

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo sobre DNA de *Synechocystis*.

Oligonucleótido	Características
txaNdeI y txabHI	Utilizados para amplificar el gen <i>trxA</i> de <i>Synechocystis</i> . Tienen creado un sitio <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i> respectivamente para clonar el gen en el vector pET-3a
txaXhoI	Utilizado junto con txaNdeI para amplificar el gen <i>trxA</i> . Tiene creado un sitio <i>XhoI</i> para clonar el gen en el vector pGEM-T
pejNde1 y pejNde2	Utilizados para amplificar mediante PCR el gen <i>petJ</i> de <i>Synechocystis</i> . Ambos tienen creado un sitio <i>NdeI</i> para clonar el gen en pGEM-T
txcHdIII y txcXhoI	Utilizados para amplificar el gen <i>trxC</i> de <i>Synechocystis</i> . Tienen creado un sitio <i>HindIII</i> y <i>XhoI</i> respectivamente para clonar el gen <i>trxC</i> en pBS
txcNdeI y txcBHI	Utilizados para amplificar el gen <i>trxC</i> . Tienen creado un sitio <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i> respectivamente para clonar el gen <i>trxA</i> en el vector pET-3a
txqBHI y txqHdIII	Utilizados para amplificar el gen <i>trxQ</i> de <i>Synechocystis</i> . Tienen creado un sitio <i>BamHI</i> y <i>HindIII</i> respectivamente para clonar el gen en pBS
txbSacl y txbXhoI	Utilizados para amplificar el gen <i>trxB</i> de <i>Synechocystis</i> . Tienen creado un sitio <i>SacI</i> y <i>XhoI</i> respectivamente para clonar el gen en pBS
psbA1 y psbA2	Utilizados para amplificar el gen <i>psbA2</i> de <i>Synechocystis</i> 6803
psaA1 y psaA2	Utilizados para amplificar el gen <i>psaA</i> de <i>Synechocystis</i> 6803
psaC1 y psaC2	Utilizados para amplificar el gen <i>psaC</i> de <i>Synechocystis</i> 6803
petJ1 y petJ2	Utilizados para amplificar el gen <i>petJ</i> , (de la Cerda, 1999)
petE1 y petE2	Utilizados para amplificar el gen <i>petE</i> , (de la Cerda, 1999)

2.4.2. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala, se empleó el método de lisis por ebullición originalmente descrito por Holmes y Quigley (1981), consistente en la lisis de las células mediante hervido en presencia de Tritón X-100. Todo el proceso se realizaba según describe Sambrook *et al.*, (1989).

Cuando se quería eliminar el contenido de RNA se realizaba un tratamiento de 30 min a 37 °C con RNasa A de páncreas bovino (Boehringer Mannheim, Alemania), a una concentración final de 20 µg/ml, seguido de extracción con fenol:cloroformo. En otros casos en los que una preparación de DNA se iba a someter a electroforesis tras digestión con enzimas de restricción, el tratamiento con RNasa, previo a la electroforesis, era de 15 min, y en estos casos no se fenolizaban las muestras.

2.4.3. Aislamiento de DNA total de cianobacterias

El aislamiento de DNA total de cianobacterias se llevó a cabo según el método descrito por Cai y Wolk (1990), basado en la rotura de las células con perlas de vidrio.

Células procedentes de 50 ml de cultivo en medio BG11 o derivados se recogieron por centrifugación (6.000 x g, 10 min) y se resuspendieron en 400 µl de tampón T0,1E (Tris-HCl 10 mM; EDTA 0,1 mM, pH 7,5). A la suspensión celular se le añadieron 150 µl de perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro; Sigma, Alemania), tratadas previamente con agua regia y horneadas, 20 µl de una solución de SDS al 10 % y 450 µl de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v). La suspensión se sometió a continuación a 10 ciclos de 1 min de agitación vigorosa intercalados con ciclos de 1 min de incubación en hielo. El lisado se centrifugó (12.000 x g, 15 min, 4 °C) y se sometió el sobrenadante a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). El DNA se precipitó finalmente con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, en presencia de acetato sódico a una concentración final de 0,3 M (pH 5,2).

2.4.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se llevaban a cabo en un aparato Mastercycler 5330 de Eppendorf (Alemania). Cada reacción de PCR se realizaba en un volumen de 50 µl que contenía 2,5 U de *taq* polimerasa (Boehringer, Alemania), tampón *taq* 1x suministrado con la enzima (la concentración final de MgCl₂ era 1,5 mM), dNTP a concentración final de 0,2 mM cada uno, 1,5 ng de DNA molde y 50 pmol de cada oligonucleótido.

Típicamente se realizaba un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de reacción y un ciclo final de polimerización a 72 °C durante 10 min. Cada ciclo de reacción constaba de una etapa de desnaturalización a 95 °C (1 min), una etapa de renaturalización a 42-60 °C (1-2 min) y una etapa de polimerización a 72 °C (1-2 min). Los fragmentos de DNA así amplificados se sometían a electroforesis en geles de agarosa y se purificaban según lo descrito en el apartado 24.2.5. de esta sección.

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR usados para la expresión heteróloga de proteínas fueron secuenciados para comprobar que la *taq* polimerasa no había introducido errores.

2.4.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

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

Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA sometidos a electroforesis, se emplearon como marcadores los fragmentos procedentes de la digestión del fago λ con *HindIII* o con *HindIII* y *EcoRI* o bien la escalera de 1 kb suministrada por Gibco-BRL (España).

Tras la electroforesis los geles, que incluían bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml, se analizaron y fotografiaron por iluminación con luz ultravioleta de 302 nm, usando un aparato de vídeo UVP ImageStore 5000 de SONY.

2.4.6. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Para aislar fragmentos de DNA de geles de agarosa se usaron membranas de DEAE-celulosa (Schleicher & Schuell, Alemania). Las membranas se recortaban y se equilibraban brevemente en TBE 0,5x, tras lo cual se introducían en una hendidura abierta en el gel con un bisturí por debajo de la banda de DNA a aislar y se proseguía la electroforesis durante 10 min más. Una vez incorporado todo el DNA a la membrana la elución se efectuaba incubando ésta en tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 1 M durante 30 min a 68 °C. Tras la elución, y una vez

retirada la membrana, la solución se sometía a extracción con fenol:cloroformo y el DNA se precipitaba con acetato sódico y etanol como se describe en el apartado 2.4.8. de esta sección.

2.4.7. Construcción de una genoteca parcial de DNA genómico

Para clonar fragmentos de DNA genómico identificados por hibridación en experimentos de *Southern blot* se procedió del siguiente modo: una vez identificado el tamaño aproximado de la banda de hibridación obtenida sobre una digestión de DNA genómico con una determinada enzima de restricción, se preparaba una nueva digestión con dicha enzima y se sometía a electroforesis. Se aislaba una porción del gel que incluía los fragmentos de DNA del tamaño previamente determinado y se cortaba en varias lonchas. Una vez extraído el DNA de las distintas lonchas, parte de las muestras se sometían nuevamente a electroforesis, seguida de *Southern blot*, para identificar qué loncha contenía el fragmento de interés. El resto de la preparación de DNA de la fracción identificada como positiva se ligaba a plásmido pBS abierto con la enzima de restricción correspondiente y se transformaban células de *E. coli* MC1061, seleccionándose la resistencia a ampicilina. Esta estirpe carece de los sistemas de restricción que degradarían el DNA exógeno. Aproximadamente 500 colonias transformantes se replicaban en cajas nuevas y en filtros colocados sobre cajas nuevas. Los filtros se hibridaban como se describe en el apartado 2.4.9. de esta sección y una vez identificados los clones positivos, se recuperaba el DNA plasmídico de las réplicas.

2.4.8. Marcaje radiactivo de moléculas de DNA

Los fragmentos de DNA a utilizar como sondas en los experimentos de *Southern blot* y *northern blot* se marcaron con el método *Ready To Go* (Pharmacia, Suecia) de extensión de cebadores de secuencia aleatoria. Aproximadamente 100 ng de DNA desnaturalizado se marcaban radiactivamente, utilizando 20-30 mCi de 5' [α - 32 P]dCTP (3000 mCi/mmol) suministrado por New England Nuclear (Reino Unido), en un volumen de 50 μ l. El exceso de nucleótidos no incorporados se eliminaba mediante filtración de las muestras a través de columnas de *Sephadex* G-50.

El marcaje radiactivo de los oligonucleótidos usados en los experimentos de extensión de cebadores se realizó utilizando la polinucleótido quinasa del fago T4, con la siguiente mezcla de reacción: 1 μ l de solución de oligonucleótido (200 a 250 ng), 5 μ l de [γ - 32 P]dATP (10 μ Ci/ μ l), 2 μ l de tampón 10x de polinucleótido quinasa (Tris/HCl 0,5 M pH 7,6, MgCl₂ 0,1, DTT 50 mM, espermidina 1 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) (Sambrook et al., 1989), 11 μ l de H₂O y 1 μ l de T4 polinucleótido quinasa (9 U/ μ l) (Boehringer Mannheim, Alemania). Tras incubar 1 h a 37 °C, el exceso de nucleótidos no incorporados se eliminaba mediante filtración de las muestras a través de

columnas de *Sephadex* G-25. El eluato de las columnas se llevaba hasta un volumen de 100 μ l con H₂O, se sometía a extracción con fenol:cloroformo (1:1), se precipitaba con 1/10 de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol y se centrifugaba, secándose a continuación durante algunos minutos. Tras resuspender en 20-30 μ l de H₂O tratada con DEPC se cuantificaba la radiactividad incorporada utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman modelo 2800).

2.4.9. Detección de fragmentos de DNA mediante *Southern blot*

La hibridación de DNA fijado a filtros de nylon con sondas marcadas radiactivamente se llevó a cabo según Ausubel *et al.* (1996). Para ello, una vez realizada la electroforesis del DNA en gel de agarosa al 0,7%, éste se sumergía durante 15 min con agitación suave en una solución de HCl 0,25 N para despurinizar parcialmente el DNA, tras lo cual se lavaba con agua destilada y se incubaba durante una hora en una solución desnaturalizante de NaOH 0,5 N y de NaCl 1,5 M, manteniéndose en agitación suave. A continuación se procedía a la transferencia del DNA a filtros de nylon Zeta-Probe suministrados por Bio-Rad (EE.UU.), utilizándose un aparato de transferencia por vacío TransVacTE80 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.), y siguiendo las instrucciones del fabricante, terminada la cual se incubaba el filtro durante dos horas a 80 °C en un horno.

Los filtros se prehibridaban durante 30 minutos con una solución compuesta por: tampón fosfato sódico 0,5 M pH 7,2, EDTA 10 mM y SDS al 7% (p/v). Transcurrido el tiempo de prehibridación se añadía la sonda de DNA marcado radiactivamente y se llevaba 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 DNA a hibridar.

Los filtros una vez hibridados se lavaban con agitación moderada durante 30 min a temperatura ambiente y otros 30 min a la temperatura de hibridación con una solución compuesta por: tampón fosfato sódico 40 mM pH 7,2 y SDS al 1% (p/v). Tras los lavados, los filtros se exponían y analizaban en un aparato de autorradiografía Cyclone Storage Phosphor System (Packard) donde las áreas radiactivas eran cuantificadas, posteriormente los filtros se sometían a autorradiografía a -80 °C con películas Kodak X-OMAT-AR (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 revelaba la película empleando reactivos reveladores y fijadores suministrados por Valca (España), según las instrucciones del fabricante.

Para la hibridación de colonias de *E. coli* se usaban filtros Nucleopore 85 MM (EE.UU.) colocados sobre cajas de medio LB en los que se replicaban las células de *E. coli* a analizar. La lisis de las células se llevaba a cabo por incubación de los filtros secuencialmente sobre papeles

Whatman 3MM humedecidos con las siguientes soluciones y durante los tiempos indicados: SDS al 10% (3 min); NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M (5 min); NaCl 1,5 M, Tris-HCl 0,5 M pH 7,4 (5 min); SSC 2x (5 min). A continuación se calentaban en un horno a 80 °C durante 1-2 h, y posteriormente se humedecían con SSC 2x y se lavaban 30 min a 50 °C en una solución con SSC 5x, SDS al 0,5% y EDTA 1 mM pH 8,0. Antes de prehibridar se limpiaban bien los filtros frotándolos suavemente con un papel humedecido en la solución de lavado para eliminar los restos celulares. La hibridación se efectuaba del mismo modo que para fragmentos de DNA sometidos a electroforesis excepto que la solución de hibridación contenía SDS a una concentración final del 0,1% (p/v). Los lavados de las hibridaciones heterólogas consistían en 4 lavados de 5 min a temperatura ambiente con SSC 2x y SDS al 0,1% y un lavado de 15 min a 55 °C con SSC 1x y SDS al 0,1%.

2.4.10. Secuenciación de DNA

La secuenciación se llevaba a cabo siguiendo el método descrito por Sanger *et al.*, (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 [α -³⁵S]dATP (1.212 mCi/ μ mol) suministrado por New England Nuclear (Reino Unido). Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos comerciales "Reverse primer" y "M13-20 primer", suministrados por Boehringer Mannheim (Alemania), adecuados para secuenciar plásmidos derivados de pBlueScript, o bien algunos de los oligonucleótidos descritos en las Tablas 7 y 8. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el conjunto de reactivos denominados *Sequenase* versión 2.0, suministrado por United States Biochemical (EE.UU.). Se siguieron las instrucciones del fabricante excepto en la eliminación del hidróxido sódico utilizado para la desnaturalización del DNA molde, que se realizó por filtración a través de columnas de *Sephadex* G-50 previamente equilibradas en tampón T0,1E.

Los productos de las reacciones de secuenciación se separaron en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) (acrilamida:bisacrilamida, 29:1) conteniendo 4,68 M de urea en tampón TBE 1x. Se empleó un aparato de electroforesis modelo SE 1500, suministrado por Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, y la electroforesis se desarrolló entre 50 y 60 °C de temperatura, a una intensidad constante de 50 mA. El producto de una misma reacción se dividía en tres partes que se sometían a electroforesis de distinta duración, con lo cual se conseguía determinar en cada caso una secuencia de al menos 300 bases.

Terminada la electroforesis los geles se transferían a papel Whatman 3 MM y se secaban utilizando un secador de geles Drygel Sr. modelo SE1160 de Hoefer Scientific Instruments

(EE.UU.). La autorradiografía se realizaba con películas Kodak X-OMAT-AR, en carcasas de exposición Sigma (EE.UU.) a temperatura ambiente y se revelaba como se describe en el apartado anterior.

2.4.11. Manipulaciones enzimáticas del DNA

Las digestiones de DNA se llevaban a cabo con endonucleasas de restricción suministradas por Boehringer Mannheim (Alemania) y por Amersham (Reino Unido). La desfosforilación de los extremos de vectores abiertos con enzimas de restricción se realizaba por tratamientos con fosfatasa alcalina de intestino de ternera suministrada por Boehringer Mannheim (Alemania). Para obtener extremos romos en fragmentos de DNA cortados con enzimas de restricción que dejaban extremos 5' colgantes se utilizaban tratamientos de relleno con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* suministrado por Promega (EE.UU.). Para obtener extremos romos tras digestión con enzimas de restricción que dejaban extremos 3' colgantes se utilizaba la actividad exonucleasa de la polimerasa del fago T4 suministrada por Pharmacia (Suecia). Las ligaciones de fragmentos de DNA se llevaban a cabo por tratamientos con la ligasa de DNA del fago T4 suministrada por Promega (EE.UU.). En todos los casos los tratamientos se hicieron conforme a las instrucciones de las firmas suministradoras.

2.4.12. Transformación de células de *E. coli* con plásmidos

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 con agitación vigorosa hasta alcanzar una DO_{580} de entre 0,45 y 0,65.

Tras mantener el cultivo en hielo durante 15 min las células se recogían por centrifugación (15 min, 750 x g, 4 °C) y se resuspendían en 33 ml de solución RF1 fría [tampón acetato potásico 30 mM (pH 5,8), RbCl₂ 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM y glicerol al 15% (v/v)] esterilizada por filtración. Tras mantener la solución en hielo durante 30 min, se repetía el proceso de centrifugación anterior y se resuspendían las células en 8 ml de solución RF2 fría [tampón MOPS-NaOH 10 mM (pH 7,0), RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 25 mM y glicerol al 15% (v/v)]. Las células así preparadas se conservaban a -70 °C en alícuotas de 200 µl. La competencia de las células se comprobaba transformándolas con cantidades conocidas de DNA plasmídico, obteniéndose en torno a 10⁷ transformantes/µg de DNA.

Para transformar las células competentes, el DNA transformante (máximo 20 μ l) se mezclaba suavemente con una alícuota de células competentes descongelada en hielo. Tras incubar 30 min en hielo la mezcla se sometía a choque térmico de 2 min a 42 °C. Tras mantener la suspensión 5 min a temperatura ambiente se le añadían 0,8 ml de medio LB y se incubaba durante una hora a 37 °C. A continuación las células se sembraban en medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes.

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



2.4.13. Transformación de células de *Synechocystis* 6803

Synechocystis 6803 posee un sistema natural por el cual es capaz de introducir al interior celular moléculas de DNA que se encuentran en el medio de cultivo. Una vez dentro, si estas moléculas de DNA presentan homología con alguna secuencia del genoma, es capaz de integrarlas mediante recombinación. En esta propiedad se basa el sistema de mutación de genes y de introducción de fragmentos de DNA exógeno en *Synechocystis* 6803. Si un fragmento de DNA (DNA exógeno o casete de resistencia a antibiótico) se encuentra flanqueado por secuencias homólogas a secuencias del genoma, se establece un proceso de recombinación poco caracterizado por el cual dicho fragmento de DNA es incorporado en al menos una copia cromosómica.

El método de transformación de *Synechocystis* 6803 se basa en el descrito por Chauvat *et al.* (1986). Las células se crecían hasta una DO_{580} de 1. Un volumen de 40 ml de cultivo se recogía por centrifugación y las células se lavaban 2 veces con medio fresco para eliminar posibles nucleasas extracelulares. Tras los lavados las células se resuspendían en 1 ml de medio fresco que se distribuía en alícuotas de 200 μ l, en tubos de poliestireno-cristal de 5 ml suministrados por Soria Greiner S.A. (España), que contenían el DNA. Cada transformación se realizaba típicamente con 2 μ g de DNA resuspendido en T0,1E. La mezcla de células y DNA se incubaba durante 1,5 h en condiciones normales de iluminación y se sembraba en cajas frescas de medio BG11c, sin antibióticos, sobre filtros Nucleopore 85 MM (EE.UU.). Tras un período de 20 h en condiciones de cultivo, para permitir la expresión de la resistencia conferida por el DNA exógeno, los filtros se pasaban a cajas conteniendo el antibiótico pertinente, usándose una concentración de 20 μ g/ml en el caso del Cm y de 50 μ g/ml en el caso de la Km. Las colonias transformantes aparecían a los 7-9

días. En rondas posteriores de réplicas para forzar la segregación de las copias cromosómicas mutantes se aumentaba la concentración de Cm a 40 µg/ml y la de Km a 200 y 500 µg/ml.

2.4.14. Cuantificación de DNA y RNA

La cantidad de DNA se estimaba normalmente tras electroforesis de una fracción 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 DNA de la muestra, se comparaba con la emitida por las moléculas intercaladas en cantidades conocidas de fragmentos de restricción de DNA del fago lambda también incluidos en el gel y usados como patrones de tamaño.

Alternativamente, el DNA y el RNA se cuantificaban en base a su absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a 50 µg/ml de DNA bicatenario o a 20 µg/ml de oligonucleótido, y en el caso del RNA, a 40 µg/ml.

2.4.15. Aislamiento de RNA total de cianobacteria

2.4.15.1. Aislamiento de RNA total de células de *Synechocystis* 6803 y de células vegetativas de *Anabaena* 7120.

El RNA total de células de cianobacteria se aisló del siguiente modo: muestras de 30 ml de cultivos en mitad de la fase exponencial de crecimiento (~3 µg Chl/ml) se recogían por centrifugación y las células se resuspendían en 370 µl de STET (NaCl 0,1 M, Triton X-100 al 5%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0) a los que se añadieron 70 µl de arcilla Bentone MA Rheological additive (Rheox, Livingston, Reino Unido) al 3% (p/v) en T0,1E, 370 µl de fenol:cloroformo (1:1, v/v) y 150 µl de perlas de vidrio de 0,25-0,3 mm de diámetro (Braun, Melsungen, Alemania) tratadas previamente con agua regia y horneadas. La mezcla se sometía a 10 ciclos de 1 min de agitación en agitador automático y 1 min de incubación en hielo, tras lo cual se centrifugaban a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se desproteinizaban tratándolos tres veces con fenol:cloroformo, y los ácidos nucleicos se precipitaban incubando durante 1 h a -20 °C con 1/5 de volumen de LiCl 10 M y 2,5 volúmenes de etanol. Una vez secos, los precipitados se resuspendían en 50 µl de tampón T0,1E conteniendo SO₄Mg 10 mM y 10 U de DNasaI libre de RNasa de Boehringer (Alemania) y se incubaban durante 45 min a 30 °C. Tras el tratamiento con DNasa, las muestras se sometían nuevamente a extracción con fenol:cloroformo y a

precipitación con acetato de sodio y etanol. Los precipitados de RNA se resuspendían en 20-30 μ l de H₂O tratada con DEPC.

2.4.15.2. Aislamiento de RNA total heterocistos de *Anabaena* 7120.

Para el aislamiento de RNA total de estas células, partíamos de heterocistos aislados como se describe en el apartado 2.3.1. Una vez descongeladas las células se resuspendían en 600 μ l de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH8, EDTA 1 mM, pH8) y a continuación se añadían 130 μ l de cloroformo y se incubaba en hielo durante 5 min. Posteriormente se centrifugaba durante 5 min a 12.000 x g a 4 °C y se eliminaba con la pipeta el cloroformo acumulado en el fondo del tubo. En este momento se añadían 400 μ l de STET, 24 μ l del inhibidor de RNasa, VRC suministrado por Boehringer (Alemania), 400 μ l de fenol:cloroformo (1:1, v/v) y 300 μ l de perlas de vidrio de 0,25-0,3 mm de diámetro (Braun, Melsungen, Alemania) tratadas como se describe en el apartado anterior. La mezcla se sometía a 3 ciclos de 3 min de agitación en agitador automático y 3 min de incubación en hielo, tras lo cual se centrifugaba a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se sometía a precipitación, incubando durante 1 h a -20 °C con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol frío. Una vez secos, los precipitados se resuspendían en 260 μ l de VRC 10 mM, tratándolos posteriormente dos veces con fenol:cloroformo y dos con cloroformo, precipitando los ácidos nucleicos con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol frío. Una vez secos, los precipitados se resuspendían en 30 μ l de tampón T0,1E y se trataban con DNasaI libre de RNasa Boehringer (Alemania) como se describe en el apartado anterior. Tras el tratamiento con DNasa, las muestras se sometían nuevamente a extracción con fenol:cloroformo y a precipitación con acetato de sodio y etanol. Los precipitados de RNA se resuspendían en 20-30 μ l de H₂O tratada con DEPC.

2.4.16. Detección de mRNAs mediante *northern blot*

El RNA total de cianobacteria se sometía a electroforesis según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 1% preparados en tampón MOPS (MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, EDTA 0,5 mM) y conteniendo bromuro de etidio (0,25 μ g/ml) y formaldehído al 1,9%. Las electroforesis se llevaban a cabo en aparatos GNA-100 o GNA-200 suministrados por Pharmacia (Suecia). Las muestras, con un volumen final de 27 μ l, contenían: 7 μ l (15-20 μ g) de RNA, 1,4 μ l de tampón MOPS 10x, 4,9 μ l de formaldehído al 37% y 14 μ l de formamida desionizada. Tras la electroforesis los geles se fotografiaban con luz ultravioleta como se describe en el apartado 4 de

esta sección, y se sometían a 3 períodos de lavado durante 15 min en agua destilada a 65 °C, para eliminar el formaldehído, equilibrándose a continuación en tampón SSPE 10x (SSPE 1x contiene NaCl 0,36 M, fosfato sódico 0,02 M, EDTA 2 mM, pH 7,7) sumergiendo el gel en dicho tampón 2 veces durante 20 min cada vez. A continuación el RNA se transfería 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. La transferencia se llevaba a cabo durante 1 h y 30 min, utilizando NaOH 50 mM como solución de transferencia.

El proceso de hibridación se llevaba a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante de las membranas HybondTM-N⁺ (Amersham) empleadas en estos experimentos. Los filtros se prehibridaban, hibridaban y lavaban, tal y como se describe en el apartado 2.4.9 para el *Southern*. Tras los lavados los filtros se sometían a cuantificación de las áreas radiactivas y autorradiografía del mismo modo descrito para los filtros de *Southern*.

Cuando se quería reutilizar un filtro, la sonda de la hibridación anterior se eliminaba por hervido del filtro durante 5 min en una solución de SDS al 0,5%.

Como control de la cantidad de RNA cargada en los geles, todos los filtros se hibridaban con una sonda del gen *rnpB* obtenida desde el plásmido pAV1100 en el caso de *Synechocystis* 6803 y desde el plásmido pAV2000 en el caso de *Anabaena* 7120 (Vioque, 1992). Todas las representaciones de cantidades relativas de RNA presentadas en este trabajo, están corregidas en base a los valores de las hibridaciones con la sonda del gen *rnpB*.

2.4.17. Determinación de las vidas medias específicas de los mRNA

Con objeto de determinar efecto de la luz *versus* oscuridad en la estabilidad de los transcritos. Se detuvo la síntesis de RNA en las células de *Synechocystis* por la adición a los cultivos de rifampicina a una concentración final de 200 µg/ml, procediendo al posterior aislamiento de RNA total, como se describe en el apartado 2.4.15.1. de esta misma sección. La disminución en el nivel de los transcritos fue seguida mediante hibridación por *northern blot*, estimando las vidas medias de los transcritos por representación de los niveles de éstos frente al tiempo.

2.5. OTROS MÉTODOS

2.5.1. 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 centrifuga Eppendorf, y el sedimento se resuspendía en 1 ml de metanol absoluto. Tras agitar vigorosamente durante 2 min, la preparación se centrifugaba durante 4 min a 12.000 x g, determinándose la concentración de clorofila en el sobrenadante sobre la base de su absorbancia a 665 nm, y teniendo en cuenta un coeficiente de extinción de 74,46 mg⁻¹·ml·cm⁻¹.

2.5.2. Medidas espectrofotométricas

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

2.5.3. Determinación de ficobiliproteínas, ficocianina y ficoeritrina

Para determinar el contenido en ficobiliproteínas de las muestras de células de cianobacteria se utilizó el método descrito por Siegelman y Kycia en 1978. Las muestras de células se resuspendían en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,9, a una concentración final de clorofila de 8 µg/ml, se sonicaban durante 60 s como se describe en 2.3.4.1 y se centrifugaban durante 15 min a 18.000 x g y 4 °C. La concentración ficobiliproteínas se calculaba en el sobrenadante obtenido mediante medidas de la absorbancia a 562, 615, 652 y 730 nm (Siegelman y Kycia, 1978).

2.5.4. Determinación de la tasa de desprendimiento de oxígeno

La determinación de la velocidad del desprendimiento de oxígeno para estimar la actividad fotosintética total se realizó utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark modelo YSI 5331 (Yellow Springs Instruments Co. Inc., EE.UU.). Para ello células de un cultivo de *Synechocystis* 6803 se recogían por centrifugación, se lavaban con medio BG11c fresco y se resuspendían a una concentración final de 15 µg de Chl/ml. Tres ml de esta suspensión celular se depositaban en la cubeta del electrodo y se determinaba la evolución de oxígeno antes y después de iluminar con luz blanca saturante.

2.5.5. Tratamiento informático de secuencias de DNA y proteínas

Para la búsqueda de fases abiertas de lectura, la localización de sitios de restricción, la traducción de secuencias nucleotídicas a proteínas, la determinación de la composición de

aminoácidos y la distribución de codones empleados en una fase abierta de lectura, se utilizaba 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).

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.) (Devereux *et al.*, 1984), y el acceso mediante correo electrónico o internet al banco de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Heidelberg (Alemania). El alineamiento de secuencias homólogas, así como la búsqueda de posibles terminadores independientes de rho se realizaron respectivamente utilizando los programas Pileup y Terminator de este mismo paquete informático.

La búsqueda de similitud de una secuencia con las contenidas en los bancos de datos se realizaba utilizando la aplicación BLAST, (Altschul *et al.*, 1990) a través de la dirección de internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. El acceso al genomio completo de *Synechocystis* 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) se realizó a través de la dirección de internet <http://www.kazusa.or.jp/cyano/kwd.htm/>.



3. RESULTADOS

3.1. La glutamato sintasa de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120

En el momento de comenzar este trabajo no se tenían muchos datos acerca de los genes que codifican glutamato sintasa (GOGAT) en cianobacterias, tan solo se disponía de las secuencias de las glutamato sintasas de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Navarro, 1996) y posteriormente las de la cianobacteria *Plectonema boryanum* (Okuhara *et al.*, 1999), lo que hacía interesante la búsqueda del gen o de los genes que codificasen GOGATs en una especie fijadora de nitrógeno, por lo que escogimos como modelo la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120.

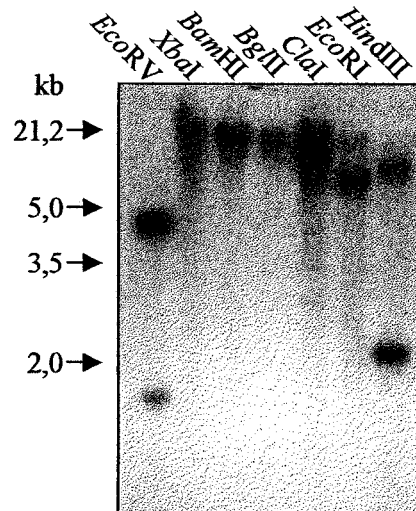
3.1.1. Clonación y secuencia del gen *glsF* de *Anabaena* sp. PCC 7120

Con objeto de obtener fragmentos internos del gen o de los genes que codifican glutamato sintasas en *Anabaena* 7120, se llevó a cabo una amplificación de DNA genómico de dicha cianobacteria mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como cebador directo el oligonucleótido pfn1 (Navarro *et al.*, 1995), correspondiente a los aminoácidos 1097-1102 de la Fd-GOGAT de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991) y a los aminoácidos 998-1003 de la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de *E. coli* (Oliver *et al.*, 1987) y como cebador inverso el oligonucleótido pfn2 (Navarro *et al.*, 1995), correspondiente a los aminoácidos 1494-1499 y 1395-1400 de las mismas glutamato sintasas, los cuales ya habían sido utilizados con éxito en la amplificación de fragmentos internos de las GOGATs de *Synechocystis* 6803 (Navarro *et al.*, 1995) y posteriormente de *Plectonema boryanum* (Okuhara *et al.*, 1999). Obteniéndose de esta manera un fragmento único, con un tamaño de 1,2 kb, el cual se clonó en el sitio *EcoRV* del *polylinker* de pBS, constituyendo el plásmido pGLSF1.

Este fragmento se utilizó como sonda en una hibridación sobre DNA total de *Anabaena* 7120, digerido con distintas enzimas de restricción (Fig. 2). El resultado de la hibridación confirmaba que el fragmento amplificado era homólogo al DNA de *Anabaena* 7120 y además se podía considerar por el tamaño de las bandas obtenidas, que dicho fragmento hibridaba con un sólo gen del tamaño esperado que codificara glutamato sintasas. La misma sonda se utilizó en una hibridación en colonias de una genoteca de DNA total de *Anabaena* 7120, construida en la estirpe de *E. coli*, MC1061, utilizando el vector pBS, con insertos *HpaII* de tamaños comprendidos entre 4,5-6,5 kb. Se analizaron aproximadamente 20.000 colonias, obteniéndose en este caso, dos clones positivos, conteniendo ambos un inserto de 4,5 kb, la secuenciación de regiones internas de los fragmentos mostraba que ambos clones contenían el mismo inserto. La posterior comparación de la secuencia deducida de aminoácidos utilizando la aplicación BLAST, contra las secuencias presentes en el banco de datos del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Heidelberg (Alemania), indicaba que el fragmento clonado

(pGLSF2) se correspondía con un fragmento interno del gen *glsF* que codifica la glutamato sintasa dependiente de ferredoxina de *Anabaena* 7120.

A



B

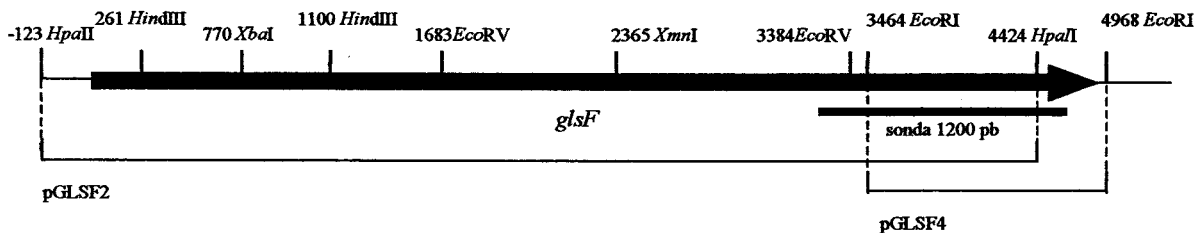


Figura 2. Clonación del gen *glsF* de *Anabaena* 7120

A. DNA total de *Anabaena* 7120 se digirió con las enzimas de restricción indicadas y se hibridó mediante la técnica de *Southern blot* a 65 °C utilizando como sonda el fragmento de 1,2 kb amplificado por PCR.

B. Mapa de restricción del gen *glsF* de *Anabaena* 7120. Los números indican la posición relativa de los sitios de restricción de las distintas enzimas utilizadas referidas al primer nucleótido del codón de iniciación de la traducción, que se considera como +1.

Dicho fragmento contenía la región 5' del gen, incluyendo 123 nucleótidos delante del putativo codón de iniciación de la traducción, pero el inserto no contenía el gen *glsF* completo, ya que carecería según la comparación de secuencias, de aproximadamente de 200 pb de la región 3' terminal. Esta región se clonó posteriormente utilizando la misma sonda mediante otra hibridación en colonias, de una subgenoteca de DNA de *Anabaena* 7120, construida en pBS, con insertos *EcoRV* de tamaños comprendidos entre 4,5-6 kb utilizando la estirpe de *E. coli* HB101.

En la hibridación en colonias se obtuvo un sólo clon positivo, pGLSF3, con un inserto de 5,5 kb, el cual contenía la región 3' terminal y solapaba aproximadamente 1,3 kb con el clon pGLSF2. Una digestión posterior de este clon con *EcoRI*, producía un nuevo clon, pGLSF4, con un inserto de 1,5 kb, el cual solapaba 1,2 kb con el fragmento contenido el pGLSF2 y entre ambos, pGLSF2 y pGLSF4 contenían el gen *glsF* completo. Con objeto de obtener la secuencia completa del gen *glsF* en un sólo clon, se realizó una digestión del plásmido pGLSF2 con las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI*, obteniéndose un fragmento de 3,7 kb, que fue clonado en los sitios únicos *XhoI* y *EcoRI*, de pGLSF4, originando el plásmido pGLSF5, el cual contiene la secuencia completa del gen *glsF*. En la figura 2B se presenta un mapa de restricción del gen *glsF*, indicando los fragmentos contenidos en los clones pGLSF2 y pGLSF4. La secuencia completa (4647 pb) del gen *glsF* de *Anabaena* 7120 (Fig. 3), se ha depositado en la base de datos EMBL/GenBank con el número de acceso AJ249913. El gen *glsF* codifica una proteína de 1549 aminoácidos con una masa molecular calculada de 170 kDa (Fig. 3). La secuencia de aminoácidos de la glutamato sintasa de *Anabaena* 7120 se comparó con las de otras GOGATs disponibles en las bases de datos mediante el programa Pileup (Fig. 4A). Dicha comparación mostró que la proteína de *Anabaena* presentaba una identidad alta, aproximadamente un 70%, con las Fd-GOGATs de las cianobacterias *Plectonema boryanum* y *Synechocystis* 6803, siendo la identidad de un 60% con las correspondientes Fd-GOGATs de plantas. La identidad con la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de *E. coli* fue menor, aproximadamente un 45%, siendo similar a la identidad presentada con las NADH-GOGATs de cianobacterias y plantas. Un análisis más detallado de las secuencias revelaba la existencia de dominios funcionales altamente conservados en todas las glutamato sintasas (Fig. 4B-D), (Vanoni, y Curti, 1999). El dominio glutamina amidotransferasa (Fig. 4B) contiene una cisteína, Cys-35, que está absolutamente conservada en todas las GOGATs, y está implicada en la liberación del grupo amida de la glutamina durante la catálisis. Una segunda región altamente conservada se corresponde con el dominio de unión del FMN que comprende los residuos críticos Asp-1137 y Lys-1141, los cuales probablemente interaccionan con la cadena ribitilo del FMN (Fig. 4C). Finalmente, una tercera región altamente conservada es la implicada en el acomodamiento del centro [3Fe-4S]. Esta región contiene las 3 cisteínas, Cys-1169, Cys-1174 y Cys-1179 que definen el motivo CX₅CX₄C (Fig. 4D) el cual está estrictamente conservado en todas las GOGATs conocidas.

Por otra parte, recientemente se ha completado la secuencia del genoma de *Anabaena* 7120, mostrando que el gen *glsF* es el único gen que codifica glutamato sintasas en esta cianobacteria.

Figura 4. Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína GlsF

A. Utilizando el programa PileUp se calcularon las identidades entre las Fd-GOGATs de *Anabaena* 7120, *Plectonema boryanum*, *Synechocystis* 6803, *Arabidopsis thaliana* y *Zea mays*, las NADH-GOGATs de *Plectonema boryanum*, *Synechocystis* 6803 y *Medicago sativa* y la NADPH-GOGAT de *E. coli*.

B-D. Comparación de las regiones conservadas presentes en todas GOGATs: B. dominio glutamina amidotransferasa. C. Sitio de unión del FMN. D Sitio de unión del centro [3Fe-4S]. El sitio de maduración se

indica con una línea y la Cys-35 conservada en todas las GOGATs en negrita. Los residuos de Asp y Lys involucrados en la unión de la cadena ribitilo del FMN se indican también en negrita. Las 3 Cys del centro sulfoférrico se denotan con Δ. Los asteriscos indican los residuos aminoácidos conservados en al menos siete de las nueve secuencias.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 <i>Fd-Anabaena</i>	-	71,8	67,7	59,3	60,3	46,1	46,3	45,2	43,9
2 <i>Fd-P. boryanum</i>		-	67,0	62,1	61,1	46,8	46,4	44,9	45,6
3 <i>Fd-Synechocystis</i>			-	59,1	60,8	45,2	44,3	44,1	41,6
4 <i>Fd-A. thaliana</i>				-	82,8	43,4	43,4	44,0	43,6
5 <i>Fd-Z. mays</i>					-	43,7	43,7	45,6	42,5
6 <i>NADH-P. boryanum</i>						-	78,0	55,3	43,9
7 <i>NADH-Synechocystis</i>							-	54,0	41,2
8 <i>NADH-M. sativa</i>								-	44,8
9 <i>NADPH-E. coli</i>									-

B

Sitio de maduración

<i>Fd-A. thaliana</i>	ILSERGACGVGFIANLDNIPSHGVVKDALIALGCMHRGGCGADNDSGDGSGLMSSIPWD	158
<i>Fd-Z. mays</i>	IVSERDACGVGFVANLKNMSSFDIVRDALMALGCMHRGGCGADSDSGDGAGLMSAVPWD	150
<i>Fd-Anabaena</i>	LVEERDACGVGFIAHRQNLGSHELVLKALCALTCLEHRGGCSADQDSGDGAGLTAIPWE	87
<i>Fd-P. boryanum</i>	LVEERDACGVGFIVDQGRASHDLMSKALIALSCMEHRGGCSADQDSGDGAGVMAIPE	91
<i>Fd-Synechocystis</i>	LVEERDACGVGFIANLRGKPDHTLVEQALKALGCMHRGGCSADNDSGDGAGVMTAIPRE	89
<i>NADH-P. boryanum</i>	PQEHADACGVGFIVQMKGPQSHSIVQQALTILANLEHRGACGAETNTGDDGAGILMQVPHG	76
<i>NADH-Synechocystis</i>	PQNEHDACGVGFIVQMKGVSHDIVEQGLQMLVNLHRGACGCEPNTGDDGAGILVQPHK	94
<i>NADH-M. sativa</i>	PAFDKDCGVGFVAELNGQSSRKIVTDALEMLVRMTHRGACCEANTGDDGAGILVALPHG	154
<i>NADPH-E. coli</i>	KSLERNCGFGLIAHIEGEPHKKVVRTAIALARMQHRGAILADGKTGDCGLLLQKPRD	95
	* *	

C

<i>Fd-A. thaliana</i>	SIEDLAQLIFDLHQINPNAKVSVKLVAEAGIGTVASGVAKNADIIQISGHGGGTGAS
<i>Fd-Z. mays</i>	SIEDLAQLIYDLHQINPKAKVSVKLVAEAGIGTVASGVSKANADIIQISGHGGGTGAS
<i>Fd-Anabaena</i>	SIEDLAQLIYDLHQINPKAQVSVKLVAEIGITTAAGVAKANADIIQISGHGGGTGAS
<i>Fd-P. boryanum</i>	SIEDLAQLIFDLHQINPLAQVSVKLVAEAVGIGITTAAGVAKANADIIQISGHGGGTGAS
<i>Fd-Synechocystis</i>	SIEDLAQLIYDLQINPEAQVSVKLVAEIGITTAAGVAKANADIIQISGHGGGTGAS
<i>NADH-P. boryanum</i>	SIEDLAELIHDLKNANREARISVKLVSEVGVGTIAAGVKAHADVVLISGYDGGGTGAS
<i>NADH-Synechocystis</i>	SIEDLAELIHDLKNANREARINVKLVSEVGVGTIAAGVKAHADVVLISGYDGGGTGAS
<i>NADH-M. sativa</i>	SIEDLAQLIHDLKNANPAARISVKLVSEAGVGVIAAGVVKGAHVLIISGHGGGTGAS
<i>NADPH-E. coli</i>	SIEDLAQLIFDLQVNPKAMISVKLVSEPGVGTIATGVAKAYADLITLAGYDGGGTGAS
	***** *

<i>Fd-A. thaliana</i>	PISSIKHAGGPWELGLTETHQTLIANGLRERVILRVDGGLKSGVDVLMAAAAMG	1221
<i>Fd-Z. mays</i>	PISSIKHAGGPWELGLTETNQTLIQNGLRERVILRVDGGFRSGQDVLIAAAMG	1214
<i>Fd-Anabaena</i>	PLSSIKHAGSPWELGLSEVHRVLMENSLRDRVILRVDGGLKSGWDLVIGALMG	1153
<i>Fd-P. boryanum</i>	PLSSIKHAGSPWELGLTEVHRVLMENQLRDRVILRVDGGIKTGWDVVMGALMG	1157
<i>Fd-Synechocystis</i>	PLSSIKHAGSPWELGVTEVHRVLMENQLRDRVILRVDGGLKSGWVVMGALMG	1245
<i>NADH-P. boryanum</i>	PQTSIKHAGLPWELGLAETHQTLVLNLRSRIVVEADGQMKTGDRVVAALLG	1202
<i>NADH-Synechocystis</i>	PQTSIKHAGLPWELGLAETHQTLVLNLRSRIVVETDQMKTGDRVVAIALLG	1172
<i>NADH-M. sativa</i>	RWTGIKSAAGLPWELGLAETHQTLVANDLRGRITLQTDGQLKTGRDVAIAALLG	1230
<i>NADPH-E. coli</i>	PLSSVKYAGCPWELGLVETQALVANGLRHKIRLQVDGGLKSGVDVLIKAAITG	1111
	* *	

D

<i>Fd-A. thaliana</i>	GCVMARICHTNCPVG	1251
<i>Fd-Z. mays</i>	GCVMARICHTNCPVG	1243
<i>Fd-Anabaena</i>	GCIMARICHTNCPVG	1182
<i>Fd-P. boryanum</i>	GCIMARICHTNCPVG	1186
<i>Fd-Synechocystis</i>	GCIMARVCHTNCVPG	1274
<i>NADH-P. boryanum</i>	GCIMMRVCHLNTCPVG	1231
<i>NADH-Synechocystis</i>	GCIMMRACHLNTCPVG	1201
<i>NADH-M. sativa</i>	GCIMMRCKHNTCPVG	1260
<i>NADPH-E. coli</i>	GCKYLRICHLNNCATG	1140
	* *	

3.1.2. Regulación de la actividad Fd-GOGAT por la fuente de nitrógeno en *Anabaena* 7120

Como se ha comentado previamente en la Introducción, la actividad glutamina sintetasa (GS) en cianobacterias está sometida a regulación por la fuente de nitrógeno disponible (Flores y Herrero, 1994). Esta característica peculiar entre las cianobacterias, hacía interesante el determinar si también la actividad Fd-GOGAT en *Anabaena* 7120 estaba regulada por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo.

Con este fin se realizaron medidas de actividad Fd-GOGAT en extractos crudos de células cultivadas en medio BG11c, utilizando nitrato o amonio como fuente de nitrógeno, o bien en condiciones de fijación de dinitrógeno atmosférico, es decir, sin la presencia de fuente de nitrógeno combinada en el medio de cultivo. Como se observa en la Tabla 9, la actividad medida en los extractos fue siempre similar en las diferentes condiciones de cultivo utilizadas, mientras que las actividades GS e IDH presentaban respectivamente los niveles más altos en condiciones de fijación y los mínimos cuando la fuente de nitrógeno utilizada era NH_4^+ , lo cual está de acuerdo con lo descrito previamente para dichas enzimas en (Tumer *et al.*, 1983, Muro-Pastor *et al.*, 1992), e indica claramente que la actividad Fd-GOGAT en *Anabaena* 7120 no está regulada por la fuente de nitrógeno disponible.

Tabla 9. Niveles de actividad Fd-GOGAT, GS y NADP-IDH en *Anabaena* 7120

Las actividades fueron determinadas en extractos libres de células procedentes de células vegetativas cultivadas con N_2 , NO_3^- o NH_4^+ como fuente de nitrógeno y de heterocistos aislados. Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan las medias de tres experimentos independientes y el error estándar para todos los valores fue siempre inferior al 10%. n.d.: no detectado.

Fuente	Actividad enzimática (mU/mg proteína)		
	Fd-GOGAT	GS	IDH
Células vegetativas			
N_2	32,3	883	101,5
NO_3^-	28,8	600	72,7
NH_4^+	25,3	339	60,1
Heterocistos	n.d.	1.634	146,4

Por otra parte, como los datos existentes hasta el momento sobre la presencia o no de esta enzima en el heterocisto eran contradictorios (Wolk *et al.*, 1994), procedimos a realizar medidas de

actividad Fd-GOGAT en extractos crudos de heterocistos aislados, como se describe en Materiales y Métodos. En ningún caso se detectó actividad Fd-GOGAT en los extractos crudos de heterocistos, mientras que se encontraron niveles elevados de actividad GS (1,85 veces superior a los detectados en filamentos completos en condiciones de fijación de nitrógeno) e IDH (1,44 veces superior a los detectados en filamentos en condiciones de fijación de N_2) observados, (Tabla 9). Estos resultados apuntaban claramente hacia la ausencia de Fd-GOGAT en el heterocisto de *Anabaena* 7120.

3.1.3. Inmunodetección de Fd-GOGAT en extractos libres de células de *Anabaena* 7120

Con el propósito de investigar por una parte, si la enzima se encontraba presente en el heterocisto en una forma inactiva y por otra, si la cantidad de Fd-GOGAT era constante en células vegetativas cuando se cultivaban con distintas fuentes de nitrógeno, como se podía deducir de las medidas de actividad, extractos crudos bien de filamentos completos procedentes de células cultivadas con nitrato, amonio o en condiciones de fijación de nitrógeno o bien de heterocistos aislados se sometieron a inmunodetección mediante *western blot* utilizando anticuerpos policlonales monoespecíficos obtenidos contra la Fd-GOGAT de *Synechocystis* 6803 (Navarro *et al.*, 2000).

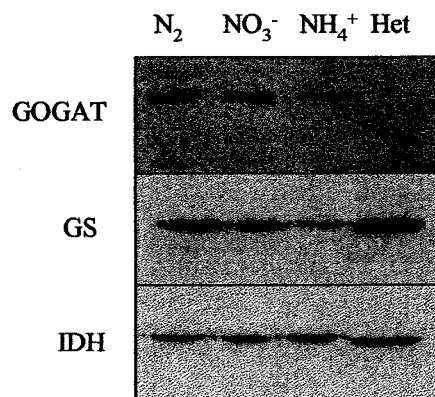


Figura 5. Inmunodetección de Fd-GOGAT, GS e IDH, en extractos crudos de células vegetativas o en heterocistos de *Anabaena* 7120

Extractos crudos de células vegetativas de *Anabaena* 7120 cultivadas con N_2 , NO_3^- o en NH_4^+ como fuente de nitrógeno o de heterocistos aislados se sometieron a inmunodetección mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra la Fd-GOGAT, la GS y la IDH. Se cargaron 15 μg de proteína en cada carril.

En la figura 5, podemos observar que en las preparaciones de heterocistos no aparece ninguna banda que dé reacción cruzada con los anticuerpos, mientras que en las preparaciones de filamentos completos aparece claramente una banda que se mantiene constante independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada y que se correspondería con la Fd-GOGAT. Con objeto de confirmar que este

resultado no era consecuencia de una degradación general de proteínas provocada por el método de aislamiento de heterocistos empleado (ver Materiales y Métodos), se realizaron *western blots* adicionales utilizando anticuerpos policlonales monoespecíficos obtenidos contra la GS de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*; 1992) y contra la IDH de *Synechocystis* 6803 (Muro-Pastor *et al.*, 1992). Como se observa en la Fig. 5, bandas que reaccionan con ambos anticuerpos fueron detectadas tanto en extractos crudos de células vegetativas como de heterocistos, siendo la señal más intensa en estos últimos. Estos resultados claramente indican la ausencia de Fd-GOGAT en el heterocisto de *Anabaena* 7120, mientras que las cantidades de GS y de IDH son más altas que en las células vegetativas como se podía deducir de las medidas de actividad obtenidas.

3.1.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la expresión del gen *glsF* en células vegetativas y en heterocistos de *Anabaena* 7120

Para estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno en la expresión del gen *glsF* de *Anabaena* 7120, así como para determinar si este gen se expresaba en el heterocisto, procedimos a aislar RNA total de células vegetativas cultivadas con nitrato o amonio o en condiciones de fijación de nitrógeno y de heterocistos aislados. Los RNAs fueron analizados mediante *northern blot*, utilizando como sonda un fragmento de DNA que comprendía los primeros 59 pb de la región codificante del gen *glsF* más 140 pb de la región promotora, que se obtuvo por PCR con los oligonucleótidos *gls1* y *gls8* (Tabla 8). El resultado de la hibridación (Fig. 6) muestra que los niveles del transcrito del gen *glsF* en las células vegetativas se mantienen casi constantes en las tres condiciones de cultivo utilizadas, indicando que la expresión del gen *glsF* en células vegetativas no está regulada por la fuente de nitrógeno disponible. Por el contrario, el mRNA del gen *glsF* estaba prácticamente ausente en el heterocisto. Los bajos niveles de mRNA detectados en este caso están en concordancia con los niveles de transcrito del gen *rbcL* (Fig. 6), que sólo se expresa en células vegetativas (Elhai y Wolk, 1990). Por lo que las trazas, de transcrito del gen *rbcL* así como del gen *glsF* observadas en el heterocisto pueden considerarse como resultado de una leve contaminación de células vegetativas en las preparaciones de heterocistos aislados. Estos resultados claramente demuestran que el gen *glsF* no se transcribe en el heterocisto de *Anabaena* 7120. Es más, cuando se utilizó como sonda, un fragmento del gen *nifH* el cual se expresa fuertemente en el heterocisto (Elhai y Wolk, 1990) se observó una señal de hibridación 46 veces más alta en el heterocisto que en las células vegetativas cultivadas con NH_4^+ como fuente de nitrógeno, y 6 veces superior que en los filamentos completos en condiciones de fijación N_2 , indicando el alto enriquecimiento en RNA de heterocisto de las muestras (Fig. 6). Con objeto de confirmar si la expresión de los genes *glnA* and *icd* era mayor en el heterocisto que en las células vegetativas, se llevaron a cabo hibridaciones utilizando sondas de estos genes. El resultado de las hibridaciones mostraba en ambos casos, niveles de mRNA

aproximadamente 1,6 veces más altos en el heterocisto que en el filamento completo en condiciones de fijación de N_2 .

Estos resultados, junto con los obtenidos anteriormente mediante *western blot* y por medidas de actividad enzimática claramente demuestran que la glutamato sintasa no está presente en el heterocisto de *Anabaena* 7120, y por tanto sugieren una clara compartimentación del metabolismo del nitrógeno entre el heterocisto y las células vegetativas, como se analizará en la Discusión.

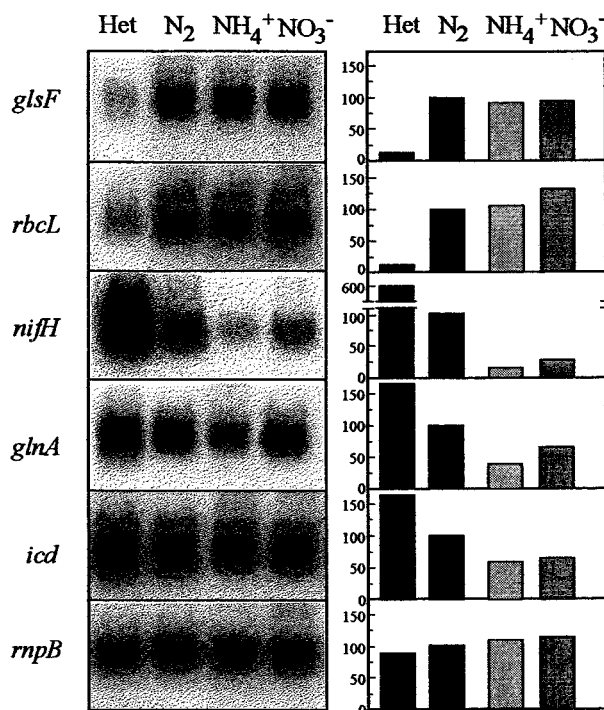


Figura 6. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de mRNA de los genes *glsF*, *rbcL*, *nifH*, *glnA* e *icd* en *Anabaena* 7120

RNA total obtenido de heterocistos aislados o de filamentos completos cultivados con N_2 , NH_4^+ o NO_3^- como fuente de nitrógeno, se sometieron a detección mediante *northern blot* utilizando como sonda fragmentos internos de los genes *glsF*, *rbcL*, *nifH*, *glnA* e *icd* de *Anabaena* 7120. Se cargaron 15 μ g de RNA total por carril. Los niveles relativos de mRNA están expresados como % del nivel detectado en filamentos completos bajo condiciones de fijación de N_2 , utilizando la hibridación con la sonda del gen *rnpB* como control de carga de los filtros.

3.2. Las tiorredoxinas de la cianobacteria *Synechocystis* sp PCC 6803

Durante el transcurso de este trabajo, se hizo disponible en las bases de datos, en principio un 28% de la secuencia del cromosoma de la cianobacteria unicelular heterótrofa facultativa *Synechocystis* sp PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1995) y posteriormente la secuencia completa (Kaneko *et al.*, 1996). El hecho de hallarse disponible esta secuencia nos permitió hacer una búsqueda exhaustiva de pautas abiertas de lectura (ORFs) cuyos productos hipotéticos presentasen homología con tiorredoxinas. Dicha búsqueda reveló la existencia de tres ORFs; *slr0233*, *slr1139* y *sll1057* cuyos productos presentaban homología con dichas proteínas, aparte del gen *trxA* previamente descrito en nuestro grupo (Navarro, y Florencio, 1996).

Hasta este momento en cianobacterias, sólo se habían descrito tiorredoxinas tipo-*m* con la excepción de una segunda tiorredoxina en *Anabaena* sp. PCC 7120, lo que hacía ciertamente interesante el estudio de estas ORFs y de las proteínas que codificaban, ya que por otra parte *Synechocystis* 6803 ha sido ampliamente utilizado para generar mutantes del aparato fotosintético (Willians, 1988; Pakrasi *et al.*, 1988; Smart *et al.*, 1994) y presenta la capacidad de crecer a expensas de glucosa (Rippka *et al.*, 1979).

Además como complemento a los estudios con los genes que codifican tiorredoxinas, procedimos también a analizar la expresión los genes *ftrC* y *ftrV* que codifican respectivamente la subunidad catalítica y variable de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) en *Synechocystis* 6803.

3.2.1. Clonación de los genes que codifican tiorredoxinas y de los genes que codifican la ferredoxina-tiorredoxina reductasa en *Synechocystis* sp. PCC 6803

El análisis de las secuencias del genomio de *Synechocystis* utilizando las aplicaciones de la base de datos, "Cyanobase", disponible en la dirección de internet <http://www.kazusa.or.jp/cyano/kwd.htm/>, (Kaneko *et al.*, 1996), desveló la existencia de las tres ORFs descritas anteriormente, *slr0233*, *slr1139* y *sll1057* con homología con tiorredoxinas. A estas ORFs se les denominó del siguiente modo: *trxB* a la ORF *slr1139*, *trxC* a la ORF *sll1057* y *trxQ* a la ORF *slr0233*, aparte del gen *trxA* que quedaba designado en el mapa del genomio de *Synechocystis* como la ORF *slr0623*. En la Fig. 7A, se muestra un alineamiento de las secuencias de las tiorredoxinas de *Synechocystis* con otras tiorredoxinas disponibles en las bases de datos.

A partir de las secuencias de las tiorredoxinas presentadas en la figura 7A, se calculó el porcentaje de identidad entre ellas, en la figura 7B se muestran los valores obtenidos realizando la comparación de las secuencias dos a dos.

A

```

Synechocystis-TrxA MSATPQVSDASFKEVDLDELSPVLVDFWAP WCGGPC RMVAPVVDEISQQYEGKVKVVK
Anabaena-TrxA -SAAAQVTDSTFKQEVLDSDVPVLVDFWAP WCGGPC RMVAPVVDEIAQQYEGKIKVVK
Synechococcus-TrxM SVAAAQVTDATFKQEVLESSIPVLVDFWAP WCGGPC RMVAPVVDEIAQQYSDQVKVVK
Arabidopsis-TrxM1 ATGIPVVDNDSTWDSLVLKADPEVDFWAP WCGGPC KMIDPIVNELAQKYAGQKFKYK
Mycobacterium-Trx1 -SATIKVTDASFATDVLSSNKPVLVDFWAT WCGGPC KVVAPVLEEIATERATDLTVAK
Synechocystis-TrxQ --MAVKKQFANFAEMLAGSPKPVLDVDFYAT WCGGPC QMMAPILEQVGHSLRQQIQVVK
Synechocystis-TrxB -MSLLEITDAEFEQETQGTQKPVVDFWAS WCGGPC RLMAPIAQIAKDYGDKLKVVK
Anabaena-Trx2 SKGVITITDAEFESEVLKAEQPVVDFWAS WCGGPC QLMSPILINLAANTYSDRLKVVVK
Arabidopsis-TrxH1 IACHTVETWNEQLQKANESKTLVVDFFTAS WCGGPC RFIAPFFADLAKKLP-NVLFLK
Synechocystis-TrxC -MPMLAVNEDNFDNLVLQCPKPIVDFGAP WCGGLC HFVVKPLLNLHGEWQQLVCVE
Arabidopsis-TrxF1 TEVDKDTFWPIVKAAG--EKLVLDMYTO WCGGPC KVIAPKYKALSEKYD-DVVFLK
          **** * ** * ***** ***** * ** * * ** *
    
```

```

Synechocystis-TrxA LNTDENPNTASQYGI RSIPTLMI FKGGRVDMVVGAVPKTTLASTLEKYL-----
Anabaena-TrxA VNTDENPQVASQYGI RSIPTLMI FKGGRVDMVVGAVPKTTLSTLEKHL-----
Synechococcus-TrxM VNTDENPSVASQYGI RSIPTLMI FKGGRVDTVVGAVPKTTLANTLDKHL-----
Arabidopsis-TrxM1 LNTDES PATPGQYGVRSIPTLMI FVNGEKKDFTIIGAVSKDTLATSINKFL-----
Mycobacterium-Trx1 LDVDTNPETARNFQVRSIPTLILFKDQGPVKKIVGAKGKAALLRELSDDVVPNLN--
Synechocystis-TrxQ IDTDKYPAIATQYQIQSLPTLVLFKQGPVHRMEGVQQAQLIQQLQVVF-----
Synechocystis-TrxB LEVDPNPAAVAQCKVEGVPALRLFKNNELVMTHEGAIAPKLELLELKEELDFI---
Anabaena-Trx2 LEIDPNPTTVKRYKVEGVPALRLVKGGEQILDSTEGVLSKDKLLSFLDTHLNNN---
Arabidopsis-TrxH1 VDTDELKSVASDWAIQAMPTFMFLKEGKILDKVVGAK-KDELQSTIAKHLA----
Synechocystis-TrxC VNADVNLHLANAYRLKNLPTLILFNRRGQVIRLEDFRVREDLHRIREQIAVSLFSP
Arabidopsis-TrxF1 LDCNPNRPLPKELGIRVVPTFKILKDNKVVKEVTGAK-YDDLVAAIETARSAASG-
          ** * * * * ** * ** * ** * *
    
```

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>Synechocystis-TrxA</i>	-	86,2	81,9	57,6	53,9	41,5	43,0	41,9	43,2	37,1	37,1
2 <i>Anabaena-TrxA</i>		-	85,1	57,6	51,7	46,5	41,5	40,9	44,6	37,5	34,3
3 <i>Synechococcus-TrxM</i>				57,6	52,8	46,3	42,6	43,0	47,8	40,0	38,6
4 <i>Arabidopsis-TrxM</i>					41,6	34,5	39,2	41,9	39,8	31,9	38,1
5 <i>Mycobacterium-Trx1</i>						50,6	44,7	37,5	35,2	38,7	34,2
6 <i>Synechocystis-TrxQ</i>							36,8	36,1	34,7	38,9	30,6
7 <i>Synechocystis-TrxB</i>								59,1	31,3	28,2	33,3
8 <i>Anabaena-Trx2</i>									32,5	32,9	26,1
9 <i>Arabidopsis-TrxH</i>										23,9	41,2
10 <i>Synechocystis-TrxC</i>											22,6
11 <i>Arabidopsis-TrxF</i>											

Figura 7. Análisis de la secuencia de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC* y *trxQ* de *Synechocystis* 6803
A. Análisis comparativo de las secuencias de las tioredoxinas de distintos organismos. En color rojo y denotados por asteriscos se muestran los aminoácidos idénticos presentes en 6 de las 11 secuencias analizadas. El sitio activo se denota enmarcado en verde. Las secuencias de las diferentes tioredoxinas se obtuvieron de las bases de datos del EMBL-GeneBank y corresponden a los siguientes organismos: *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7119 (proteína TrxA), *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Arabidopsis thaliana* (proteínas TrxM, TrxH y TrxF), *Anabaena* sp. PCC 7120 (proteína Trx2) y *Mycobacterium tuberculosis*.
B. Tantos por ciento de identidad entre las secuencias mostradas en A. Los datos fueron calculados mediante la aplicación Bestfit, realizando la comparación de las secuencias dos a dos.

La comparación mostraba en primer lugar que las proteínas de *Synechocystis* diferían significativamente en el grado de identidad mostrado con el resto de tiorredoxinas comparadas.

La proteína TrxA de *Synechocystis* presentaba niveles de identidad superiores al 80% con las equivalentes tiorredoxinas cianobacterianas (TrxA de *Anabaena* 7119 y TrxA de *Synechococcus* 7942) y niveles también altos, cercanos al 60% con las tiorredoxinas tipo-*m* de plantas, encuadrándose claramente dentro de este tipo de tiorredoxinas.

Por otro lado la proteína TrxB, presentaba la mayor identidad con la proteína Trx-2 de *Anabaena* 7120, (Gleason and Holmgren, 1981) aproximadamente un 60%, presentando un nivel basal de identidad del 40% con las otras tiorredoxinas cianobacterianas y con las tiorredoxinas tipo-*m* de plantas. La identidad presentada con las tiorredoxinas tipo-*f* y tipo-*h* de plantas era próxima al 30%, pudiéndose considerar también a la tiorredoxina TrxB dentro del tipo-*m*, según estos resultados.

La proteína TrxQ exhibía una identidad del 50,6% con la tiorredoxina de *Mycobacterium leprae*, siendo la identidad con las otras tiorredoxinas bacterianas incluyendo las cianobacterianas de aproximadamente el 40%, la identidad con las tiorredoxinas de *Arabidopsis* era baja, alrededor del 30%. Por último la proteína TrxC mostraba valores de identidad bajos con el resto de proteínas comparadas, el mayor porcentaje los presentaba con la proteína TrxA de *Synechococcus*, siendo este del 40%, lo cual hacía difícil de relacionar filogenéticamente esta proteína con alguno de los distintos grupos de tiorredoxinas.

Esta diversidad entre las secuencias hacía pensar que las tiorredoxinas de *Synechocystis* podrían tener papeles fisiológicos diferentes, lo cual hacía interesante el estudio de estas proteínas con el objetivo de encontrar funciones específicas para cada una de ellas.

El primer paso de este estudio consistió en clonar dichos genes; los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ* se clonaron mediante PCR con los oligonucleótidos descritos para tal fin en la Tabla 7, utilizando como molde DNA total de *Synechocystis* 6803. Mediante esta técnica también se clonaron los genes *firC*, *firV* que codifican respectivamente las subunidades catalítica y variable de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR). El gen *trxA* había sido previamente clonado en nuestro grupo (Navarro and Florencio, 1996). En todos los casos se amplificó una sola banda, las cuales presentaban el tamaño esperado. Todos los fragmentos amplificados se clonaron en pBS en los sitios de restricción diseñados en los oligonucleótidos con tal fin. Todos estos genes fueron secuenciados con objeto de comprobar que la *taq* polimerasa no había introducido mutaciones en las secuencias.

Con objeto de analizar estos genes y las proteínas que codifican procedimos a estudiar su expresión en distintas condiciones de cultivo, con el propósito de encontrar diferencias que pudieran ayudarnos a revelar funciones específicas para cada una de ellas.

3.2.2. Regulación transcripcional de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV*

En los organismos fotosintéticos y más concretamente en las cianobacterias la luz ejerce un papel fundamental en la regulación de la transcripción de numerosos genes. El efecto de la luz o más específicamente del transporte de electrones a través de los fotosistemas sobre la regulación transcripcional se ha analizado en distintos genes de esta cianobacteria, como es el caso de los genes *psbA*, *psbD*, *psaA* o *psaB* (Mohamed y Jansson, 1989, 1991, Mohamed *et al.*, 1993 y Smart y McIntosh, 1991), del operón *rbcLS* (Mohamed y Jansson, 1991) y de los genes *glnA* y *glnB* (Reyes y Florencio, 1995 y, García-Domínguez y Florencio, 1997). En nuestro caso, ya que el papel de las tiorredoxinas podría estar directamente implicado con el transporte de electrones, procedimos a estudiar el efecto que ejerce la luz en la expresión de estos genes y también en los genes que codifican la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR).

3.2.2.1. Efecto de los cambios luz-oscuridad y de la glucosa sobre los niveles de los mRNA de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV*.

Para comprobar si los cambios luz-oscuridad afectaban a los niveles de los transcritos de estos genes, se aisló RNA total de células de *Synechocystis* 6803 cultivadas en luz o sometidas a un periodo de 12 h en oscuridad, analizándolos posteriormente mediante *northern blot*. Como se observa en la figura 8, con la excepción del gen *trxQ*, el nivel de los transcritos de todos los genes descendía drásticamente cuando las células se transferían a oscuridad durante un periodo de 12 h. Sin embargo, este efecto no se observaba si los medios de cultivo contenían glucosa 10 mM (Fig. 8), lo que indicaba que excepto en el caso del gen *trxQ*, la transcripción de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *ftrC*, y *ftrV* era estimulada por la luz, no obstante el hecho de que la presencia de glucosa en los medios de cultivo tuviera el mismo efecto que la luz, sugería que podría ser el estado redox de la célula y no la luz *per se*, quién controlaría la expresión de dichos genes. En el caso del gen *trxQ* los niveles del transcrito no descendían en oscuridad más allá del 60% (Fig. 8B), aunque en presencia de glucosa los niveles se mantenían aun más altos, aproximadamente un 80% de los detectados en luz, estos resultados indicarían que la transcripción del gen *trxQ* debía estar sometida a otro tipo de regulación independiente de la ejercida por el transporte de electrones a través de los fotosistemas.

Por otra parte, como también se puede observar en la figura 8, los niveles de transcrito del gen *rnpB* que codifica la subunidad RNA de la RNasa P, fueron constantes a lo largo de todo el experimento, los niveles de este transcrito se emplearon como control de la carga de los diferentes carriles y los datos calculados fueron normalizados con relación a los obtenidos con este gen (Fig. 8B).

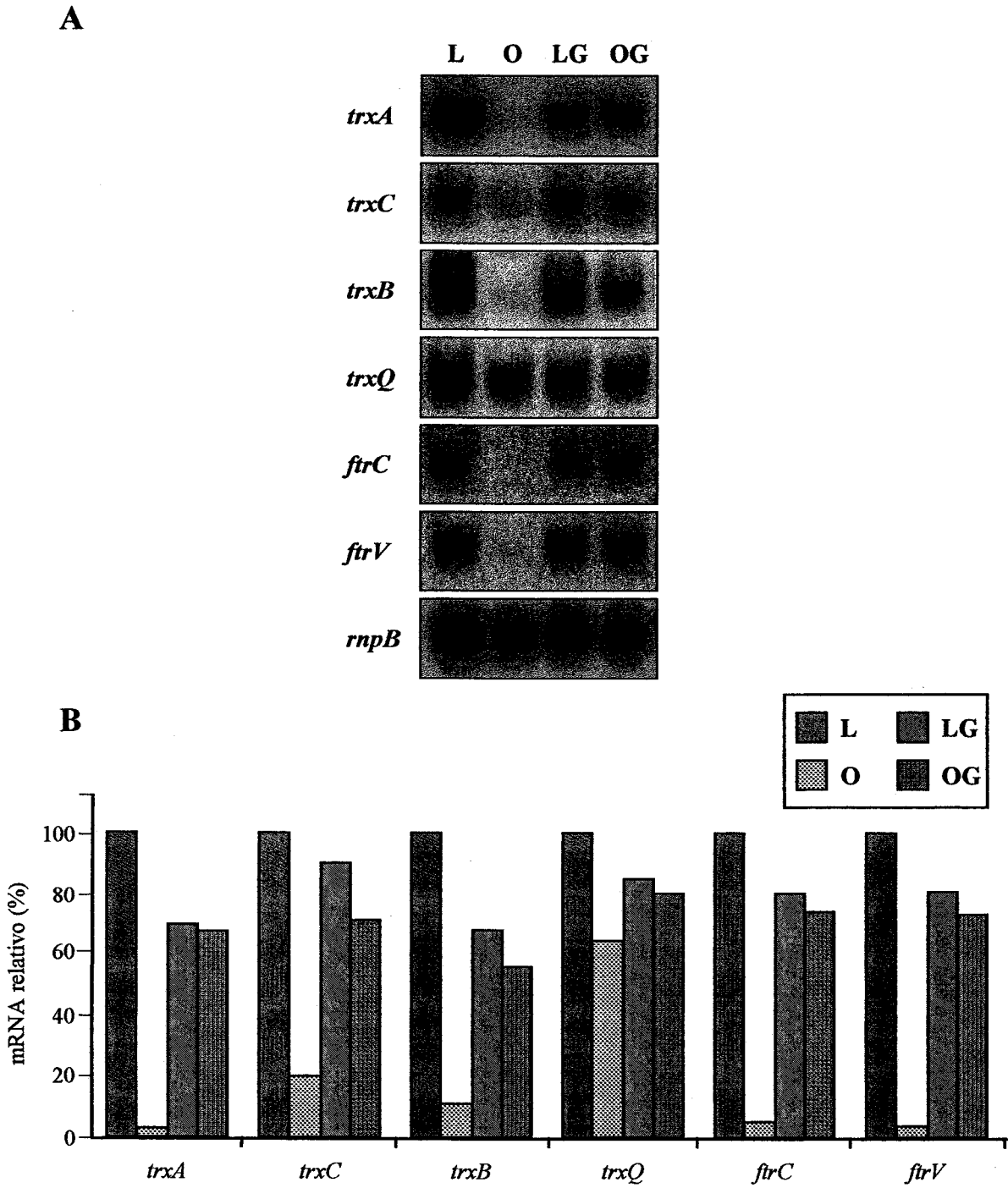
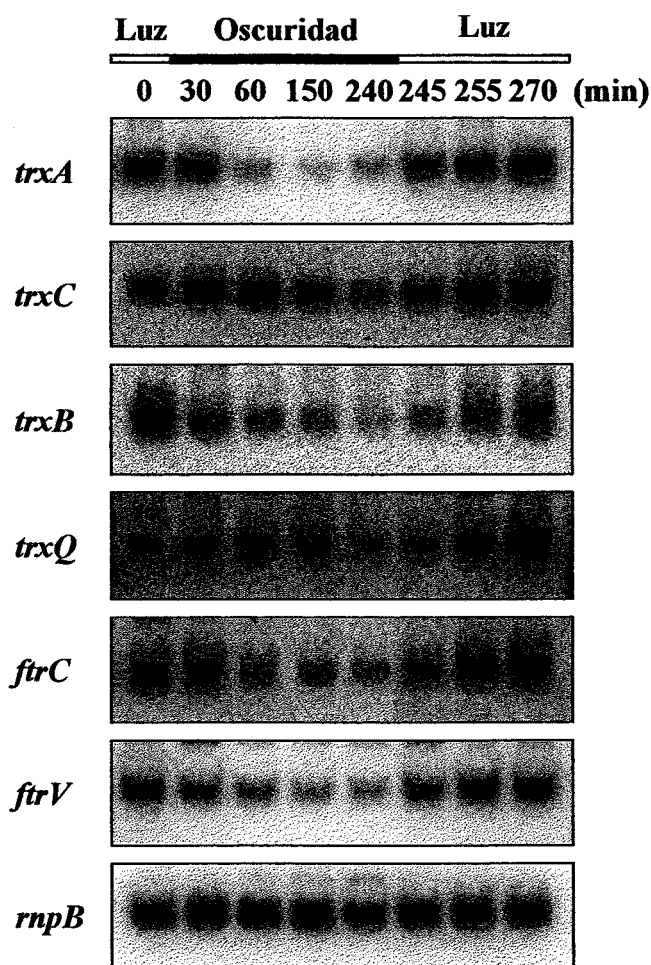


Figura 8. Efecto de los cambios luz-oscuridad y de la glucosa sobre la expresión de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV* de *Synechocystis* 6803

A. Muestras de RNA total obtenidas de células de *Synechocystis* 6803 cultivadas en medio BG11c, en presencia de luz, con (LG) o sin (L) glucosa 10 mM o transferidas a oscuridad durante 12 h (OG, O), se sometieron a detección mediante *northern blot* utilizando como sonda las secuencias completas de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV*. Se cargaron 15 µg de RNA por carril.

B. Niveles relativos de mRNA expresados como % del nivel obtenido en la condición de luz (L), utilizando la hibridación con la sonda del gen *rnpB* como control de carga de los filtros.

A



B

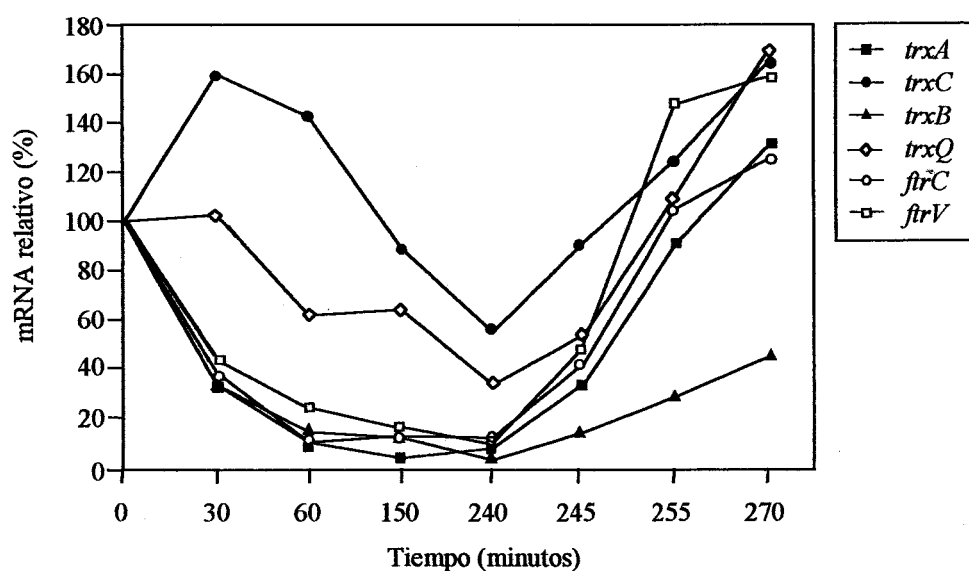


Figura 9. Efecto de las transiciones luz-oscurecimiento sobre la expresión de los genes del sistema ferredoxina-tiorredoxina reductasa:tiorredoxina.

A. Células de *Synechocystis* creciendo en condiciones estándar de iluminación ($50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se transfirieron a oscuridad durante 2,5 h volviéndose a reiluminar durante 30 min, recogiendo muestras para *northern blot* en los tiempos indicados, utilizándose las mismas sondas que en el experimento anterior.

B. Representación gráfica de los valores relativos de las señales radiactivas del experimento mostrado en A.

Con objeto de estudiar más detenidamente este efecto, procedimos a analizar la respuesta de estos genes a transiciones luz-oscuridad a tiempos cortos. Con este fin, células de *Synechocystis* cultivadas en luz ($50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) se transfirieron a oscuridad y posteriormente se volvieron a reiluminar, recogiendo muestras en los tiempos indicados en la figura 9 para su posterior análisis mediante *northern blot*. Como se observa en la figura 9, los niveles de mRNA de los genes *trxA*, *trxB*, *ftrC*, y *ftrV* descendían rápidamente al transferir las células a oscuridad, alcanzándose en 30 min niveles inferiores al 40% de los detectados inicialmente, también se podía observar que los niveles de mRNA tras 150 ó 240 min en oscuridad eran similares a los observados en el experimento anterior tras 12h de oscuridad. Por otra parte, la reiluminación de los cultivos resultó en un rápido incremento de la cantidad de transcrito de todos los genes, alcanzándose en 15 min niveles incluso superiores a los iniciales, con la excepción del gen *trxB*, cuyos niveles de transcrito solamente alcanzaban un 40% de los iniciales tras 30 min de reiluminación.

En este experimento observamos una respuesta distinta, no solo con el gen *trxQ* sino también con el gen *trxC*, es más, tras 4 h en oscuridad los niveles de transcrito *trxC* permanecían más altos 60% *versus* 40% que los del gen *trxQ*, observándose además un aumento en los niveles de mRNA del gen *trxC* durante los primeros 30 min, sin embargo ambos genes presentaban una respuesta a la reiluminación similar a la exhibida por los genes *trxA*, *ftrC*, y *ftrV*, lo que indicaba por una parte que aunque los niveles de los transcritos *trxC* y *trxQ* descendiesen más lentamente que los demás cuando las células pasaban de una condición de iluminación a una de oscuridad, éstos ascendían rápidamente cuando las células eran reiluminadas, por lo que finalmente podemos deducir que la luz ejerce un papel regulador en la transcripción de todos estos genes, aunque la respuesta de éstos sea distinta según el caso.

Para analizar más en detalle como era la respuesta de estos genes a la oscuridad, procedimos a realizar un experimento de transición luz-oscuridad a tiempos más largos, tomando muestras a 4, 8 y 12 h para el posterior aislamiento de RNA y sometimiento de las muestras a *northern blot*. Como se distingue en la figura 10, en las muestras correspondientes a 12 h, el descenso de los niveles de transcrito alcanzaba valores similares para los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *ftrC* y *ftrV* pero este descenso era menor en el caso del gen *trxQ*. Los niveles de mRNA de este gen sólo descendían al 32% de los iniciales tras 12 h en oscuridad, mientras que los demás casi desaparecían completamente, confirmando claramente una respuesta distinta de este gen a los cambios luz-oscuridad. Como también se observa en la figura, los niveles de mRNA del gen *trxC* descendían de manera más lenta que los de los genes *trxA*, *trxB*, *ftrC* y *ftrV*, observándose tras 4 h de oscuridad niveles que aun alcanzaban un 60% de los iniciales. Estos resultados concuerdan con los observados en las transiciones luz-oscuridad a tiempos cortos (Fig. 9) donde tras 4 h de oscuridad el nivel de transcrito del gen *trxC* se mantenía en esos valores.

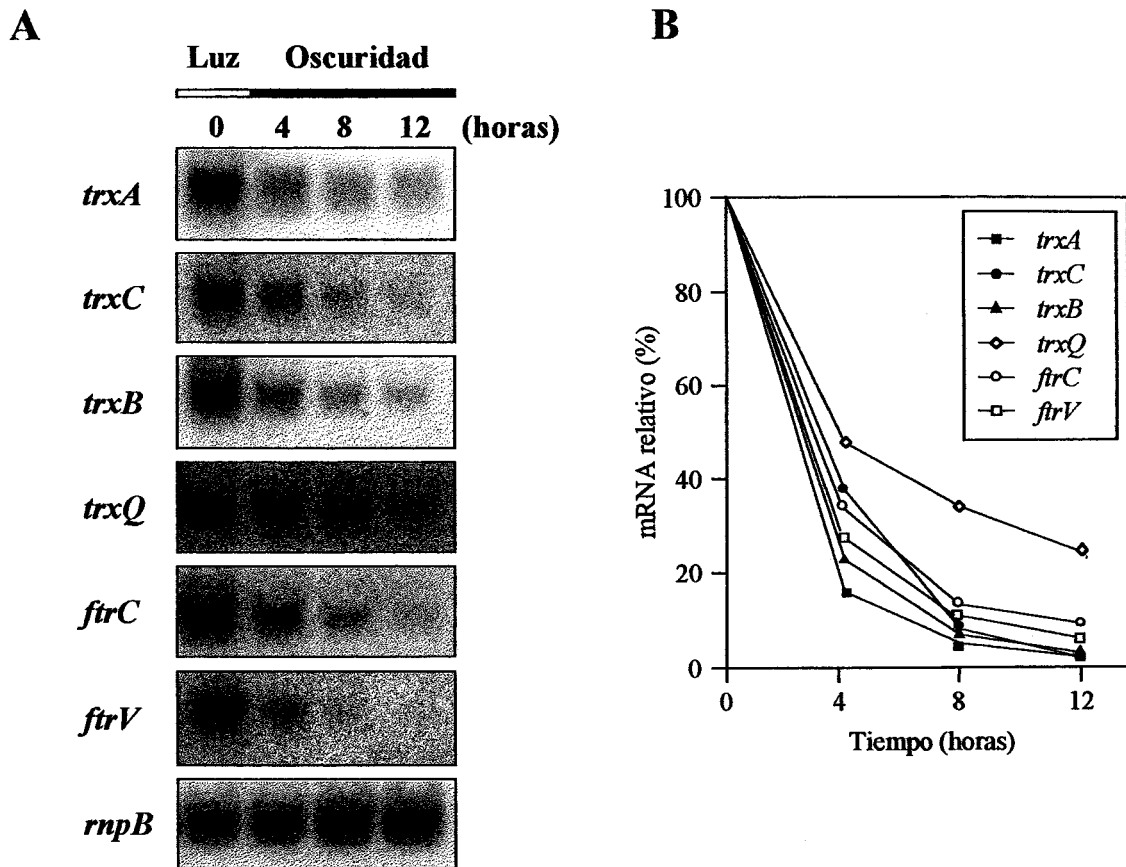


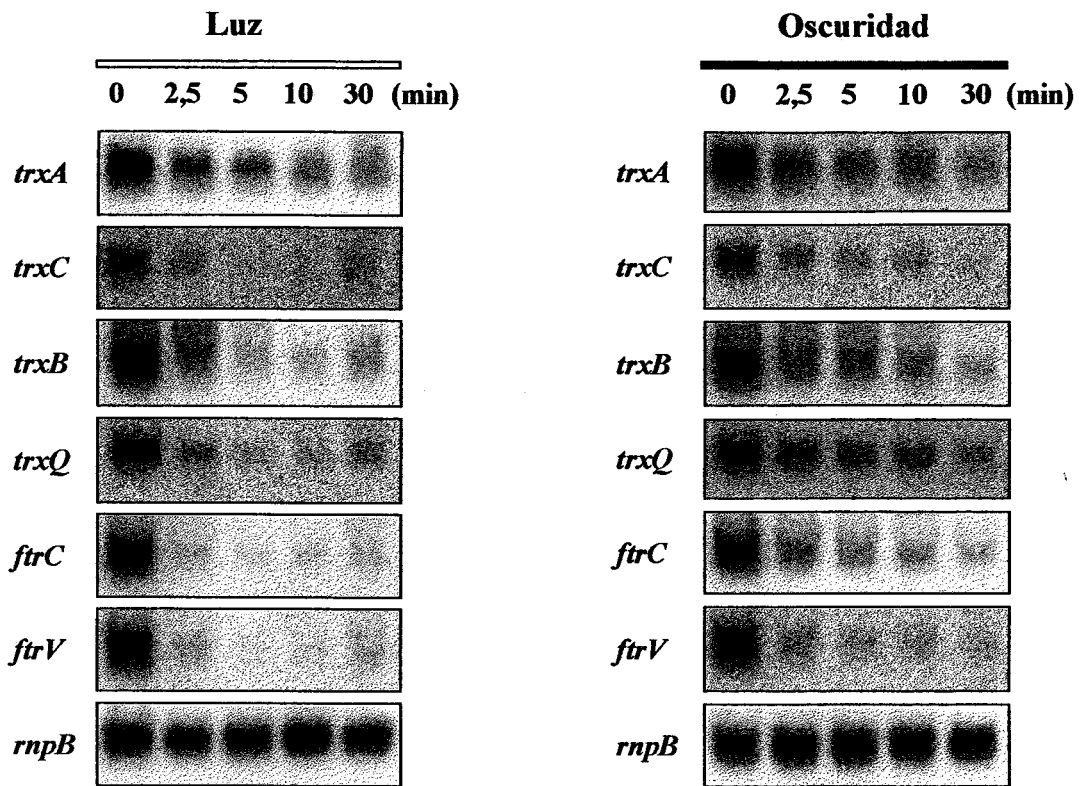
Figura 10. Evolución de los niveles de transcrito de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV* de *Synechocystis* 6803 en la oscuridad

A. Células de *Synechocystis* cultivadas fotoautotróficamente se transfirieron a oscuridad recogiendo muestras para *northern blot* a tiempos 0, 4, 8 y 12 horas. Las muestras de RNA se transfirieron a membranas de nylon Hybond N+ y se hibridaron con las sondas correspondientes a los distintos genes.

B. Representación gráfica de los valores obtenidos en la cuantificación de las señales radiactivas del experimento mostrado en A. Los valores están expresados como % del nivel obtenido en la condición de luz (0), utilizando la hibridación con la sonda del gen *rnpB* como control de carga de los filtros.

Con el objetivo de discernir si las diferencias observadas en los niveles de transcrito de estos genes estaban debidas a variaciones en la tasa de transcripción o bien a una distinta estabilidad del mensajero de estos genes en oscuridad, se determinó la vida media de dichos mensajeros en condiciones normales de iluminación o en oscuridad. Para ello, se tomaron muestras para aislamiento de RNA a diferentes tiempos tras la adición de rifampicina que bloquea el inicio de la transcripción, en cultivos creciendo en condiciones normales de iluminación o en cultivos que se transferían a oscuridad a la vez que se añadía el inhibidor. Como se muestra en la figura 11, la vida media de los mensajeros era similar para todos los genes, tanto en luz como en oscuridad, calculándose una vida media de los transcritos que oscilaba entre 1,5 y 2,5 min, sugiriendo que la distinta disminución de la cantidad de transcrito observada en oscuridad se debía a diferencias en el cese de la transcripción de los genes y no en la estabilidad de los mensajeros.

A



B

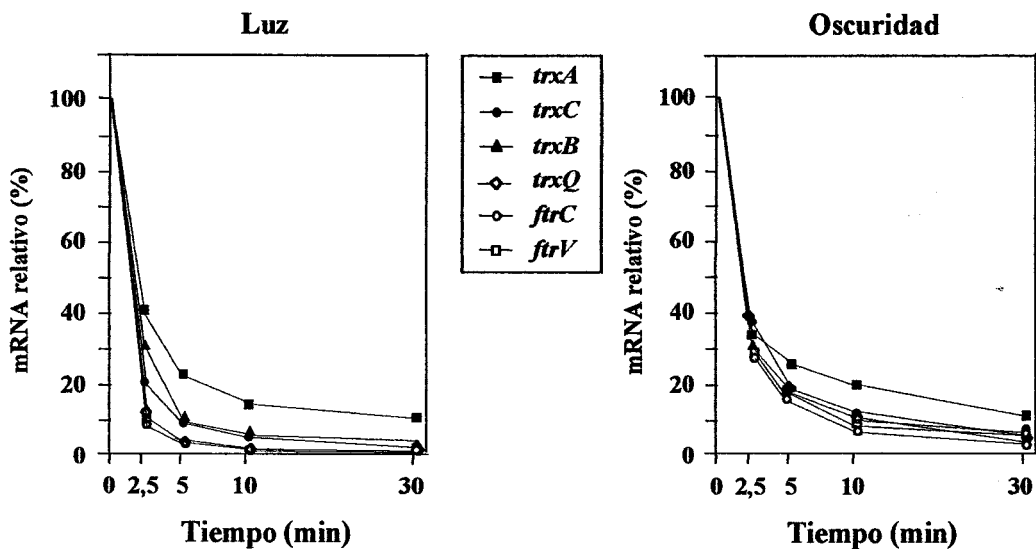


Figura 11. Efecto de la oscuridad en la estabilidad de los transcritos de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV* de *Synechocystis* 6803

A. Cultivos de *Synechocystis* creciendo fotoautotróficamente se transfirieron a t=0 a oscuridad a la vez que se les añadía rifampicina (200 µg/ml), mientras que otros se mantuvieron en luz añadiéndoles la rifampicina al mismo tiempo. En los tiempos indicados se recogieron muestras para el posterior aislamiento de RNA. B. Cuantificación de las cantidades de mRNA relativas al t=0 y a la cantidad de RNA cargado.

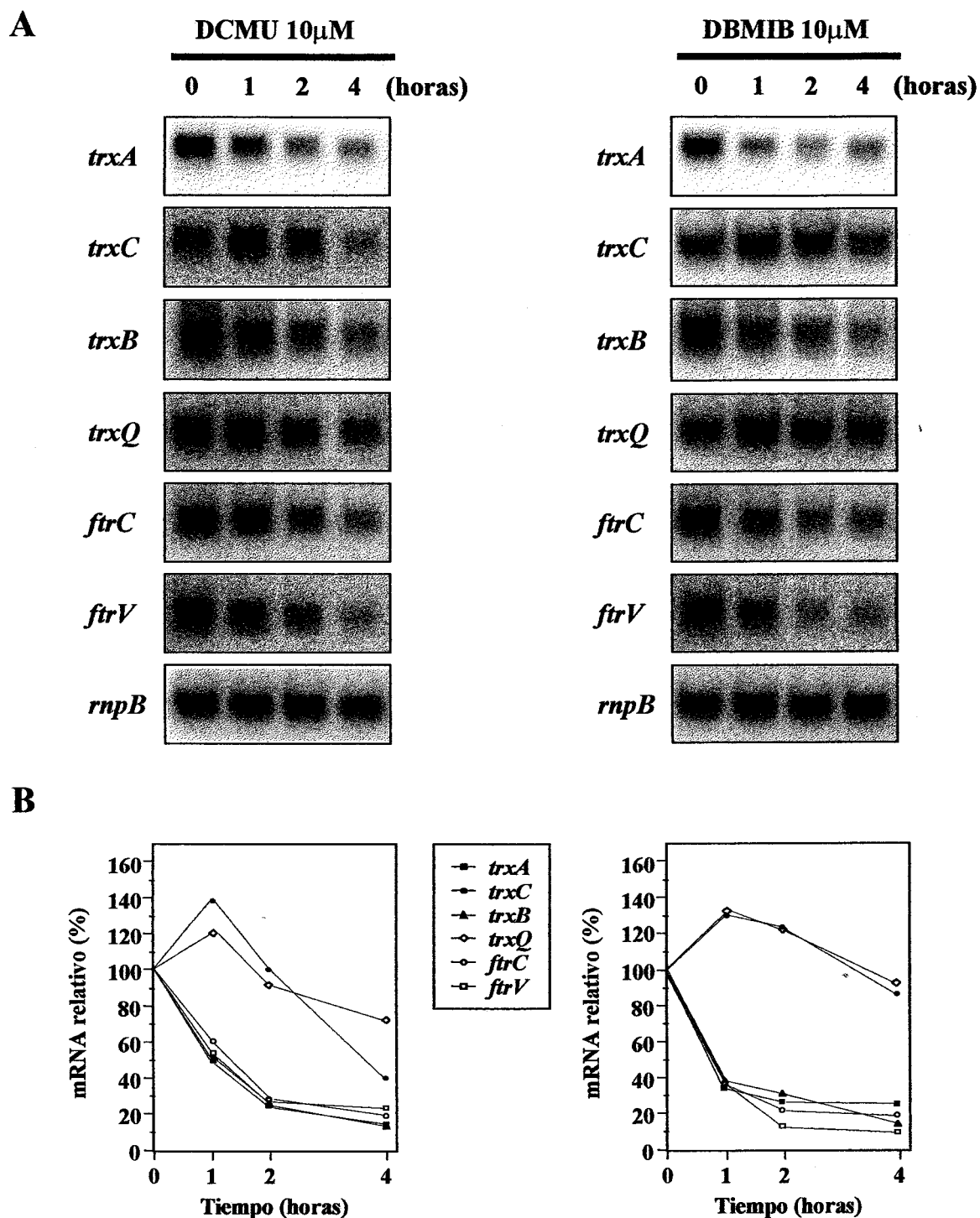


Figura 12. Niveles de mRNA de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV* tras la adición de los inhibidores fotosintéticos DCMU y DBMIB

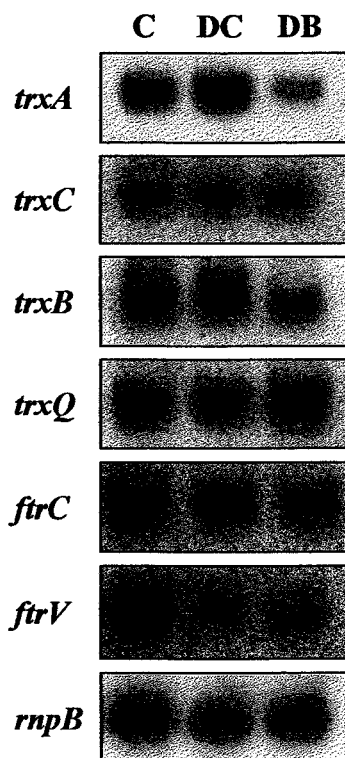
A. Células de *Synechocystis* cultivadas fotoautotróficamente fueron incubadas durante, 1 h, 2 h o 4 h con DCMU 10 μ M o DBMIB 10 μ M, transcurridos los citados tiempos se tomaron muestras para extracción de RNA total que se procesó y se hibridó con las correspondientes sondas de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC*, *ftrV* y *rnpB*. En B se muestra la representación de las señales radiactivas del experimento mostrado en A normalizada a los niveles obtenidos con el gen *rnpB* y expresados como % del t=0.

3.2.2.2. Efecto de inhibidores de la fotosíntesis sobre los niveles de mRNA de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV*.

Ya que los resultados obtenidos hasta este momento parecen indicar que la transcripción de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV* está regulada de alguna u otra manera por el transporte de electrones a través de los fotosistemas, procedimos a investigar los componentes de la cadena de transporte de electrones implicados en dicha regulación. Para ello se utilizaron dos inhibidores fotosintéticos: DCMU, que bloquea la transferencia de electrones entre el PSII y las plastoquinonas (Trebst, 1980) y DBMIB, que inhibe el transporte cíclico de electrones previniendo la oxidación de las plastoquinonas por el complejo del citocromo *b₆f* (Rich *et al.*, 1991). El empleo de concentraciones de DCMU o DBMIB de 5 μ M bloquea por completo el desprendimiento de oxígeno en *Synechocystis* 6803 (Reyes y Florencio, 1995b). En este caso, se determinaron los niveles de transcrito de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV* en células de *Synechocystis* 6803 cultivadas fotoautotróficamente y tratadas con DCMU o DBMIB a una concentración de 10 μ M, durante 1 h, 2 h y 4 h. Como se observa en la figura 12, ambos inhibidores afectaban a la expresión de los genes siendo la disminución de los niveles de transcrito similar a la provocada por la oscuridad (ver Figura 10), en ambos experimentos se observaba un rápido descenso de los niveles de mRNA de los genes *trxA*, *trxB*, *ftrC* y *ftrV*, mientras que en el caso de los genes *trxC* y *trxQ* se podía observar un aumento inicial de los niveles de mRNA durante las primeras dos horas que posteriormente resultaba en un descenso lento de dichos niveles, este efecto también se advertía en los experimentos de transición luz-oscuridad a tiempos cortos (Fig. 9). Sin embargo, cuando ambos inhibidores eran añadidos a cultivos de *Synechocystis* creciendo en luz en presencia de glucosa 10 mM (Fig. 13A y B), el DCMU provocaba un incremento más que un descenso en la transcripción, mientras que el DBMIB aun provocaba el mismo efecto, disminuyendo la cantidad de transcrito aproximadamente en un 50% (Fig. 13B), excepto en el caso del gen *trxQ* donde se apreciaba el mismo efecto que con DCMU, es decir un aumento de la transcripción en los momentos iniciales tras la adición del inhibidor.

Todos estos resultados confirman que la transcripción de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *ftrC*, y *ftrV* en células de *Synechocystis* 6803 creciendo fotoautotróficamente requiere del transporte activo de electrones a través de los fotosistemas y que probablemente el estado redox del pool de plastoquinonas esté involucrado en dicha regulación. Por otro lado, la transcripción del gen *trxQ* responde lentamente a estos cambios, disminuyendo sólo cuando las células se someten a periodos largos de oscuridad, lo que sugiere que el descenso observados en los niveles de mRNA de este gen pueden estar provocados por un descenso general de la transcripción en las células sometidas a largos periodos de carencia de una fuente de energía disponible.

A



B

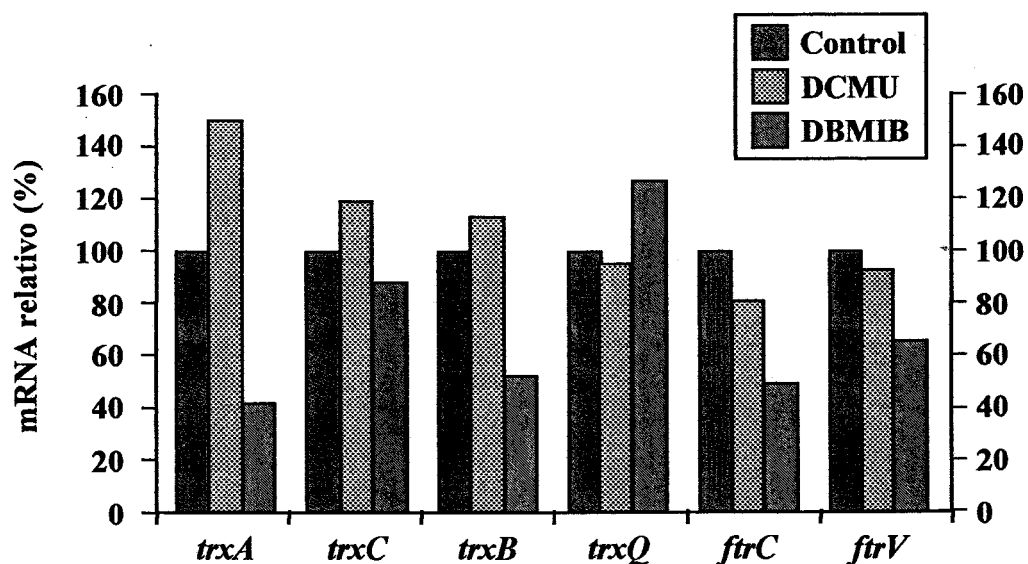


Figura 13. Efecto de los inhibidores fotosintéticos DCMU y DBMIB y de la glucosa sobre la expresión de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV*

A. Cultivos de *Synechocystis* creciendo mixotróficamente (C) fueron incubados durante 1 h con DCMU 10 μ M (DC) o DBMIB 10 μ M (DB), tomándose muestras para extracción de RNA total que posteriormente se sometieron a hibridación con las sondas de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC*, *ftrV* y *rnpB*.

B. Representación de la cuantificación de las señales radiactivas del experimento mostrado en A normalizada a los niveles obtenidos con el gen *rnpB* y expresados como % de C.

3.2.2.3. Efecto de la adición de agentes oxidantes sobre los niveles de los mRNA de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ* y *ftrC* de *Synechocystis* 6803.

El transporte fotosintético de electrones tiende a formar especies de oxígeno reactivas que podrían causar estrés oxidativo en las células (Asada, 1994), por ejemplo la reducción de O₂ molecular con un electrón genera anión superóxido (O₂⁻) en la cara aceptora del fotosistema I (PSI), y seguidamente el O₂⁻ al reaccionar con H₂O produce peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el altamente reactivo radical hidroxilo ([•]OH). Con objeto de estudiar si los genes del sistema tiorredoxina-reductasa:tiorredoxina aumentaban su expresión en respuesta a agentes que provocan estrés oxidativo en las células de *Synechocystis*, procedimos a estudiar su expresión cuando se añadía a los cultivos los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona: vitamina K₃), la menadiona es metabolizada a semiquinona generando especies de oxígeno reactivas tales como anión superóxido, oxígeno singlete y peróxido de hidrógeno.

Con este fin añadimos a cultivos de *Synechocystis* 6803 creciendo fotoautotróficamente, menadiona a una concentración final de 4 ó 40 mM ó H₂O₂ a una concentración final de 0,4 ó 4 mM. Tras 1 h de incubación en las mismas condiciones de cultivo se recogieron muestras para el posterior aislamiento de RNA total y análisis mediante *northern blot*. En la Fig. 14 se muestra el resultado de la hibridación con las sondas de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ* y *ftrC*. En esta hibridación se pudo observar que en presencia de menadiona tenía lugar un incremento significativo de los niveles de los transcritos de los genes *trxA*, *trxB* y *ftrC*. En ambas concentraciones el agente oxidante provocaba un aumento en los niveles de mRNA de estos genes de entre 3 y 4 veces, aunque cuando se utilizaba a la concentración de 4 mM se observaban los niveles más elevados. Este efecto no se observó sobre la expresión de los genes *trxC* y *trxQ*, es más la menadiona provocaba un descenso de aproximadamente un 50% en los niveles del mensajero del gen *trxQ* y apenas afectaba a los niveles del transcrito del gen *trxC*.

Por el contrario la adición al medio de cultivo de H₂O₂ a la concentración 4 mM provocaba un descenso en los niveles de mRNA de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC* y *ftrC*, sin embargo este efecto no se observaba cuando se añadía a la concentración de 0,4 mM, manteniéndose los niveles de mRNA similares a los de la condición inicial. Por otra parte, los niveles de mRNA del gen *trxQ* sí fueron superiores a los iniciales cuando las células se incubaban en presencia de H₂O₂ tanto a 0,4 como a 4 mM. Finalmente observamos que los niveles de transcrito del gen *rnpB*, se mantenían constantes en todas las condiciones de cultivo, con lo que se utilizaron como control de carga de los diferentes carriles en el *northern blot*. Este drástico aumento de los niveles de expresión de los genes *trxA* y *trxB* en presencia de menadiona y del gen *trxQ*, cuando se añadía H₂O₂ al medio de cultivo, claramente apuntaba a que estas tiorredoxinas debían estar implicadas en la respuesta al estrés

oxidativo en *Synechocystis* 6803. Los distintos niveles de expresión que presentan estos genes a la presencia de H_2O_2 o de menadiona, implicarían una respuesta distinta de *Synechocystis* al estrés oxidativo producido por el H_2O_2 que al producido por el anión superóxido.

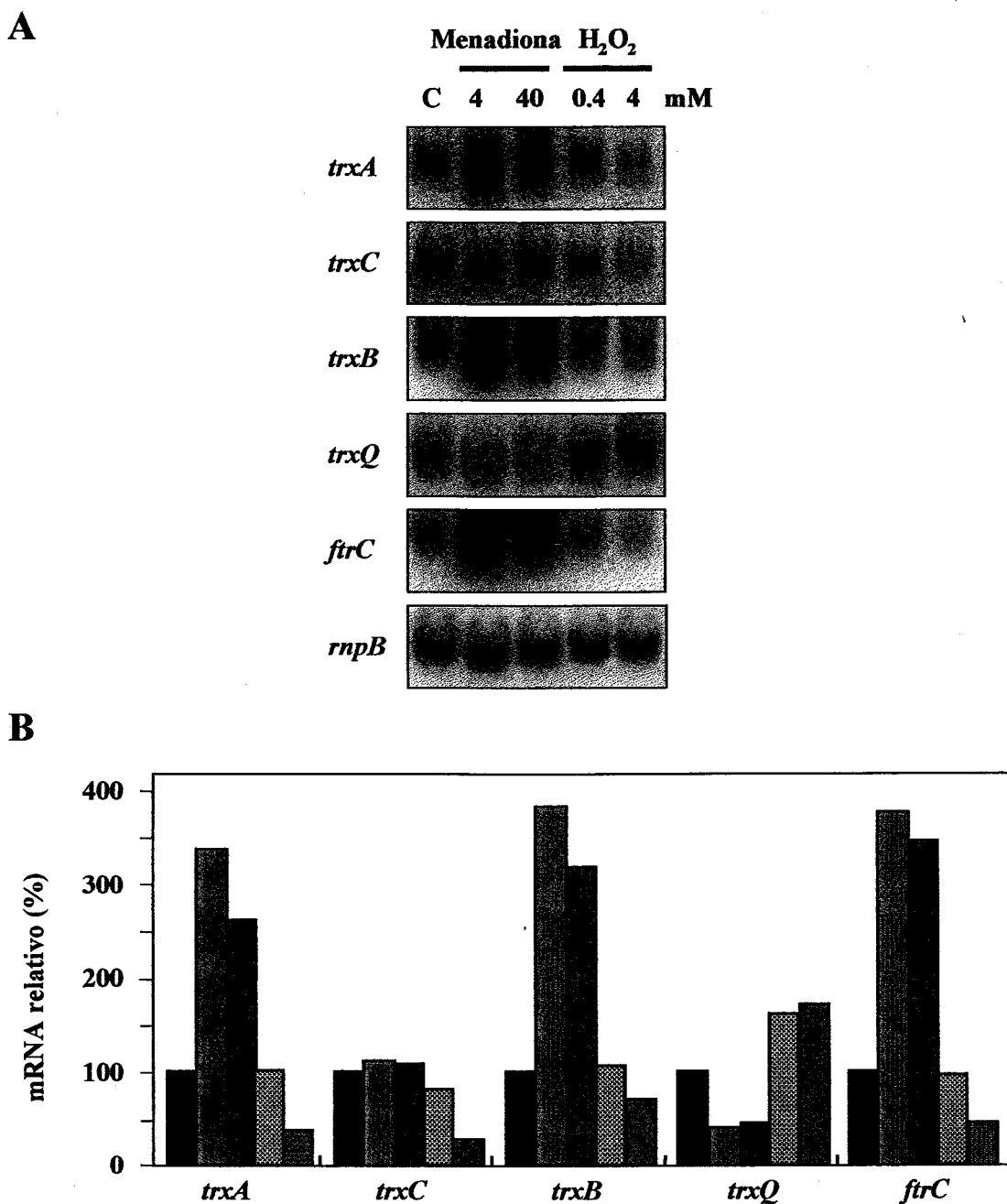


Figura 14. Efecto de la menadiona y del peróxido de hidrógeno sobre la expresión de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ* y *ftnC* de *Synechocystis* 6803

A. Muestras de RNA total aisladas de cultivos de *Synechocystis* creciendo en fase exponencial incubados durante 1 h con menadiona (Vit. K_3) (4 ó 40 mM) o con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (0,4 ó 4 mM) o sin tratar (C) fueron hibridadas con las sondas de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ* y *ftnC*.

B. Niveles relativos de mRNA expresados como % del nivel obtenido en (C), utilizando la hibridación con la sonda del gen *rnpB* como control de carga de los filtros.

3.2.3. Purificación y obtención de anticuerpos de la proteína TrxA de *Synechocystis* 6803

3.2.3.1. Purificación de la proteína TrxA.

Para la síntesis de proteína TrxA de *Synechocystis* 6803 en *E. coli* se construyó el plásmido pTXA1 (Tabla 5, Materiales y Métodos), derivado de pET-3a. Para ello, el fragmento de PCR obtenido con los oligonucleótidos txaNdeI y txabHI (Tabla 7, Materiales y Métodos) conteniendo el gen *trxA* de *Synechocystis* 6803 se cortó con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* para clonarlo en el plásmido pET-3a linearizado con las mismas enzimas de restricción. La diana *NdeI* creada en txaNdeI permitía clonar el fragmento de PCR en el plásmido pET-3a a la distancia adecuada de la secuencia *Shine-Dalgarno*, que en el plásmido pET-3a se encuentra a continuación del promotor del fago T7.

Para la producción de proteína con objeto de iniciar la purificación de ésta, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 con el plásmido pTXA1. Las células tras la transformación se cultivaban a 37 °C en 2 l de medio LB con Ap hasta una DO₆₀₀ de 0,5 y a continuación se inducía la expresión del gen por adición de IPTG 1 mM y se mantenía durante 2 h más en condiciones de cultivo, antes de recoger las células, tal y como se indica en el apartado 2.3.3. de Materiales y Métodos. Las células, una vez recogidas, se resuspendieron en tampón B (Tris-HCl 30 mM pH 7,9) con PMSF 1 mM y se rompieron por sonicación.

El sobrenadante, recuperado tras centrifugación a 19.000 x g durante 20 min a 4 °C, se calentó durante 10 min a 70 °C y las proteínas desnaturalizadas se precipitaron por centrifugación a 19.000. x g durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se aplicó a una columna de DEAE-*Sephacel* (2.5 cm x15 cm) equilibrada en tampón B y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-0.4 M) en 500 ml del mismo tampón. Las fracciones que contenían proteína TrxA se fraccionaron con sulfato de amonio (40% al 90% de saturación) y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de tampón B y directamente se aplicó en una columna de filtración en *Sephacryl* S200-HR (30 cm x 0.8 cm) equilibrada en tampón B suplementado con NaCl 150 mM. Las proteínas se eluyeron a un flujo constante de 7 ml/h con tampón B suplementado con NaCl 150 mM, recuperándose las fracciones que contenían proteína TrxA de *Synechocystis* purificada a homogeneidad electroforética. Tras todo el proceso se obtuvieron 150 mg de proteína TrxA pura. En la Figura 15 se muestran aproximadamente 20 µg de proteína total de las distintas etapas de la purificación de la proteína TrxA, sometidas a electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

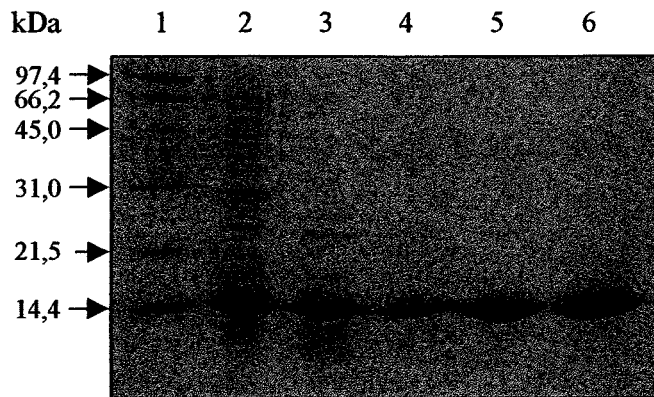


Figura 15. Patrones electroforéticos de proteínas de las distintas etapas de purificación de la proteína TrxA recombinante

Aproximadamente 20 μ g de proteína total de las distintas etapas de purificación de la proteína TrxA se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Carril 2, extracto crudo; carril 3, sobrenadante después de la incubación a 70 °C, carril 4, eluato de la matriz de DEAE-*Sephacel*, carril 5, precipitado del sulfato de amonio al 90% de saturación, carril 6, sobrenadante de calentar a 65 °C; carril 6, eluato de la filtración en la matriz *Sephacryl* S200-HR. Carril 1: marcadores de masa molecular.

3.2.3.2. Obtención de anticuerpos policlonales contra la proteína TrxA.

Para la obtención de suero de conejo contra la tiorredoxina TrxA de *Synechocystis* se utilizaron aproximadamente 2 mg de la proteína TrxA purificada. En una primera inmunización se inyectó 1 mg de la proteína en varios puntos del cuerpo de un conejo albino neozelandés y en las 2 siguientes inmunizaciones se inyectaron 0,5 mg en cada una, como se describe en el apartado 2.3.12.1. de Materiales y Métodos. El suero inmune obtenido se utilizó en una inmunodetección mediante *western blot* sobre extractos crudos de células de *Synechocystis* 6803 cultivadas en distintas condiciones, obteniéndose en todos los casos una sola banda, con un tamaño calculado de aproximadamente 12 kDa, que se debería corresponder con la proteína TrxA. En la figura 16 se muestra el resultado de la inmunodetección.

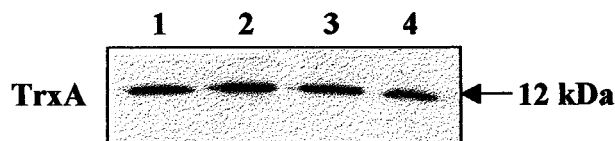


Figura 16. Inmunodetección de la proteína TrxA en extractos crudos de células de *Synechocystis* cultivadas en distintas condiciones

Extractos crudos de células de *Synechocystis* 6803 cultivadas en: presencia de luz, sin glucosa (1) o con glucosa 10 mM (2) o transferidas a oscuridad durante 12 h, en ausencia de glucosa (3) o en presencia de ésta (4), se sometieron a inmunodetección con suero inmune obtenido. Se cargaron 15 μ g de proteína total en cada carril.

3.2.4. Generación de mutantes de los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ* de *Synechocystis* 6803

Con objeto de abordar el estudio de las posibles funciones de las distintas tiorredoxinas de *Synechocystis* 6803, se llevó a cabo la inactivación de los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ* de dicha cianobacteria.

La mutagénesis de estos genes se realizó mediante inserción en éstos de genes que conferían resistencia a antibióticos. En *Synechocystis* 6803 es posible la inactivación de genes de forma dirigida, por recombinación con fragmentos que contengan interrumpiendo el gen que se desea mutar un gen de resistencia a algún antibiótico, tal y como se describe en el apartado 2.4.13. de Materiales y Métodos.

Anteriormente a este trabajo, se habían generado mediante esta técnica estirpes mutantes del gen *trxA* (Navarro y Florencio, 1995), aunque la mutación simple de dicho gen no había sido posible segregarla completamente en el genomio de *Synechocystis* 6803.

En la inactivación de los genes *trxB* y *trxQ* de *Synechocystis* se utilizó la casete C.K1 (*npt* de Tn5) (Elhai y Wolk, 1988), que confiere resistencia a kanamicina y con el gen *trxC* se empleó la casete C.C1 (*cat* de pKT210) (Elhai y Wolk, 1988), que confiere resistencia a cloramfenicol. Los plásmidos resultantes de la inserción de los casetes se designaron pTXB2(+/-), pTXC2(+/-) y pTXQ2(+/-) y están descritos en la Tabla 4, estos plásmidos se utilizaron para transformar *Synechocystis* 6803 como se detalla en el apartado 2.4.13. y se seleccionó su integración en el genomio por recombinación, añadiendo al medio de cultivo kanamicina o cloramfenicol según correspondiese. En todos los casos se obtuvieron transformantes resistentes al antibiótico. Estas estirpes mutantes se denominaron como se indica en la Tabla 1, STXB1(+/-), STXC1(+/-) y STXQ1(+/-) en las cuales los signos (+/-) indican el sentido de transcripción del gen de resistencia con respecto al del gen inactivado.

Dado que *Synechocystis* 6803 es un organismo poliploide que contiene alrededor de 15 copias del cromosoma (Labarre *et al.*, 1989), procedimos a analizar mediante *Southern blot*, por una parte si las interrupciones de los genes se habían producido correctamente y por otra si dichas mutaciones se habían segregado completamente en el genomio de las estirpes mutantes. En la Fig. 17 se muestra el resultado de las hibridaciones sobre DNA total de las estirpes mutantes, utilizando como sonda las regiones amplificadas para clonar los diferentes genes. El DNA total de los mutantes se digería con la enzima de restricción apropiada en cada caso y que nos permitía diferenciar entre las copias mutadas y silvestres de los genes. En todas las hibridaciones se utilizaba además una digestión de DNA total de la estirpe silvestre como testigo. En la Fig. 17 se muestra también un esquema de la región cromosómica modificada, donde las flechas oscuras representan los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ* de *Synechocystis* y las flechas claras los genes de resistencia a antibióticos.

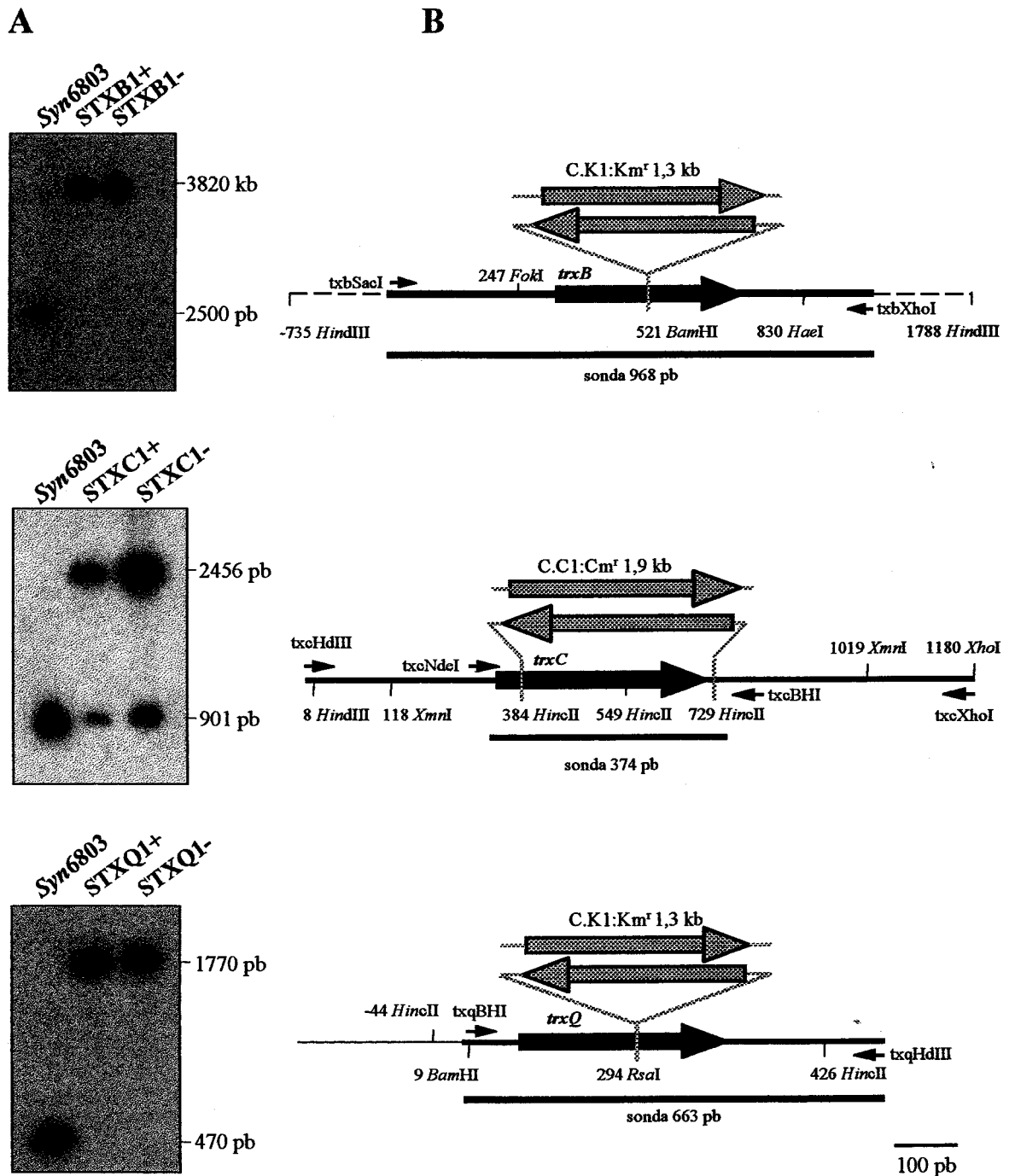


Figura 17. Análisis de la estructura de la región cromosómica de los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ* en la estirpe silvestre y en las estirpes mutantes de *Synechocystis* 6803

A. El DNA total de *Synechocystis* 6803 (estirpe silvestre) y de las estirpes mutadas en los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ* fue digerido con las enzimas de restricción apropiadas (STXB1/*Hind*III, STXC1/*Xmn*I y STXQ1/*Hinc*II) y se hibridó mediante *Southern blot* utilizando como sondas las regiones amplificadas por PCR para clonar los respectivos genes. La banda de mayor tamaño en pb corresponde en cada caso con las copias cromosómicas mutadas y la de menor tamaño con las copias silvestres.

B. Esquema de las regiones cromosómicas los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ*. Las flechas oscuras representan los genes de las tiorredoxinas y las claras los genes de resistencia a antibióticos. Se han representado los sitios de restricción de distintas enzimas utilizadas indicando la posición relativa con respecto a la región clonada (barra gruesa). Las flechas pequeñas representan los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones. La línea punteada representa la región de DNA donde no se mantiene la escala. En los genes de resistencia a antibiótico tampoco se mantiene la escala.

Como se puede observar, las estirpes mutadas en los genes *trxB* y *trxQ* (STXB1 y STXQ1) mostraban una sola banda cuyo tamaño se correspondía con el esperado en las interrupciones y no presentaban la banda correspondiente a la copia silvestre, lo que indicaba que las interrupciones de los genes *trxB* y *trxQ* habían sido totalmente segregadas en el genomio, la segregación era además completa en ambas orientaciones del gen de resistencia, este resultado hacía suponer que las proteínas codificadas por los genes *trxB* y *trxQ* eran dispensables para la viabilidad de *Synechocystis* al menos en las condiciones estándar de cultivo, que en este caso fueron las utilizadas.

Sin embargo, la estirpe STXC1 mutada en el gen *trxC* presentaba en ambas orientaciones copias silvestres del gen *trxC* además de copias mutadas. Esta última mutación se intentó segregar utilizando en el medio de cultivo altas concentraciones de cloramfenicol, hasta 80 µg/ml. En ningún caso se obtuvo una segregación completa de la mutación, sugiriendo en este resultado que el gen *trxC* era esencial para *Synechocystis* 6803, en las condiciones de cultivo utilizadas.

3.2.5. Caracterización de las estirpes STXB1, STXC1 y STXQ1 de *Synechocystis* 6803

3.2.5.1. Análisis de la tasa de crecimiento y de la velocidad del desprendimiento de oxígeno.

Como primer paso en la caracterización de las estirpes mutantes de los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ* procedimos a analizar si éstas estaban afectadas en la tasa de crecimiento. Para ello se inocularon cultivos de las distintas estirpes mutantes y de la estirpe silvestre, y se mantuvieron creciendo a 30 °C en matraces, con agitación continua e iluminados con luz blanca de 25 µE·m⁻²·s⁻¹ de intensidad. Los cultivos se inoculaban todos a una concentración de clorofila de 0,25 µg/ml y la tasa de crecimiento se calculaba cuantificando la concentración de clorofila en los cultivos, como se describe en el apartado 2.5.1. Los cultivos de las estirpes mutantes se mantenían en presencia del antibiótico, especialmente en el caso de la estirpe STXC1 donde la mutación del gen no estaba completamente segregada.

Como se observa en la figura 18, las estirpes STXB1 y STXQ1 crecían durante todo el tiempo a una tasa prácticamente igual a la de la estirpe silvestre. La estirpe STXC1 por el contrario, presentaba durante los primeros días de cultivo una tasa de crecimiento menor que la de la estirpe silvestre con tiempos de duplicación de 48 h frente a las 24 h de la estirpe silvestre, sin embargo dicha estirpe tras 6 días de cultivo y cuando alcanzaba una concentración de clorofila de aproximadamente 2 µg/ml presentaba una tasa de crecimiento similar a la de la estirpe silvestre y en definitiva la misma que la de las estirpes STXB1 y STXQ1. La diferencia de crecimiento presentada por STXC1 con respecto a la estirpe silvestre durante la fase exponencial de crecimiento nos hizo

pensar que esta proteína pudiese tener un papel específico en las primeras fases de cultivo y que esta función podría ser dispensable cuando las células alcanzaban la fase estacionaria de crecimiento.

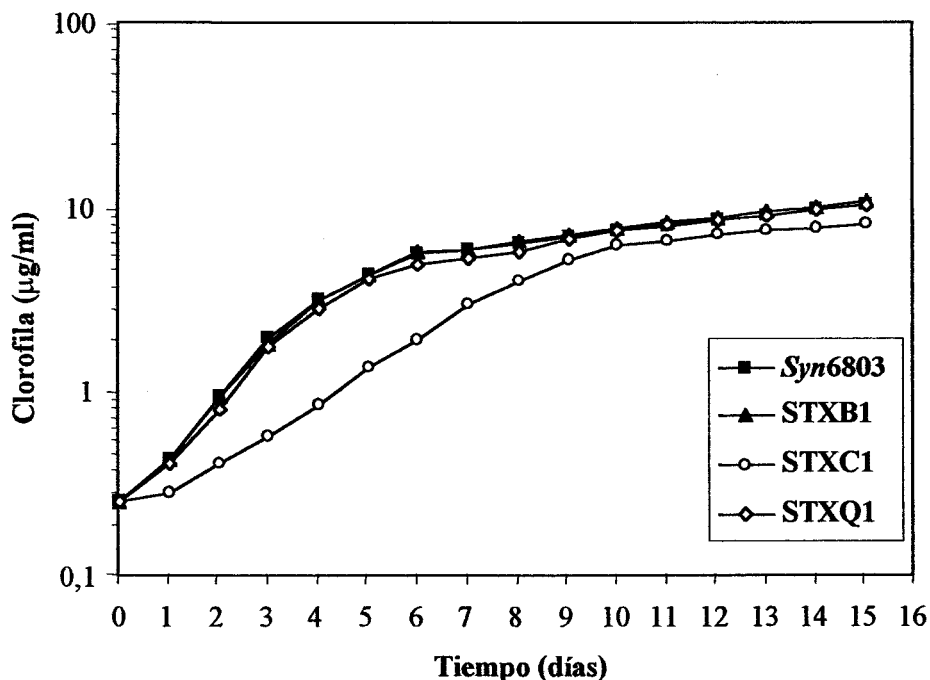


Figura 18. Curvas de crecimiento de las estirpes mutantes STXB1, STXC1 y STXQ1 y de la estirpe silvestre de *Synechocystis* 6803

Los cultivos de las estirpes mutantes y de la estirpe silvestre se inocularon a partir de cultivos en fase exponencial, en medio BG11c a una concentración de clorofila de $0,25 \mu\text{g/ml}$ y se mantuvieron creciendo durante 15 días a 30°C en matraces, con agitación continua e iluminados con luz blanca de $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La tasa de crecimiento se calculaba cuantificando la concentración de clorofila como se describe en el apartado 2.5.1. Los cultivos de las estirpes STXB1 y STXQ1 se mantenían en presencia de kanamicina $50 \mu\text{g/ml}$ y los de la estirpe STXC1 en presencia de cloramfenicol $20 \mu\text{g/ml}$. Los datos son medias de tres experimentos independientes.

Una vez comprobado que solamente la estirpe STXC1 presentaba diferencias en la tasa de crecimiento con respecto a la estirpe silvestre, procedimos a determinar si las estirpes mutantes estaban afectadas en la tasa de desprendimiento de oxígeno, ya que ésta es una buena medida de la actividad fotosintética de la célula. La determinación de la velocidad de desprendimiento de oxígeno se realizó utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark en cultivos creciendo en condiciones de burbujeo y cuando estos alcanzaban una concentración de clorofila de aproximadamente $5 \mu\text{g/ml}$. Como se observa en la Tabla 8, de manera similar a como ocurría con la tasa de crecimiento, la tasa de desprendimiento de oxígeno no se afectaba de manera drástica en las estirpes STXB1 y STXQ1, pero sí lo hacía de manera drástica para la estirpe STXC1, siendo ésta aproximadamente un 10% de la presentada por la estirpe silvestre. Por otra parte, en este experimento observamos que en cierta manera, todas las estirpes mutantes estaban afectadas en la tasa de desprendimiento de oxígeno, pero

para las estirpes STXB1 y STXQ1 este efecto solamente suponía una disminución de aproximadamente un 25% con respecto a la estirpe silvestre, lo cual no era observable en una menor tasa de crecimiento.

Tabla 9. Velocidad de desprendimiento de oxígeno de las estirpes STXB1, STXC1 STXQ1 y silvestre de *Synechocystis* 6803

Las medidas fueron realizadas utilizando un electrodo de oxígeno tipo Clark modelo YSI 5331 con células enteras procedentes de cultivos creciendo en medio BG11c en condiciones de burbujeo. Cuando los cultivos alcanzaban una concentración de clorofila de aproximadamente 5 µg/ml se recogían, se lavaban con medio fresco y se resuspendían a una concentración final de 15 µg de Chl/ml Los ensayos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos.

Estirpe	nmoles O ₂ /(mg prot x min ⁻¹)
Silvestre	5,8
STXB1	4,4
STXC1	0,6
STXQ1	4,2

Estos resultados hacían pensar que las funciones desempeñadas por las tiorredoxinas TrxB y TrxQ eran dispensables en las condiciones estudiadas o bien que estas funciones podían ser realizadas por alguna de las otras tiorredoxinas o bien por otra proteína distinta. Mientras que el fenotipo mostrado por la estirpe STXC1 junto con la imposibilidad de segregar al 100% la mutación claramente indicaban que la tiorredoxina TrxC era indispensable para el normal crecimiento de *Synechocystis* 6803, en las condiciones estudiadas. Por otro lado este último resultado apuntaba a que las diferencias observadas en la tasa de crecimiento de STXC1 con respecto a las otras estirpes, podían estar debidas más a un defecto en la capacidad fotosintética de la célula que a una función específica de la tiorredoxina TrxC limitada a la fase exponencial de crecimiento, ya que en las condiciones de cultivo utilizadas para los estudios de crecimiento, un factor importante que podría estar provocando que los cultivos empezasen a crecer más lentamente sería que la intensidad luminosa que estuviesen recibiendo sólo fuese saturante cuando la concentración de clorofila de los cultivos fuese suficientemente baja y una vez que los cultivos alcanzaban aproximadamente una concentración de clorofila de 2 µg/ml la intensidad que recibiría cada célula sería insuficiente para mantener la tasa fotosintética máxima y empezarían a crecer más lentamente. Esta actividad fotosintética disminuida por la carencia de luz saturante podría alcanzar en la estirpe silvestre valores similares a los que presenta la estirpe STXC1 y en definitiva una vez alcanzados esos valores ambas estirpes crecerían a la misma velocidad, llegando finalmente los cultivos a concentraciones de células bastante próximas.

3.2.5.2. Estudio de la tasa de crecimiento de la estirpe STXC1 bajo distintas intensidades de luz.

Con objeto de determinar si el fenotipo mostrado por la estirpe STXC1 era debido a un defecto en la capacidad fotosintética de las células y para comprobar si existían diferencias en la tasa de crecimiento de la estirpe STXC1 con respecto a la estirpe silvestre en condiciones donde la cantidad de luz recibida por las células no fuese el factor limitante, procedimos a cultivar ambas estirpes bajo distintas intensidades de luz. Las intensidades de luz utilizadas fueron en este caso: 10, 50, 150 y 500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Partiendo de cultivos en medio líquido en condiciones de agitación, se inocularon cultivos de las estirpes silvestre y STXC1 en condiciones de burbujeo, a una concentración inicial de clorofila de a 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 150 ml en medio BG11c. Los cultivos se mantuvieron durante 24 h bajo iluminación de 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad para adaptarlos a las condiciones de burbujeo. Tras este periodo los cultivos se dividieron en cuatro tubos de 30 ml y un cultivo de cada estirpe se pasó a cada una de las condiciones de intensidad luminosa anteriormente definidas, recogándose muestras cada 24 h para cuantificar la tasa de crecimiento, mediante medidas de la concentración de clorofila y de la concentración de proteína total de los cultivos. Las medidas de clorofila se realizaron como se describe en el apartado 2.5.1. de Materiales y Métodos y la concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (apartado 2.3.5. de Materiales y Métodos).

El primer efecto que se observó fue que los cultivos de la estirpe STXC1 presentaban un color amarillento cuando se cultivaban a intensidades de luz superiores a 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En la Fig. 16, se muestra el aspecto que presentaban los cultivos tras 4 días creciendo en estas condiciones. Como se puede observar la estirpe silvestre presentaba en todas las condiciones un color verde-azulado típico de esta cianobacteria, observándose un color algo más anaranjado a intensidades de luz de 500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, provocado probablemente por la acumulación de carotenoides (Goodwin, 1980). La tonalidad más clara que se advierte en el cultivo incubado a 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ era debida a que en estas condiciones el crecimiento era más lento y tras 4 días de cultivo aún no se habían alcanzado las altas concentraciones de clorofila que se alcanzaban en el caso de los cultivos creciendo a intensidades de luz superiores. Sin embargo la estirpe STXC1 sólo presentaba el mismo aspecto verde-azulado que la estirpe silvestre a 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa, presentando un aspecto amarillento-anaranjado en el resto de las condiciones, esta característica no se había observado previamente de forma tan drástica cuando la estirpe se cultivaba en condiciones de agitación, probablemente debido a que la luz que recibían los cultivos era insuficiente para provocar este efecto.

Cuando se analizaron los datos obtenidos de las tasas de crecimiento se observó el mismo efecto, es decir la estirpe STXC1 solamente se comportaba como la silvestre a 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de

intensidad luminosa presentando en el resto de las condiciones tasas de crecimiento bastante menores que la estirpe silvestre, como se muestra en las figuras 20 y 21.

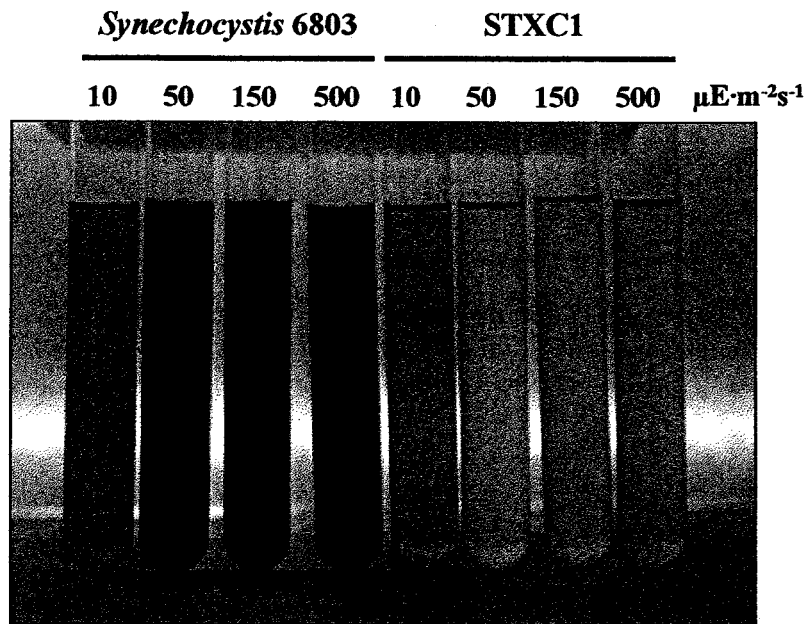


Figura 19. Cultivos de las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803 creciendo bajo distintas intensidades de luz

Los cultivos de ambas estirpes se inocularon en medio BG11c a una concentración de clorofila de $0,3 \mu\text{g}/\text{ml}$ y se mantuvieron 24 h en condiciones de gaseo iluminados a una intensidad de $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, tras lo cual se incubaron durante 4 días en condiciones de gaseo bajo las intensidades de luz indicadas en la figura.

Como se observa en la Fig. 20, en la condición de $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ los tiempos de duplicación de la estirpe STXC1 referidos como $\mu\text{g Chl}/\text{ml}$ eran similares a los de la estirpe silvestre, con tiempos de generación de aproximadamente 24 h. Mientras que en $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ la estirpe silvestre presentaba tiempos de duplicación 4 veces más cortos que en $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la estirpe STXC1 era incapaz de crecer, manteniéndose la concentración de clorofila durante los 4 días que duró el experimento en valores muy similares a los iniciales. De este resultado podíamos deducir que cuando la estirpe STXC1 era sometida, en condiciones de burbujeo, a intensidades de luz de $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o superiores, los cultivos además de tomar un aspecto amarillento, no aumentaban la concentración de clorofila tras 4 días de cultivo. Por otra parte, también se observaba que bajo las intensidades de luz de 150 y $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ambas estirpes se comportaban de manera similar a como lo hacían en $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ al menos a nivel de concentración de clorofila. En la Fig.21 se muestran los valores de las medidas de la concentración de proteína en los mismos cultivos, estimadas por del método de Lowry en células enteras. Aquí también se observaban las mismas diferencias en las tasas de crecimiento entre ambas estirpes cuando se utilizaban intensidades de luz de $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o superiores. Al igual que ocurría con los niveles de clorofila, los niveles de proteína aumentaban de forma casi paralela en ambas

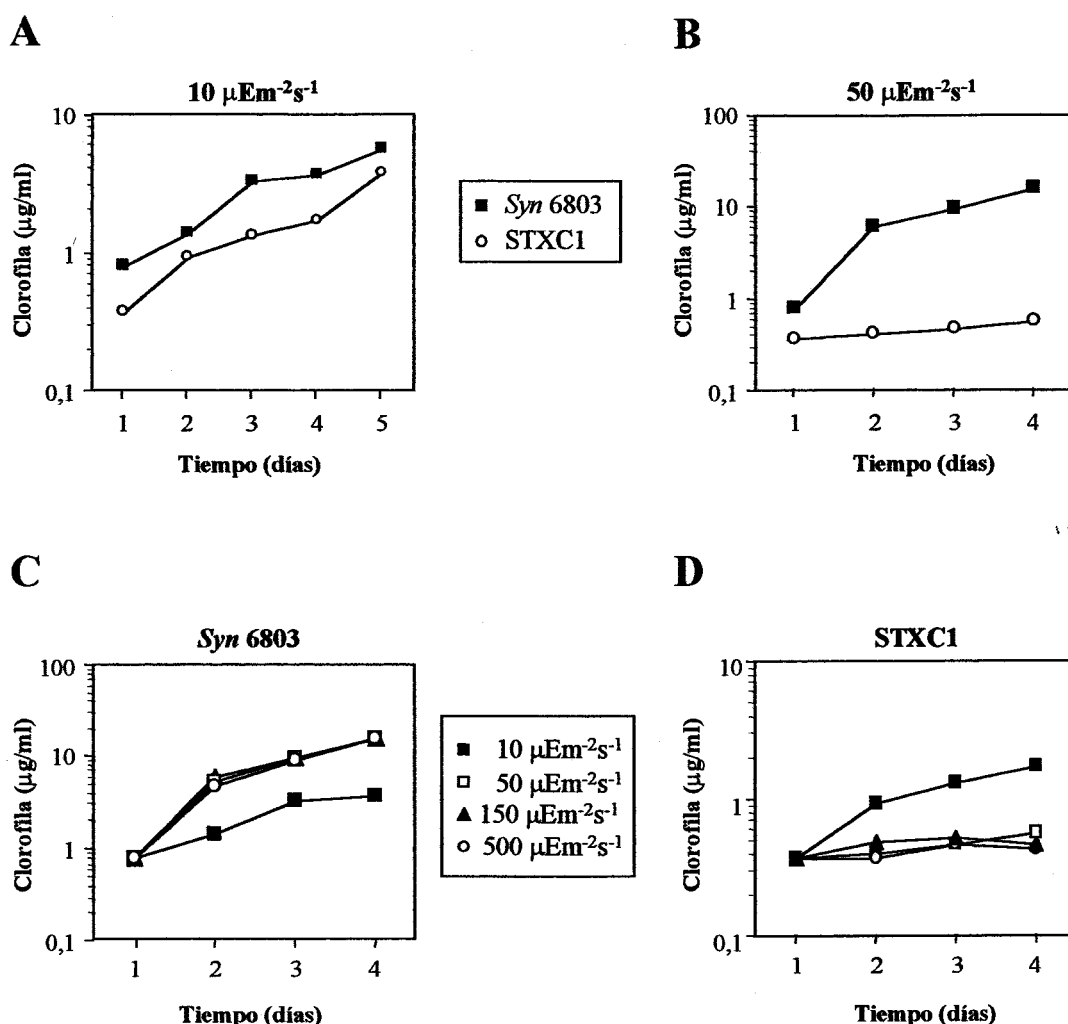


Figura 20. Curvas de crecimiento de las estirpes silvestre y STXC1 sometidas a distintas intensidades de luz, representadas como concentración de clorofila en los cultivos

Los cultivos de ambas estirpes se inocularon a una concentración de clorofila de $0,3 \mu\text{g/ml}$ y se incubaron durante 24 h a una intensidad de luz de $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, tras lo cual se dividieron y se pasaron a 50 , 150 ó $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ó se mantuvieron a $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Las medidas de la concentración de clorofila se realizaron cada 24 h como se describe en el apartado 2.5.1. de Materiales y Métodos.

A-B. Curvas de crecimiento de las estirpes silvestre (*Syn 6803*) y STXC1 cultivadas a $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (A) o a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (B).

C. Curvas de crecimiento de la estirpe silvestre (*Syn 6803*) cultivada a 10 , 50 , 150 ó $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

D. Curvas de crecimiento de cultivos de la estirpe STXC1 creciendo a 10 , 50 , 150 ó $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

estirpes en la condición de $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, pero cuando las células se sometían a intensidades de luz superiores, la estirpe mutante apenas crecía, aunque en este caso sí se observó un cierto crecimiento de la estirpe STXC1, aunque el aumento de la concentración de proteína fue 3 veces inferior al presentado en la condición de luz más baja y 10 veces menor que el presentado por el silvestre en las mismas condiciones de iluminación. El crecimiento del silvestre sí se correspondía con los datos de crecimiento obtenidos de las medidas de concentración de clorofila en los cultivos.

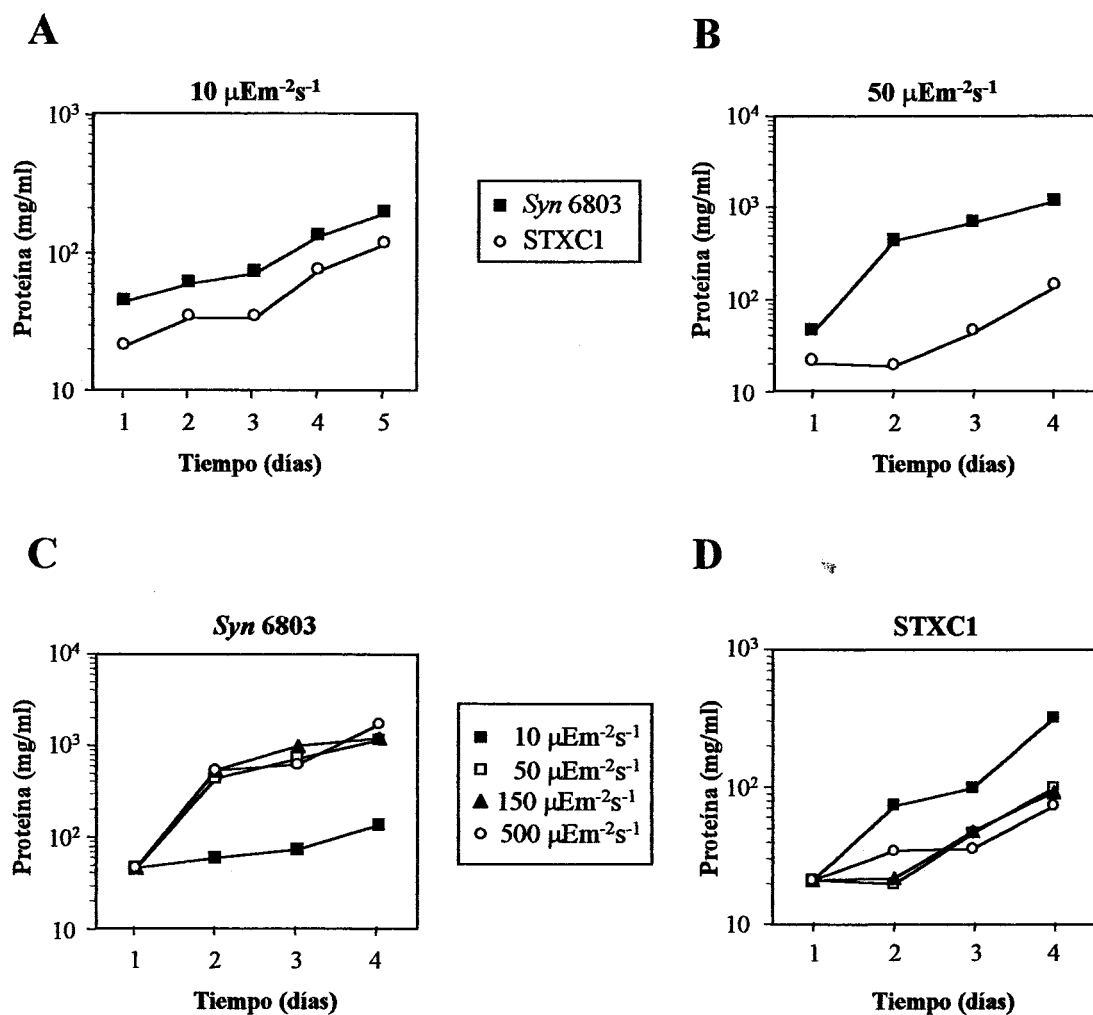


Figura 21. Curvas de crecimiento de las estirpes silvestre y STXC1 cultivadas a distintas intensidades de luz, representadas como concentración de proteína total en los cultivos

De los cultivos del experimento anterior se tomaron muestras a los mismos tiempos para la posterior cuantificación de la proteína total. Las medidas de la concentración de proteína se realizaron mediante el método de Lowry según se describe en el apartado 2.3.5. de Materiales y Métodos.

A-B. Curvas de crecimiento de las estirpes silvestre (*Syn 6803*) y *STXC1* cultivadas a $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (A) o a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (B).

C. Curvas de crecimiento de la estirpe silvestre (*Syn 6803*) cultivada a 10, 50, 150 ó $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

D. Curvas de crecimiento de cultivos de la estirpe *STXC1* creciendo a 10, 50, 150 ó $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

De todas formas no dejaba de ser llamativo el hecho de que la estirpe *STXC1* aumentara los niveles de proteína total y no los de clorofila, porque esto implicaría que los cultivos estaban de alguna manera creciendo sin aumentar la cantidad de clorofila total. Este resultado junto al hecho del color amarillento de los cultivos nos hizo pensar que el mutante podía estar sufriendo algún tipo de degradación de los fotosistemas provocado por la intensidad de luz recibida.

Con el objetivo de discernir si realmente se estaba produciendo un proceso de fotodegradación, procedimos en primer lugar a determinar las concentraciones de ficobiliproteínas; ficocianina y aloficocianina en células de las estirpes silvestre y *STXC1* cultivadas en 10 o en 50

$\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz. Las ficobiliproteínas se agrupan en complejos macromoleculares llamados ficobilisomas, los ficobilisomas (PBS) forman el principal complejo aceptor de luz en las cianobacterias actuando como pigmentos antena del fotosistema II (PSII). La determinación del contenido en ficocianina y aloficocianina de las muestras de células se llevó a cabo por el método descrito por Siegelman y Kycia, como se describe en el apartado 2.5.3. de Materiales y Métodos. En la Tabla 10 se presentan los valores obtenidos en muestras que se habían ajustado a una concentración de clorofila de $8 \mu\text{g}/\text{ml}$. El resultado obtenido apuntaba a que realmente estaba ocurriendo algún proceso de degradación de los fotosistemas, ya que en muestras ajustadas a la misma cantidad de clorofila, ambas estirpes a $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ presentaban cantidades de ficocianina y aloficocianina casi idénticas, mientras que a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ los cultivos de la estirpe STXC1 presentaban aproximadamente un 50% de ficocianina y un 66% de aloficocianina con respecto a la estirpe silvestre. Si se calculaba la concentración de ficobiliproteínas por ml de cultivo, las diferencias en las células cultivadas a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ llegaban a ser de 20 veces, este resultado nos hacía suponer que efectivamente debía estar ocurriendo algún fenómeno de fotodegradación.

Tabla 10. Concentración de ficobiliproteínas; ficocianina y aloficocianina, en células de las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803 cultivadas bajo 10 o $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz

Las medidas fueron realizadas como se describe en el apartado 2.5.3. de Materiales y Métodos con células procedentes de cultivos creciendo con iluminación de 10 o $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad. Para relativizar las medidas las muestras se igualaron a una concentración de clorofila de $8 \mu\text{g}/\text{ml}$. Los datos de concentración de ficobiliproteínas están referidos a μg de clorofila.

	<i>Synechocystis</i> 6803		STXC1	
	$10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	$50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
Ficocianina ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Chl)	54,5	56,7	57,3	28,8
Aloficocianina ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ Chl)	44,8	31,3	47,8	20,7

Por otra parte, como los cultivos de la estirpe mutante tomaban una tonalidad amarillenta-anaranjada cuando se cultivaban a intensidades de luz de $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ o superiores, pensamos que como mecanismo de protección las células podían estar acumulando carotenoides (Goodwin, 1980). Muestras de células cultivadas a 10 y $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ fueron analizadas en su composición en carotenoides en el laboratorio del Prof. Sandmann, los datos obtenidos tanto de las cantidades de carotenoides totales como de la distribución de éstos en diferentes tipos indicaban que no existían diferencias en este aspecto entre el mutante y el silvestre, por lo que las diferencias de coloración

estaban debidas a otras causas, probablemente la perdida de clorofila y de ficobiliproteínas podría estar provocando que se observase la coloración debida a los carotenoides, aunque las cantidades totales de estos fuesen similares en las dos estirpes.

Dado que el fenotipo mostrado por la estirpe STXC1 sugería que el mutante estaba sufriendo algún proceso de degradación de los fotosistemas cuando se cultivaba a una intensidad de luz de $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, procedimos a analizar si existían diferencias en la expresión de los genes *psbA* en la estirpe silvestre y en la mutante cuando se cultivaban a las intensidades de luz de 10 y $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.2.5.3. Análisis de la expresión de los genes *psbA* en las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803.

La fotoinhibición del centro de reacción del PSII está provocada principalmente por la formación de agentes oxidantes dentro del propio centro de reacción (Aro *et al.*, 1993). El daño neto provocado está determinado por el balance entre degradación y síntesis de los componentes del centro de reacción (Samuelsson *et al.*, 1985, Samuelsson *et al.*, 1987, Wünschmann y Brand, 1992). Los genes *psbA* codifican la proteína D1, que junto a la proteína D2 y al citocromo *b₅₅₉* forman el centro de reacción del PSII (Gounaris *et al.*, 1989). En *Synechocystis* 6803, como en otras cianobacterias existen tres copias de este gen llamadas *psbA1*, *psbA2* y *psbA3* (Willians, 1988). La copia *psbA1* no se expresa en la estirpe silvestre (Mohamed *et al.*, 1989), y las copias *psbA2* y *psbA3* codifican productos idénticos y ambas se transcriben, aunque el 90% del transcrito *psbA* procede de la expresión del gen *psbA2* (Mohamed *et al.*, 1989). La exposición del PSII a la luz provoca la inactivación irreversible de la proteína D1, lo que conlleva su posterior degradación y sustitución por una copia nueva (Matoo *et al.*, 1984), presentando esta proteína un alto nivel de sustitución cuando las células están creciendo en presencia de luz. El aumento de la tasa de síntesis de la proteína D1 en alta luz parece estar regulado en cianobacterias a nivel transcripcional (Mohamed y Jansson, 1989, Golden, 1995). El alto nivel de sustitución presentado por esta proteína nos hizo pensar que el mutante STXC1 podría estar afectado en la capacidad de sintetizar, al ritmo necesario, la proteína D1 y de ahí que el fenotipo se observase solamente en intensidades de luz donde la velocidad de degradación de la proteína D1 es alta.

Para comprobar si la estirpe STXC1 presentaba una disminución en la tasa de transcripción de los genes *psbA*, procedimos a aislar RNA total de células de las estirpes silvestre y STXC1 cultivadas en 10 ó $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Los RNAs fueron analizados mediante *northern blot*, utilizando como sonda un fragmento de DNA sintetizado por PCR con los oligonucleótidos *psbA1* y *psbA2* (Tabla 7) que comprendía completa la región codificante del gen *psbA2*. Esta sonda también

detectaría el transcrito procedente de la expresión del gen *psbA3*. Sobre el mismo filtro, una vez eliminada la sonda del gen *psbA2*, se llevó a cabo también una hibridación con la sonda de la región codificante del gen *trxC*, ya que la mutación de este gen no estaba completamente segregada en el cromosoma de la estirpe STXC1 y hasta ahora no se habían cuantificado los niveles de expresión de este gen en el mutante. En la Fig. 22, se muestra el resultado de la hibridación con estas dos sondas. La hibridación con la sonda del gen *rnpB* se utilizó como control de carga de los diferentes carriles.

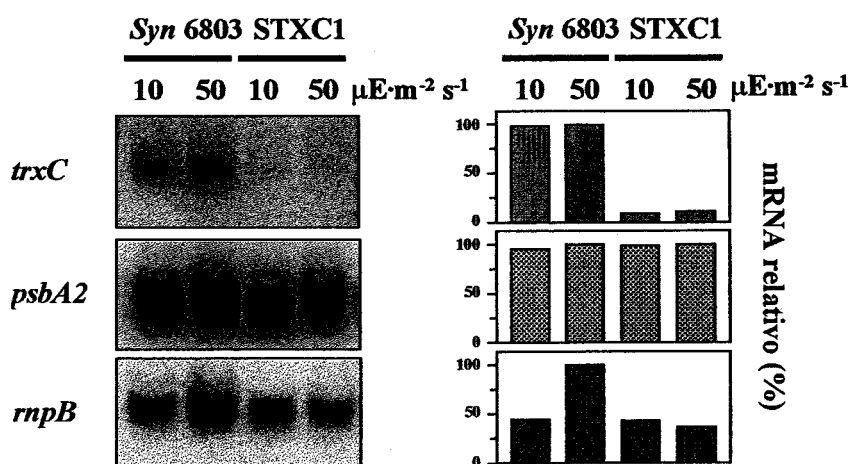


Figura 22. Niveles de transcrito de los genes *trxC* y *psbA* en las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803 cultivadas a una intensidad de luz de 10 ó 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$

Muestras de RNA total obtenidas de células de las estirpes silvestre (*Syn* 6803) y STXC1 cultivadas durante 48 h, en condiciones de burbujeo a 10 ó 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, se sometieron a detección mediante *northern blot* utilizando como sonda las secuencias completas de los genes *trxC* y *psbA2*. Los niveles relativos de mRNA están expresados como % del nivel detectado en el silvestre creciendo a 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, utilizando la hibridación con la sonda del gen *rnpB* como control de carga del filtro.

En la figura 22 se observa primeramente que los niveles de mRNA del gen *trxC* son similares en la estirpe silvestre en ambas condiciones de iluminación. Por otro lado también se puede observar que los niveles del transcrito de este gen son bastante bajos en la estirpe mutante, aproximadamente un 15% de los detectados en el silvestre, estos niveles se pueden correlacionar perfectamente con el grado de segregación de la mutación en el genomio del mutante (Fig. 17). Pero también observamos que los niveles de mRNA detectados con la sonda del gen *psbA2* son similares en ambas estirpes en las dos condiciones de iluminación utilizadas, lo que nos llevaba a descartar que fuese una disminución en la tasa de transcripción del gen *psbA2* lo que estaba provocando el fenotipo mutante. Por último también podíamos comprobar que existía una mayor carga de RNA total en el carril correspondiente a la estirpe silvestre cultivada en 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, como demostraba la hibridación con la sonda del gen *rnpB*.

Una vez descartada la posibilidad de que el mutante estuviese afectado en los niveles de transcripción de los genes *psbA* y dado que se ha descrito que en *Synechocystis* 6803 la estabilidad de los mensajeros de estos genes desempeña un importante papel como elemento regulador de la expresión (Mohamed y Jansson, 1991), procedimos a estudiar si existían diferencias en la estabilidad de estos mensajeros entre la estirpe STXC1 y la silvestre.

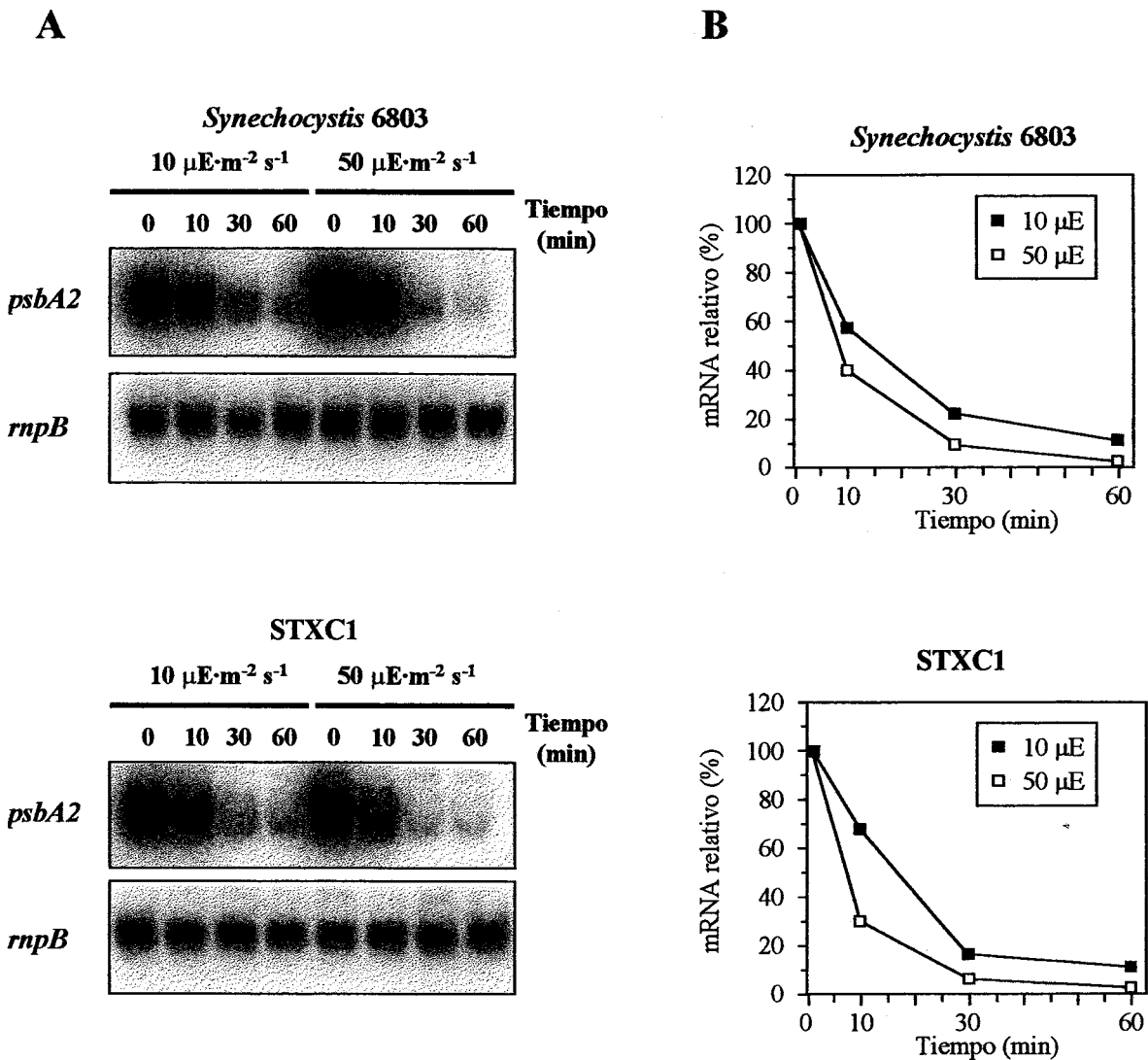


Figura 23. Vidas medias de los transcritos de los genes *psbA* en las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803

A. Se recogieron muestras de células de las estirpes silvestre y STXC1 cultivadas a 10 ó 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, en los tiempos indicados, tras la adición de rifampicina (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El RNA total de las muestras se aisló como se describe en 2.4.15.1 y se hibridó con una sonda que comprendía la secuencia completa del gen *psbA2*.

B. Cuantificación de las cantidades de mRNA relativas al t=0 y a la cantidad de RNA total cargado.

Con este fin se tomaron muestras para el posterior aislamiento de RNA total, a diferentes tiempos tras la adición de rifampicina, en cultivos creciendo en condiciones normales de iluminación ($50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) o en cultivos iluminados con luz tenue ($10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). En la Fig. 23 se muestra el resultado de la hibridación empleando la misma sonda del gen *psbA2* utilizada en el experimento anterior. Aquí de nuevo podíamos observar que no existían diferencias apreciables entre ambas estirpes, ni entre las dos condiciones de iluminación utilizadas, que pudieran explicar el fenotipo mutante, por lo que finalmente podíamos concluir que la estirpe STXC1 no estaba afectada ni en la expresión ni en la estabilidad de los genes *psbA*.

3.2.5.4. Inmunodetección de la proteína D1 en las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803.

Una vez establecido que la estirpe STXC1 no estaba afectada en la transcripción de los genes *psbA*, procedimos a analizar si ésta presentaba diferencias en los niveles de proteína D1 en comparación con la estirpe silvestre. Con este fin, se realizaron experimentos de inmunodetección mediante *western blot*, utilizando anticuerpos policlonales obtenidos contra la proteína D1 de espinaca, en muestras de membranas tilacoidales aisladas de ambas estirpes, creciendo bien en condiciones de iluminación tenue ($10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), o en condiciones normales de iluminación ($50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las membranas tilacoidales se aislaron siguiendo el método descrito por Berger *et al.* 1991, con las modificaciones que se describen en el apartado 2.3.2. de Materiales y Métodos.

En la Fig. 24 podemos observar el resultado de la inmunodetección mediante *western blot* utilizando anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos contra la proteína D1 de espinaca.

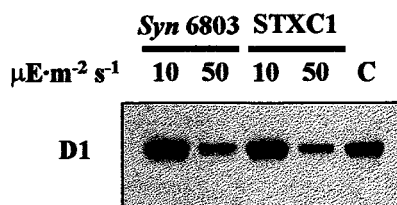


Figura 24. Inmunodetección de la proteína D1 en membranas tilacoidales de células de las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803

Membranas tilacoidales aisladas de células de las estirpes silvestre (*Syn* 6803) y STXC1 de *Synechocystis* 6803, cultivadas en condiciones de burbujeo e iluminadas con luz de 10 ó $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad, se sometieron a inmunodetección mediante *western blot*, utilizando anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos contra la proteína D1 de espinaca. Se utilizó un aislamiento de membranas tilacoidales de espinaca como control, (C). Se cargaron $15 \mu\text{g}$ de proteína total en cada carril.

Como se puede observar, tampoco existían diferencias en los niveles de proteína D1, entre la estirpe silvestre y la mutante, aunque sí se advertía en ambas estirpes que los niveles detectados en la condición de $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ eran mayores que los observados en la de $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, este efecto podría estar debido a que en baja luz, la velocidad de síntesis de la proteína D1 excede a la de degradación (Komenda y Barber, 1995), por lo que en esta condición los niveles de proteína D1 son mayores que en el resto de las condiciones donde la velocidad de degradación se iguala o incluso supera a la de síntesis. Tras estos resultados y asumiendo que la proteína D1 es la principal diana en los procesos de fotoinhibición del PSII (Aro *et al.*, 1983), parece descartable una implicación de este fotosistema en el fenotipo mostrado por la estirpe STXC1.

3.2.5.5. Análisis de los niveles de mRNA de los genes *psaA*, *psaB* y *psaC* de las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803.

Aunque se considera que el fotosistema II (PSII) es más susceptible a los procesos de fotoinhibición que el fotosistema I (PSI) (Aro *et al.*, 1993), ya que el PSI *in vivo* es más resistente que el PSII a los tratamientos con luz de alta intensidad (Powles, 1984), se ha demostrado que en membranas tilacoidales aisladas, el PSI es tan susceptible al daño provocado por la luz como el PSII (Inoue *et al.*, 1986, 1989).

El PSI está compuesto en cianobacterias por 11 polipéptidos diferentes, que se nombran con el nombre genérico PsaX y su gen correspondiente como *psaX*, siendo las funciones de alguna de las subunidades desconocidas. Con el propósito de comprobar si la estirpe STXC1 estaba afectada en la síntesis de alguno de los polipéptidos que forman el PSI, procedimos en primer lugar a analizar en esta estirpe los niveles de los transcritos de los genes *psaA*, *psaB* y *psaC*. Los genes *psaA*, *psaB* y *psaC* codifican respectivamente los polipéptidos PsaA, PsaB y PsaC. PsaA y PsaB conforman el núcleo central del PSI (Fish y Bogorad, 1986) y junto a PsaC, son las únicas subunidades del PSI que contienen cofactores redox (Ikeuchi, 1992).

Con este propósito se sintetizaron por PCR con los oligonucleótidos descritos para tal fin en la Tabla 7, dos sondas que comprendían respectivamente las secuencias completas de los genes *psaA* y *psaC*. El gen *psaA* se cotranscribe en *Synechocystis* junto con el gen *psaB* (Smart y McIntosh, 1991) con lo que la sonda sintetizada detectaría el cotranscrito de ambos genes. Las hibridaciones con estas dos sondas se realizaron sobre el mismo filtro utilizado en el apartado 3.2.5.5. En la Fig. 25 se muestran los resultados de las hibridaciones. En la hibridación con la sonda del gen *psaA*, se observaban dos bandas, correspondiéndose la superior con el cotranscrito de los genes *psaA* y *psaB* y la menor con el transcrito individual del gen *psaA* (Smart y McIntosh, 1991). La sonda del gen

psaC daba hibridación con una única banda. De todas formas en ninguno de los dos casos se observaban diferencias entre las dos estirpes en ninguna de las condiciones de iluminación utilizadas, teniendo en cuenta que el carril correspondiente a la estirpe silvestre en $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ estaba sobrecargado. De este resultado tampoco podíamos sacar ninguna conclusión acerca del fenotipo de la estirpe mutante, aparte de que la estirpe STXC1 presentaba niveles de mRNA de los genes *psaA*, *psaB* y *psaC* similares a los de la estirpe silvestre en las condiciones estudiadas.

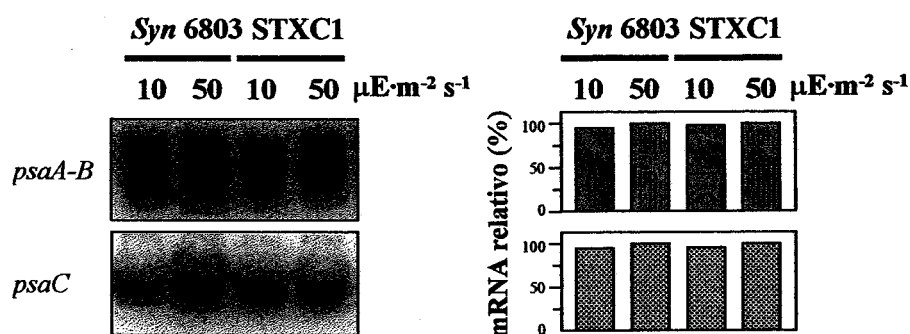


Figura 25. Niveles de transcrito de los genes *psaA-B* y *psaC* en las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803

El mismo filtro utilizado en las hibridaciones con las sondas de los genes *trxC* y *psbA2* (apartado 3.2.5.5), fue rehibridado con las sondas de los genes *psaA* y *psaC*. Los niveles relativos de mRNA están expresados como % del nivel detectado en la estirpe silvestre cultivada a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$, utilizando la hibridación anterior con la sonda del gen *rnpB* como control de carga.

3.2.5.6. Estudio de los niveles de proteínas del PSI en las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803.

Una vez comprobada que la expresión de los genes *psaA*, *psaB* y *psaC* no estaba afectada en la estirpe mutante y por tanto no podía ser la causa del fenotipo observado, procedimos a detectar mediante *western blot* los niveles de proteínas del PSI en las estirpes silvestre y mutante, empleando anticuerpos policlonales obtenidos contra el complejo total del PSI de espinaca.

La inmunodetección se llevó a cabo utilizando las mismas muestras de membranas tilacoidales aisladas de las estirpes silvestre y mutante en el experimento descrito en el apartado 3.2.5.5. En este caso también se añadió como control un carril con muestras membranas tilacoidales aisladas de espinaca. En la Fig. 26, se muestra el resultado del *western blot*. Aquí podemos observar en primer lugar que los anticuerpos obtenidos contra el complejo de espinaca reaccionan con una sola banda en las muestras de membranas tilacoidales de *Synechocystis*, que por el tamaño

mostrado, alrededor de 17 kDa, se podría corresponder con las subunidades PsaF o PsaL, cuyos tamaños deducidos son 15 kDa y 17 kDa respectivamente, mientras que en las muestras de espinaca los anticuerpos reaccionan al menos con 5 polipéptidos, presentando una de las bandas el mismo tamaño que la que aparece en *Synechocystis*. Pero el resultado, más interesante que se presenta aquí es que en el carril correspondiente a la estirpe STXC1 cultivada a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidades de luz hay un claro descenso en los niveles de este polipéptido en comparación con los niveles presentados por la estirpe silvestre en ambas condiciones de iluminación y con el carril correspondiente a la propia estirpe STXC1 creciendo a $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz, indicando que el fenotipo mostrado por la estirpe STXC1 podría estar debido a un proceso de fotodegradación específico de al menos de uno de los polipéptidos del PSI.

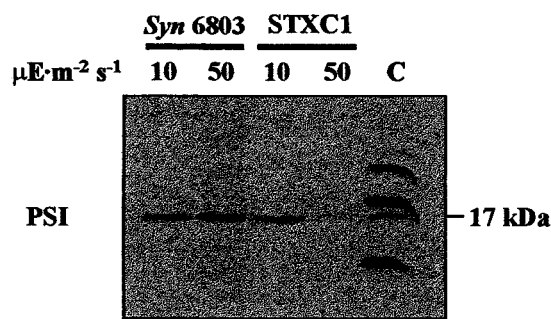


Figura 26. Inmunodetección de polipéptidos del complejo PSI en membranas tilacoidales aisladas de células de las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803

Utilizando las mismas muestras de membranas tilacoidales que en el *western blot* mostrado en la Fig. 23, aisladas de células de las estirpes silvestre (*Syn* 6803) y STXC1 de *Synechocystis* 6803, cultivadas en condiciones de burbujeo e iluminadas con luz de 10 ó $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad, se llevó a cabo una nueva inmunodetección, utilizando esta vez anticuerpos policlonales mono-específicos obtenidos contra el complejo PSI completo de espinaca. En el carril C se cargó un aislamiento de membranas tilacoidales de espinaca como control. Se cargaron $15 \mu\text{g}$ de proteína total en cada carril.

Este resultado claramente demuestra que los niveles de uno de los polipéptidos del PSI, probablemente PsaF o PsaL, disminuyen drásticamente cuando las células de la estirpe STXC1 se cultivan a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz y que esta debe ser una de las causas del fenotipo mostrado por esta estirpe, pero dado lo dramático de este fenotipo mostrado, probablemente sea el complejo PSI completo el que está sufriendo este proceso de fotodegradación. Las causas de este proceso y las proteínas a las que afecta, tendrán que ser estudiadas en más detalle para poder comprender los mecanismos están implicados en el mantenimiento de un aparato fotosintético en estado funcional.

3.2.6. Generación de mutantes del gen *trxA* de *Synechocystis* 6803

Como se comenta en el apartado 3.2.6, la mutagénesis simple del gen *trxA* (Navarro y Florencio, 1995), no había sido posible segregarla completamente en el genomio de *Synechocystis* 6803, obteniéndose solamente la segregación completa de la mutación, cuando se expresaba simultáneamente en *Synechocystis* una copia del gen *trxM* de *Anacystis nidulans* (Navarro y Florencio, 1995). Dado que esta tiorredoxina además de ser esencial para el crecimiento de *Synechocystis*, es la que presenta mayor grado de identidad con el resto de las tiorredoxinas tipo-*m* de plantas y con las de bacterias, nos planteamos la generación de una estirpe mutante de *Synechocystis* donde el gen *trxA* se encontrase bajo el control de un promotor, desde el cual la expresión del gen fuese totalmente reprimible por algún factor, en principio independiente, del papel fisiológico que pudiese llevar a cabo dicha tiorredoxina. De esta forma se podría obtener la segregación completa de la mutación en la condición donde el gen se expresara y estudiar el fenotipo presentado por la estirpe mutante en la condición restrictiva donde el gen no se expresaría. En el momento de comenzar este proyecto, se estaba utilizando con éxito en nuestro laboratorio, la expresión regulada por cobre de genes esenciales de *Synechocystis* 6803 (García-Domínguez, comunicación personal) desde el promotor del gen *petJ*, que codifica el citocromo c_6 . En ciertas algas y cianobacterias, el citocromo c_6 (también definido como citocromo c_{553}) o la plastocianina (codificada por el gen *petE*), funcionan como transportadores de electrones entre el complejo del citocromo *b₆f* y el PSI, siendo la disponibilidad de cobre en el medio de cultivo lo que regula la presencia de una u otra proteína en las células (Sandmann *et al.*, 1983, Sandmann, 1986). En *Synechocystis* 6803, cuando las células se cultivan en presencia de CuSO_4 30 nM, presentan niveles detectables tanto de transcrito del gen *petJ*, como de citocromo c_6 , mientras que no presentan transcrito del gen *petE* ni tampoco niveles detectables de plastocianina. Sin embargo cuando las células se cultivan con 1 μM de CuSO_4 en el medio de cultivo presentan transcrito del gen *petE* y plastocianina y no presentaban transcrito del gen *petJ* ni tampoco citocromo c_6 (Zhang *et al.*, 1992).

Al ser posible reprimir por cobre la expresión de genes esenciales cuando estos son expresados desde el promotor del gen *petJ* (García-Domínguez, comunicación personal), procedimos a construir una estirpe mutante de *Synechocystis* con el gen *trxA* bajo el control del promotor del gen *petJ*.

3.2.6.1. Construcción de la estirpe mutante STXA1 de *Synechocystis* 6803.

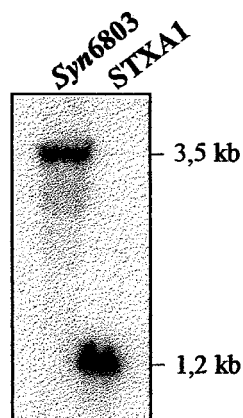
La estrategia a llevar a cabo para la clonación del gen *trxA* bajo el control del promotor del gen *petJ*, era la de sustituir el promotor del gen *trxA* por el del gen *petJ* sobre el propio locus del gen

trxA. Con este objetivo, el primer paso a realizar fue la clonación del promotor del gen *petJ*. Esta clonación se llevó a cabo mediante amplificación por PCR de los 423 pb situados justamente delante del putativo codón de iniciación de la traducción del gen *petJ*, utilizando como cebadores los oligonucleótidos *petJ/NdeI* y *petJ/SalI* (Tabla 8). El fragmento de DNA así obtenido se clonó en el vector pGEM-T y se seleccionaron los clones que contenían el fragmento en la misma orientación que el gen *lacZ*. La posterior secuenciación de este fragmento mostraba que su secuencia se correspondía con la región promotora del gen *petJ*, y que se le había introducido un sitio de restricción *SalI* en el extremo 5' y otro *NdeI* en el extremo 3'. Este plásmido se denominó pPEJ1 (Tabla 6). La digestión de pPEJ1 con *SalI* y la clonación en este sitio de restricción de la casete C.K1 (Elhai y Wolk, 1988) en orientación contraria al promotor del gen *petJ* originó el plásmido pPJCK1 (Tabla 6). Por otro lado también se amplificó por PCR con los oligonucleótidos *txaNdeI* y *txaXhoI* (Tabla 8), un fragmento de DNA de 710 pb que contenía el gen *trxA*, al cual se le había creado con el oligonucleótido *txaNdeI* un sitio de restricción *NdeI* sobre el codón de iniciación de la traducción, lo que permitía clonarlo en fase con el promotor del gen *petJ*, este plásmido se denominó pTXA2. La digestión del plásmido pPJCK1 con la enzima *NdeI* permitía aislar un fragmento de 1,7 kb que contenía el promotor del gen *petJ* junto con la casete C.K1. Este fragmento se clonó en los sitios *NdeI* de pTXA2, seleccionándose los plásmidos que contenían al gen *trxA* en fase con el promotor del gen *petJ*, este nuevo plásmido se denominó pTXA3 (Tabla 6). Una digestión doble del plásmido pFNT4 (Tabla 4) con las enzimas *HincII* y *XhoI* eliminaba la mayor parte de la región clonada en este vector, pero dejaba aproximadamente 500 pb delante del gen *trxA* eliminando solamente 62 pb de la región promotora de este gen, originándose así el plásmido pTXA4. La inserción en los sitios *HincII* y *XhoI* de pTXA4 del fragmento *HincII-XhoI* del plásmido pTXA3, que contenía al gen *trxA* en fase con el promotor del gen *petJ* e incluía a la casete C. K1, producía un nuevo plásmido denominado pTXA5, este plásmido contenía finalmente el gen *trxA* clonado en fase con el promotor del gen *petJ*, la casete C. K1 en orientación contraria al gen *trxA* y aguas arriba de la casete, contenía 508 pb de la región promotora del gen *trxA* a la que le faltaban las primeras 62 pb contiguas al gen *trxA*. Con el plásmido pTXA5 procedimos a transformar la estirpe silvestre de *Synechocystis* 6803, añadiendo al medio de cultivo kanamicina, para seleccionar su integración en el genomio por recombinación, los transformantes así obtenidos se denominaron STXA1.

Para determinar si se había producido la recombinación como esperábamos y si la segregación de los cromosomas mutados era completa, se analizó por hibridación la región que contiene el gen *trxA* en uno de los transformantes STXA1 y en la estirpe silvestre. Los DNA genómicos de ambas estirpes se cortaron con la enzima *BstXI*, la cual presenta una diana de corte en el promotor del gen *petJ* y no en el del gen *trxA*, esperándose cuando se hibridaba con una sonda que

comprendía la secuencia codificante completa del gen *trxA*, una banda de aproximadamente 1,2 kb en los cromosomas donde la mutación se había insertado correctamente y una de 3,5 kb en los cromosomas silvestres. Como se observa en la figura 27A, la estirpe mutante presentaba una única banda cuyo tamaño se correspondía con la construcción mutante, en lugar de la banda silvestre de 3,5 kb, lo que confirmaba que la estirpe STXA1 presentaba todas las copias del gen *trxA* bajo el control del promotor del gen *petJ*.

A



B

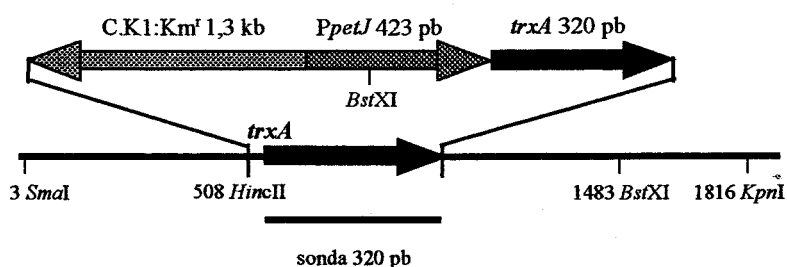


Figura 27. Análisis de la estructura de la región cromosómica del gen *trxA*, en las estirpes silvestre y STXA1 de *Synechocystis* 6803

A. El DNA total de las estirpes silvestre (*Syn6803*) y STXA1 fue digerido con la enzima de restricción *BstXI* y se hibridó mediante *Southern blot* utilizando como sonda la secuencia completa del gen *trxA* amplificada por PCR. La banda de mayor tamaño (3,5 kb) se corresponde con las copias silvestres y la de menor tamaño (1,2 kb) con la construcción mutante.

B. Esquema de la región cromosómica del gen *trxA*. La flecha negra representa el gen *trxA*, la gris la casete de resistencia a kanamicina (C.K1) y la flecha azul representa el promotor del gen *petJ*. Se han representado los sitios de restricción de distintas enzimas utilizadas indicando la posición relativa con respecto a la región clonada (barra gruesa).

3.2.6.2. Caracterización de la estirpe mutante STXA1 de *Synechocystis* 6803.

Una vez comprobado que la estirpe STXA1 no presentaba ninguna copia del gen *trxA* bajo su propio promotor, procedimos a estudiar si la expresión de este gen estaba ahora regulada por la presencia de cobre en el medio de cultivo. Con el objetivo de que las trazas de CuSO_4 que contiene el medio BG11c no afectaran a la expresión desde el promotor del gen *petJ*, procedimos a realizar todos los cultivos en un medio BG11c donde se había eliminado el CuSO_4 de su composición, a este medio se le denominó BG11- Cu^{2+} , cuando se requería la presencia de cobre en el medio de cultivo se añadía CuSO_4 a una concentración final de 5 μM previa esterilización del mismo.

Para analizar la expresión del gen *trxA* en la estirpe STXA1 se llevó a cabo un experimento de *northern blot*, donde a cultivos de la estirpe silvestre y STXA1 en fase exponencial, creciendo en medio BG11- Cu^{2+} , se les añadía CuSO_4 5 μM y se recogían muestras a tiempos 0, 1 h, 2 h y 4 h, para el posterior aislamiento de RNA total e hibridación con una sonda que comprendía la secuencia completa del gen *trxA*. En la Fig. 28A se muestra el resultado de la hibridación.

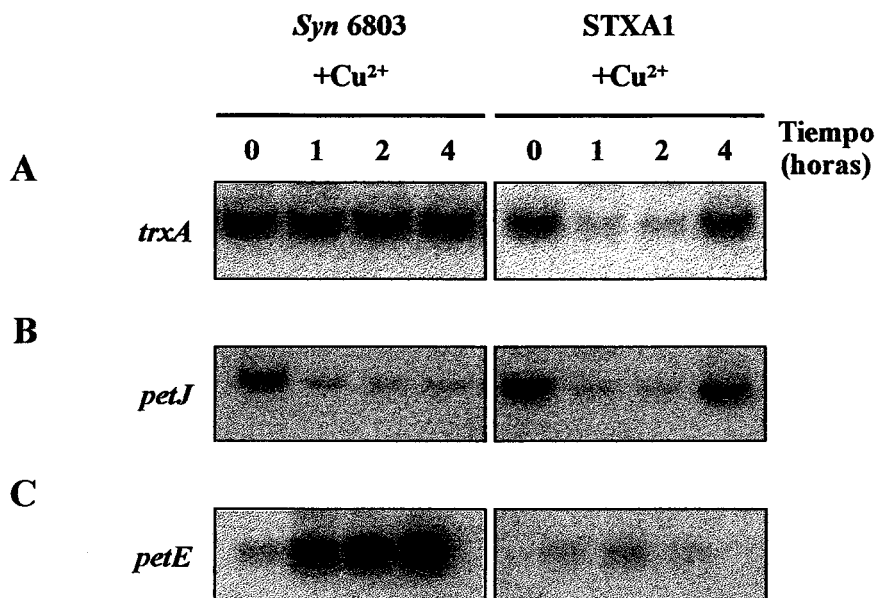


Figura 28. Evolución de los niveles de transcrito de los genes *trxA*, *petJ* y *petE* tras la adición de CuSO_4 5 μM

Cultivos de las estirpes silvestre (*Syn* 6803) y STXA1 creciendo en medio BG11- Cu^{2+} , se incubaron durante 4 h en presencia de CuSO_4 5 μM recogiendo muestras en los tiempos indicados para el posterior aislamiento de RNA total. **A.** Resultado de la hibridación utilizando como sonda el fragmento de DNA que comprende la secuencia del gen *trxA*. **B.** Resultado de la hibridación con una sonda que incluye la secuencia completa del gen *petJ*. **C.** Resultado obtenido de la hibridación de los mismos filtros anteriores con una sonda que comprendía la secuencia completa del gen *petE*.

En esta figura podíamos observar un comportamiento en la expresión del gen *trxA* en la estirpe STXA1 distinto al esperado, ya que los niveles del transcrito del gen *trxA* volvían a ascender a niveles similares a los iniciales trascurridas 4 h de la adición del CuSO₄. Por otra parte también se advertía que los niveles iniciales de transcrito del gen *trxA* eran inferiores en la estirpe STXA1 que en la silvestre, sugiriendo que los niveles de expresión desde el promotor del gen *petJ* eran inferiores que desde el promotor del gen *trxA*. Finalmente también se podía observar que en la estirpe silvestre los niveles de transcrito del gen *trxA* no se modificaban tras la adición de cobre al medio de cultivo, indicando que la expresión de este gen en la estirpe silvestre era independiente de la presencia de cobre en el medio. Estos resultados apuntaban a que en el mutante STXA1 la expresión del gen *trxA* desde el promotor del gen *petJ* no estaba siendo regulada por la presencia de cobre.

Con objeto de examinar, si la expresión de los genes *petJ* y *petE*, sufrían también algún tipo de alteración en el mutante STXA1, procedimos a realizar una nueva hibridación de las muestras de RNA aisladas, primero con una sonda que comprendía la región codificante del gen *petJ* y posteriormente con una sonda del gen *petE*, en la Fig. 28B y C, se observa primeramente que en la estirpe silvestre los niveles de mRNA del gen *petJ* descendían drásticamente tras la adición de CuSO₄ al medio de cultivo y éstos se mantenían bajos durante las 4 h que duraba el experimento. Sin embargo en la estirpe STXA1, la expresión del gen *petJ* estaba alterada de una manera similar a como ocurría con el gen *trxA*, con un descenso inicial en los niveles de transcrito equivalente al presentado por la estirpe silvestre y que se mantenía al menos durante las dos primeras horas. Pero posteriormente los niveles de transcrito se incrementaban, alcanzando a las 4 h, niveles similares a los iniciales, indicando que no sólo estaba afectada la represión por cobre del gen *trxA*, sino que también la expresión del gen *petJ* estaba desregulada. Por otra parte, el comportamiento del gen *petE* en la estirpe STXA1 era aun más sorprendente, ya que en ausencia de cobre los niveles iniciales de mRNA de este gen eran casi indetectables, tal como ocurría en la estirpe silvestre, pero cuando se añadía el CuSO₄, éstos apenas ascendían ni siquiera durante las dos primeras horas tras la adición de cobre. Estos resultados demostraban claramente que la estirpe STXA1 había perdido la regulación por cobre de los promotores de los genes *petE* y *petJ*, y hacían pensar en un posible papel regulador de la tiorredoxina TrxA en la expresión de estos genes; ya que en ausencia de cobre, cuando el gen *trxA* se estaba expresando, los niveles de transcrito de los genes *petE* y *petJ* eran similares a los de la de la estirpe silvestre, pero cuando se añadía cobre al medio de cultivo, los niveles de transcrito del gen *trxA* descendían inicialmente y se mantenían bajos al menos durante 2 h, pero transcurrido este tiempo se perdía la regulación y volvían a ascender a niveles similares a los iniciales, siendo la respuesta del gen *petJ* paralela a la del gen *trxA*. Este comportamiento alterado de la respuesta del promotor del gen *petJ* a la presencia de cobre en el medio de cultivo sugería que

podían ser los bajos niveles de la tiorredoxina TrxA los que estuviesen afectando por un lado a la represión del promotor del gen *petJ* y por otro a la activación del gen *petE*.

Si esta hipótesis era válida, podría ocurrir que una vez que la estirpe STXA1 hubiese alcanzado niveles de transcrito del gen *trxA* similares a los iniciales, podría recuperar la regulación por cobre de estos promotores, observándose entonces una regulación cíclica de los niveles de transcrito de estos genes dependiente de los niveles del gen *trxA*. Para comprobar si esto estaba realmente ocurriendo, se recogieron muestras a tiempos: 0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 10 y 12 horas de un cultivo de la estirpe STXA1 tras la adición de CuSO_4 5 μM , para el posterior aislamiento de RNA e hibridación mediante *northern blot* con la sonda del gen *trxA*. En la Fig. 29, podemos observar que los niveles de mRNA del gen *trxA*, no solo no volvían a descender una vez que se alcanzaban los niveles iniciales, sino que estos incluso alcanzaban niveles mayores, descartando en principio una regulación cíclica del promotor del gen *petJ* dependiente de los niveles de expresión del gen *trxA*.

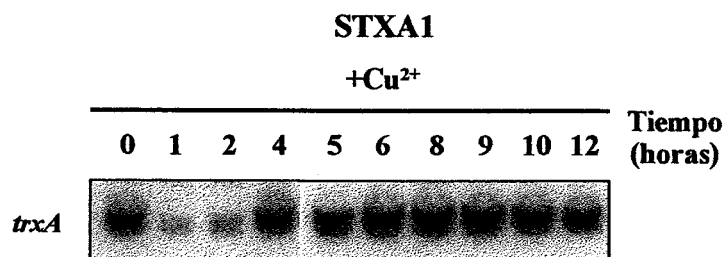


Figura 29. Efecto de la adición de CuSO_4 5 μM en los niveles de mRNA del gen *trxA* en la estirpe STXA1

Se recogieron muestras a tiempos: 0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9 10 y 12 horas, tras la adición de CuSO_4 5 μM a un cultivo de la estirpe STXA1 creciendo en medio BG11-Cu²⁺, para el posterior aislamiento de RNA total e hibridación mediante *northern blot* con la sonda del gen *trxA*.

Con objeto de poder descartar que la desregulación estuviera solamente ocurriendo en la estirpe STXA1, provocada por alguna otra mutación que no estuviésemos detectando, procedimos a realizar una nueva transformación de la estirpe silvestre con la construcción pTXA5, obteniéndose de nuevo colonias mutantes que también segregaban completamente la mutación. Con uno de estos transformantes, denominado STXA1.2 se llevó a cabo el mismo experimento de adición de CuSO_4 y recogida de muestras a tiempos: 0, 1, 2 y 4 horas. Esta vez los RNAs extraídos se hibridaron además de con las sondas de los genes *trxA*, *petJ* y *petE*, con una sonda que comprendía la secuencia del operón *mssA* de *Synechocystis* 6803, que codifica un putativo transportador de cobre del tipo “de dos componentes” (López-Maury, comunicación personal), en la Fig. 30, podemos observar que la nueva estirpe mutante STXA1.2, presentaba desregulada de la misma manera que la estirpe

STXA1, la respuesta a cobre de los genes *trxA*, *petJ* y *petE*, sugiriendo que la desregulación de la expresión de estos genes debería estar provocada por la sustitución del promotor del gen *trxA*.

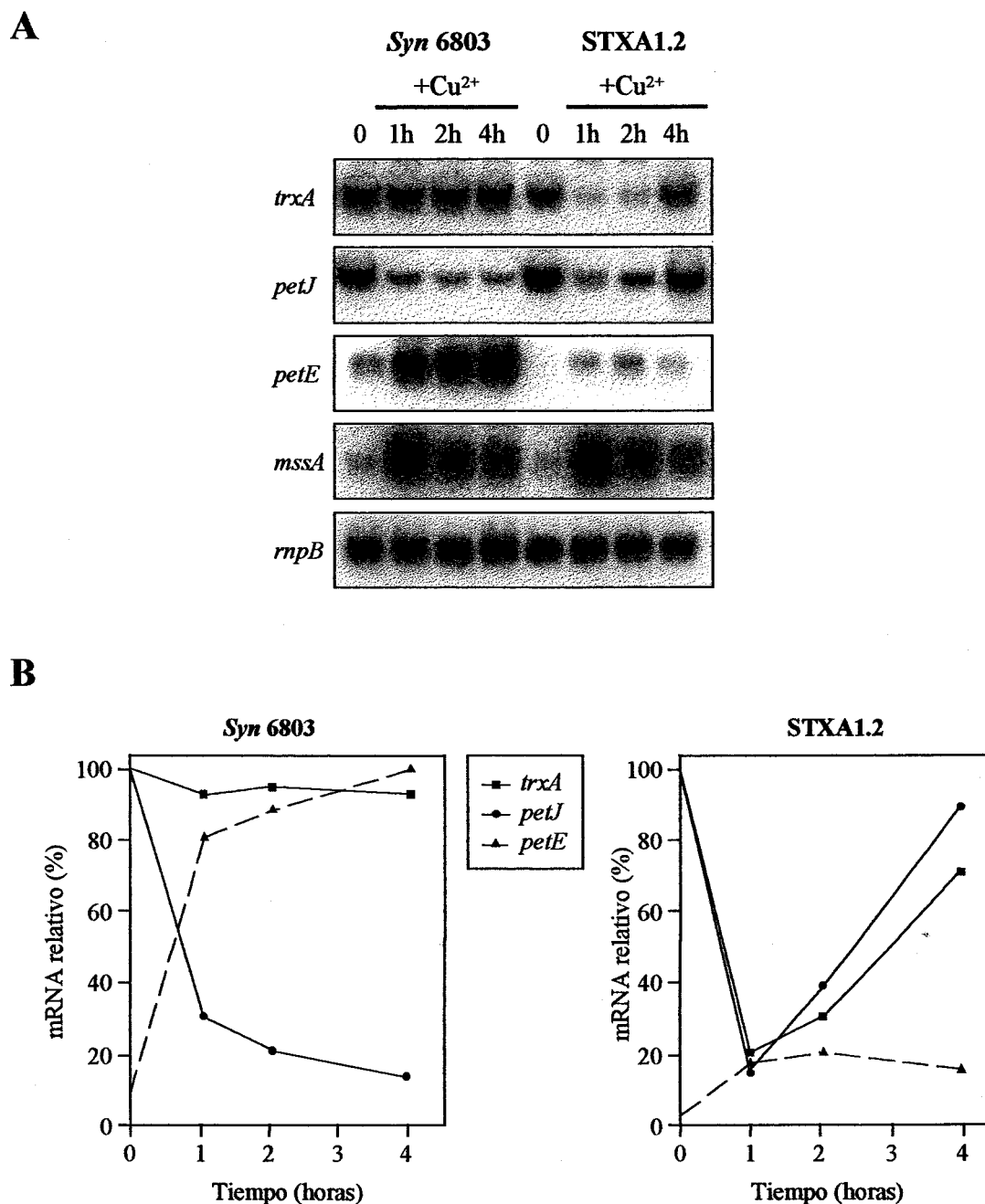


Figura 30. Niveles de transcrito de los genes *trxA*, *petJ* y *petE* y del operón *mssA* en las estirpes silvestre y STXA1.2 tras la adición de CuSO₄ 5μM

A. Muestras de células obtenidas de las estirpes silvestre y STXA1.2 tras la adición de CuSO₄ 5μM a tiempos: 0, 1, 2 y 4 horas se hibridaron con las sondas de los genes *trxA*, *petJ*, *petE* y del operón *mssA*

B. Niveles relativos de mRNA expresados como % del nivel obtenido a tiempo = 0. Se utilizó la hibridación con la sonda del gen *rnpB* como control de carga de los filtros.

También observábamos que la respuesta del operón *mssA* a la presencia de cobre era la misma en ambas estirpes, lo que descartaba una desregulación general en la estirpe STXA1.2 de la expresión de todos los genes que se regulan por la presencia de cobre en *Synechocystis* 6803.

Con objeto de discernir si era la duplicación del promotor del gen *petJ*, o la sustitución del promotor del gen *trxA* por éste, lo que provocaba la desregulación de los promotores, se realizó el mismo experimento anterior, utilizando una estirpe de *Synechocystis* en la que se había sustituido el promotor del gen *glnB* por el del gen *petJ*, (concesión de García-Domínguez), el gen *glnB* codifica la proteína PII de *Synechocystis* 6803 (García-Domínguez *et al.*, 1998). Esta estirpe presentaba una regulación de la expresión de los genes *petJ* y *petE* en presencia de cobre, exactamente igual que la estirpe silvestre, además la expresión del gen *glnB*, desde el promotor del gen *petJ*, era reprimida completamente a las dos horas de la adición del cobre, demostrando que la duplicación del promotor del gen *petJ* no debía de ser el motivo de la desregulación observada en las estirpes STXA1 y STXA1.2.

Con el propósito de comprobar si existían diferencias en los niveles de la proteína TrxA, entre las estirpes silvestre y STXA1.2 y si en esta última estirpe existían diferencias tras la adición de cobre, se llevó a cabo un experimento de *western blot*, utilizando anticuerpos policlonales obtenidos contra la proteína TrxA de *Synechocystis* 6803 (apartado 2.3.12.1), en extractos crudos de ambas estirpes cultivadas en ausencia de cobre o tras un periodo de incubación de 36 h en presencia de CuSO₄, 5 µM. En la Fig. 31 se puede observar el resultado de la inmunodetección.

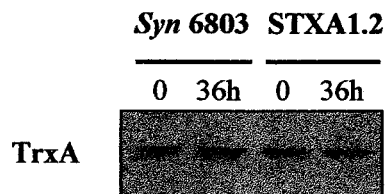


Figura 31. Inmunodetección de la proteína TrxA en extractos crudos de las estirpes silvestre y STXA1.2 de *Synechocystis* 6803

Muestras de células de ambas estirpes creciendo en ausencia de cobre (0) o tras 36 h (36h) de cultivo en presencia CuSO₄, 5 µM se sometieron a inmunodetección mediante *western blot*, utilizando anticuerpos contra la proteína TrxA. Se cargaron cantidades de proteína correspondientes a 0.5 unidades de D.O. a 750 nm, en cada carril.

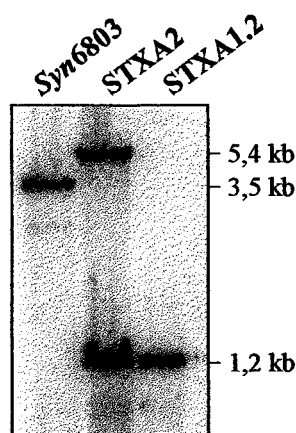
Como se observa en la figura, los niveles de tiorredoxina detectados con los anticuerpos no eran muy dispares entre ambas estirpes, aunque si se observa un cierto descenso de los niveles en la estirpe STXA1.2 tras 36 h de incubación en presencia de cobre. Estos resultados parecen indicar que la expresión de la proteína TrxA en la estirpe mutante es inferior en presencia de cobre que en ausencia de éste.

Para intentar aclarar si eran los niveles de transcripción del gen *trxA* desde el promotor del gen *petJ*, lo que estaba provocando la desregulación del sistema citocromo *c₂*/plastocianina. Se generó una nueva estirpe derivada de STXA1.2, la cual contenía insertada una copia del gen *trxA* bajo el control de su propio promotor en el *locus* del gen *glnN*. El gen *glnN* codifica la glutamina sintetasa tipo III en *Synechocystis* 6803, siendo la inactivación de este gen completamente segregable en el genomio de *Synechocystis* (Reyes y Florencio, 1994).

Para ello clonamos en la diana única *EcoRI* del plásmido pFNT4 (Tabla 4) la casete C.C1, que confiere resistencia a cloramfenicol (Elhai y Wolk, 1988), obteniéndose el plásmido pTXA6 (Tabla 6). Una digestión de este plásmido con las enzimas de restricción *EcoRV* y *XhoI* nos permitía aislar el fragmento de DNA que contenía al gen *trxA* junto con su región promotora y con la casete C.C1. Este fragmento se clono tras rellenar sus extremos cohesivos, haciéndolos romos, con polimerasa de Klenow, en los sitios *EcoRI* (también hechos romo) del vector pGS2.4, que contiene el gen *glnN* de *Synechocystis* (García-Domínguez *et al.*, 1996). Esta nueva construcción se denominó pTXA7 (Tabla 6) y se utilizó para transformar la estirpe STXA1.2. La aparición de colonias transformantes resistentes a los antibióticos cloramfenicol y kanamicina indicaba que éstas deberían haber incluido la construcción en su genomio. Este último término se confirmó con una nueva hibridación mediante *Southern blot* de los DNA genómicos de las estirpes: silvestre, STXA1.2 y de la nueva estirpe denominada STXA2, digeridos con la enzima *BstXI*. En la Fig. 31 observamos que en la estirpe STXA2, aparece además de la banda correspondiente al gen *trxA* bajo el promotor del gen *petJ*, una nueva banda de aproximadamente 5,4 kb que se corresponde con el tamaño esperado de la nueva construcción, lo que indicaba que la recombinación del fragmento había tenido lugar como esperábamos. En esta figura también se muestra un esquema de la región cromosómica del gen *glnN*, así como de la nueva construcción, representado los sitios de restricción de distintas enzimas utilizadas.

El siguiente objetivo fue comprobar mediante *northern blot*, inicialmente la expresión del gen *trxA* en presencia o ausencia de cobre y posteriormente si se recuperaba la regulación de la expresión de los genes *petJ* y *petE*. En la Fig. 33, podemos observar que en la estirpe STXA2, presentaba niveles de expresión del gen *trxA* similares a los de la estirpe silvestre y éstos se mantenían altos tras la adición de CuSO_4 5 μM , aunque se observaba una cierta disminución de los niveles de mRNA durante las dos primeras horas de incubación, recuperándose posteriormente a las 4 horas, volviendo a presentar niveles similares a los iniciales. Esta oscilación de los niveles podía estar provocada por la disminución de la transcripción del gen *trxA* desde el promotor del gen *petJ*, aunque la posterior recuperación de los niveles indicaba que la expresión desde este promotor podría seguir desregulada.

A



B

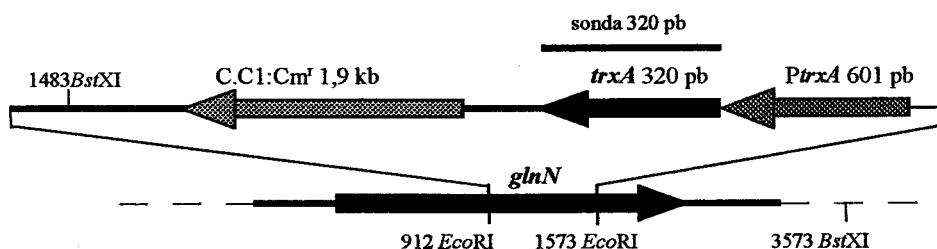


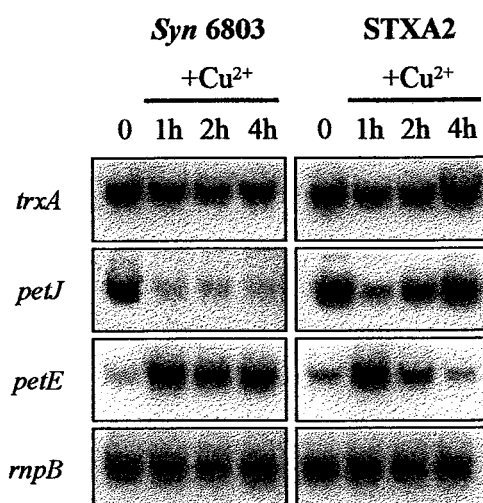
Figura 32. Hibridación mediante Southern blot de los DNA genómicos de estirpes silvestre, STXA1.2 y STXA2 de *Synechocystis* 6803, con la sonda del gen *trxA*

A. Los DNA genómicos de las estirpes silvestre (*Syn6803*), STXA1.2 y STXA2 fueron digeridos con la enzima de restricción *BstXI* y se hibridaron utilizando como sonda la secuencia completa del gen *trxA*. La banda 3,5 kb se corresponde con las copias silvestres, la de 1,2 kb con la sustitución del promotor silvestre por el del gen *petJ*, y la de 5,4 kb con la inserción del gen *trxA* en el locus del gen *glnN*.

B. Esquema de la región cromosómica del gen *glnN* y de la construcción insertada en este gen.

La posterior hibridación de estas muestras con las sondas de los genes *petJ* y *petE* confirmaba que aunque los niveles de transcrito del gen *trxA* en la estirpe STXA2 eran relativamente constantes y similares a los niveles presentados por la estirpe silvestre, la expresión desde los promotores del gen *petJ* seguía desregulada de la misma manera que en las estirpes STXA1 y STXA1.2, indicando que no eran los niveles de transcrito del gen *trxA* lo que estaba desregulando directamente la expresión desde este promotor. Por otra parte, también observábamos que en esta nueva estirpe mutante, los niveles de transcrito del gen *petE*, tras la adición de CuSO_4 , alcanzaban valores similares a los de la estirpe silvestre, siendo estos más altos en esta estirpe mutante que en las precedentes, aun así, estos volvían a descender a niveles similares a los iniciales trascurridas 4 h de adición de CuSO_4 , indicando que la expresión del gen *petE* en esta estirpe también seguía desregulada.

A



B

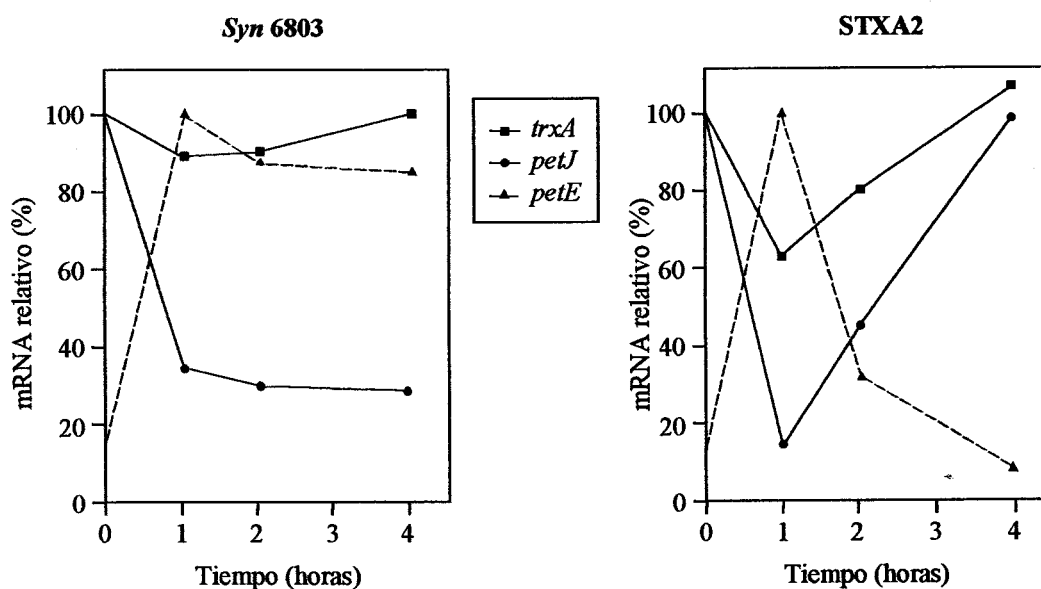


Figura 33. Efecto de la adición de CuSO₄ 5 μM sobre los niveles de mRNA de los genes *trxA*, *petJ* y *petE* en las estirpes silvestre y *STXA2*

A. A cultivos de las estirpes silvestre y *STXA2* creciendo en medio BG11-Cu²⁺, se les añadió CuSO₄ 5 μM y se recogieron muestras a tiempos: 0, 1, 2 y 4 horas para el posterior aislamiento de RNA total e hibridación con las sondas de los genes *trxA*, *petJ* y *petE*.

B. Niveles relativos de mRNA expresados como % del nivel obtenido a tiempo = 0, utilizando la hibridación con la sonda del gen *rnpB* como control de carga de los filtros.

Los estudios sobre la expresión de los genes *trxA*, *petJ* y *petE* llevados a cabo en la estirpe mutante *STXA2*, que presentaba niveles de expresión del gen *trxA* similares a la estirpe silvestre tanto en ausencia como en presencia de cobre en el medio de cultivo, indicaban que no debían ser

directamente los niveles del gen *trxA* lo que estaba regulando la expresión de los genes *petJ* y *petE*. Aunque estos resultados no excluyen completamente la posibilidad de que fueran los bajos niveles de expresión del gen *trxA* en las estirpes STXA1 y STXA1.2 lo que provocase la desregulación de la expresión de los genes *petJ* y *petE*, originado por una mutación compensatoria encaminada a mantener altos los niveles de expresión del gen *trxA* en todas las condiciones de cultivo, incluida la condiciones de ausencia de cobre, ya que en esta condición los niveles de mRNA del gen *trxA* eran inferiores a los de la estirpe silvestre.

4. DISCUSIÓN

4.1. La glutamato sintasa de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120

El conocimiento que se tenía, al iniciar el presente trabajo, sobre las glutamato sintasa de cianobacterias era más amplio desde el punto de vista bioquímico, que desde el punto de vista genético y fisiológico. Esto unido al hecho de que los datos que se poseían sobre la presencia de esta enzima en el heterocisto eran contradictorios, hacía interesante tanto la búsqueda del gen o de los genes que codificasen esta enzima en una cianobacteria formadora de heterocistos, como la caracterización de la actividad GOGAT en dicha cianobacteria. Con este objetivo escogimos como modelo para nuestro trabajo a la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120.

4.1.1. Clonación y caracterización del gen *glsF* de *Anabaena* 7120

El gen *glsF* de *Anabaena* 7120, se clonó mediante hibridación en colonias de una genoteca de DNA total de dicha cianobacteria, utilizando como sonda un fragmento de 1,2 kb obtenido por PCR utilizando como cebadores los oligonucleótidos pfn1 y pfn2 (Navarro *et al.*, 1995). Estos eran oligonucleótidos degenerados basados en regiones conservadas de las secuencias de la Fd-GOGAT de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991) y de la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de *E. coli* (Oliver *et al.*, 1987). Estos mismos oligonucleótidos habían sido utilizados en la amplificación de fragmentos internos de los genes *glsF* y *gltB* de *Synechocystis* 6803 (Navarro *et al.*, 1995) que codifican respectivamente la Fd-GOGAT y la subunidad grande de la NADH-GOGAT (Navarro *et al.*, 1995) de esta cianobacteria. Posteriormente con idénticos oligonucleótidos, se han obtenido fragmentos internos de los genes *glsF* y *gltB* de la cianobacteria *Plectonema boryanum* (Okuhara *et al.*, 1999).

La obtención en *Anabaena* 7120 de una banda única en la amplificación por PCR con los oligonucleótidos pfn1 y pfn2, sugería la existencia de un sólo gen para glutamato sintasas en esta cianobacteria. La posterior hibridación mediante *Southern blot* con este fragmento, del DNA total de *Anabaena* digerido con distintas enzimas de restricción (Fig. 2), mostraba que dicho fragmento hibridaba con un sólo gen que codificara glutamato sintasas, sugiriendo que *Anabaena* 7120 presentaba una sola glutamato sintasa y no dos como ocurría en el caso de las cianobacterias *Synechocystis* 6803 y *Plectonema boryanum* (Navarro *et al.*, 1995; Okuhara *et al.*, 1999). En la cianobacteria *Synechococcus* 6301, también se había localizado una sola enzima con actividad GOGAT, siendo esta dependiente de ferredoxina (Marqués *et al.*, 1992).

La secuenciación y posterior comparación de la secuencia deducida de aminoácidos del único clon obtenido en la hibridación en colonias de una genoteca de *Anabaena* 7120, indicaban que el DNA clonado se correspondía con un fragmento interno del gen *glsF* que codifica la Fd-GOGAT de *Anabaena* 7120. Este clon no contenía el gen *glsF* completo, por lo que se recurrió a una nueva hibridación en colonias de otra genoteca de *Anabaena* 7120, para la obtención de la secuencia completa (4647 pb) del gen *glsF*.

La reciente secuenciación del genomio completo de *Anabaena* 7120, ha demostrado definitivamente que el gen *glsF* es el único que codifica glutamato sintasas en esta cianobacteria.

4.1.2. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína GlsF de *Anabaena* 7120

La secuencia deducida de aminoácidos del gen *glsF* revela una proteína de 1649 residuos, con una masa molecular calculada a partir de la secuencia de aminoácidos de 170 kDa (Fig. 3). Como se ha comentado, la comparación de la secuencia de la glutamato sintasa de *Anabaena* 7120 con las de otras GOGATs disponibles en las bases de datos, mostraba que esta proteína presentaba la mayor identidad con las Fd-GOGATs, siendo de aproximadamente un 70% con las Fd-GOGATs de las cianobacterias *Plectonema boryanum* y *Synechocystis* 6803, y de un 60% con las Fd-GOGATs de plantas (Fig. 4A). Es interesante indicar que la identidad basal encontrada entre todas las glutamato sintasas es del orden del 45%. Esta identidad basal era la mostrada entre la GOGAT de *Anabaena* y las NADH-GOGATs de cianobacterias y plantas, así como también con la subunidad grande de la NADPH-GOGAT de *E. coli*. Estos resultados claramente indican que el gen *glsF* codifica una glutamato sintasa dependiente de ferredoxina.

Por otra parte, el análisis de la secuencia de la proteína GlsF de *Anabaena* 7120 mostraba la existencia de dominios funcionales conservados en todas las glutamato sintasas (Fig. 4B-D) (Vanoni, y Curti, 1999). El dominio glutamina amido transferasa, comprendía los residuos 29-87, muy similares a la misma región de otras GOGATs y similar al dominio glutamina amido transferasa de las glutamina amido transferasas tipo *pur-F* (Mei y Zalkin, 1989; 1990; Pelanda *et al.*, 1993). Este dominio contiene la Cys-35 implicada en la liberación del grupo amida de la glutamina durante la catálisis. Esta cisteína parece ser también un sitio específico de maduración reconocido por una proteasa, como ocurre en la subunidad α de la NADPH-GOGAT de bacterias (Oliver *et al.*, 1987), en la Fd-GOGAT de maíz (Sakakibara *et al.*, 1991), en la NADH-GOGAT de *S. cerevisiae* (Cogoni *et al.*, 1995) y en la Fd-GOGAT de *Synechocystis* (Navarro *et al.*, 2000).

En la región carboxi-terminal aparece el dominio de unión del cofactor FMN, el cual es el único cofactor flavínico presente en las Fd-GOGATs de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*,

1992), de *Synechocystis* 6803 (Navarro *et al.*, 2000) y de espinaca (Hirasawa *et al.*, 1996). Esta región comprende los residuos 1043-1163, y está fuertemente conservada en todas las GOGATs. Esta región presenta además los residuos Asp-1137 y Lys-1141, los cuales probablemente interactúan con la cadena ribitol del FMN (Chapman *et al.*, 1991).

Por último, la región implicada en el acomodamiento del centro [3Fe-4S] también está muy conservada. Este dominio comprende a las cisteínas, Cys-1169, Cys-1174 y Cys-1179 que se alinean con cisteínas similares de otras GOGATs (Knaff *et al.*, 1991) y definen el motivo CX₅CX₄C (Fig. 4D) el cual ha sido también descrito en las enzimas fumarato reductasa de *E. coli* y succinato deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*, las cuales, presentan también un centro [3Fe-4S] (Johnson *et al.*, 1988; Manodori *et al.*, 1992).

4.1.3. Caracterización de la actividad Fd-GOGAT en *Anabaena* 7120

Como la fuente de nitrógeno disponible ejerce una fuerte regulación sobre algunas de las enzimas implicadas directamente en el metabolismo de este nutriente en cianobacterias, como es el caso de la glutamina sintetasa (GS) o de la isocitrato deshidrogenasa (IDH) (Reyes y Florencio, 1994; Muro-Pastor *et al.*, 1996; Flores y Herrero, 1994), y aunque la glutamato sintasa no parece estar regulada por este factor en *Synechocystis* 6803 (Navarro, 1996), si bien, sí se ha observado un aumento de la actividad de esta enzima en *Synechococcus* 6301 en respuesta a la carencia de fuente de nitrógeno (Marqués, 1988), resultaba interesante, en primer lugar, comprobar si la actividad Fd-GOGAT en la cianobacteria *Anabaena* 7120 estaba regulada por la fuente de nitrógeno.

Las medidas de actividad Fd-GOGAT realizadas en extractos crudos de células *Anabaena* cultivadas con nitrato, amonio o en condiciones de fijación de dinitrógeno, mostraron siempre valores similares en las diferentes condiciones de cultivo utilizadas (Tabla 9). Sin embargo, las actividades GS e IDH mostraban en estos mismos extractos, valores altos en la condición de fijación y los mínimos en presencia de amonio. Estos resultados indicaban claramente que la actividad Fd-GOGAT, a diferencia de las actividades GS e IDH, no está regulada por la fuente de nitrógeno disponible en *Anabaena* 7120, ya que ésta se mantiene constante independientemente de la fuente de nitrógeno inorgánico que se utilice, e incluso en condiciones de fijación de nitrógeno.

4.1.4. Análisis de la presencia de Fd-GOGAT en heterocistos de *Anabaena* 7120

Como se ha comentado en la Introducción, al comenzar este trabajo, las hipótesis sobre la presencia o no de GOGAT en el heterocisto eran contradictorias (Wolk *et al.*, 1994). En este caso,

una vez clonado el gen, y al disponer de anticuerpos obtenidos contra la Fd-GOGAT de *Synechocystis* (Navarro *et al.*, 2000), podíamos abordar esta cuestión con distintas estrategias.

En primer lugar procedimos a realizar medidas de actividad Fd-GOGAT en extractos crudos de heterocistos aislados. En ningún momento se consiguió detectar actividad Fd-GOGAT en los extractos crudos de heterocistos, mientras que sí se detectaban elevados niveles de actividad GS e IDH (Tabla 9). Estos primeros resultados apuntaban claramente hacia la ausencia de Fd-GOGAT en el heterocisto.

La siguiente aproximación que se llevó a cabo, fue la inmunodetección de la proteína GlsF en extractos crudos de células vegetativas y de heterocistos aislados. El resultado obtenido (Fig.5), confirmaba que en las preparaciones de heterocistos no existía ninguna proteína que diera reacción cruzada con los anticuerpos contra la Fd-GOGAT de *Synechocystis*, mientras que en las preparaciones de células vegetativas, sí aparecía una banda que se debería corresponder con la Fd-GOGAT. Los niveles de ésta se mantenían constantes independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada, lo que corroboraba los resultados obtenidos por las medidas de actividad. La utilización de anticuerpos obtenidos contra la GS de *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992) y contra la IDH de *Synechocystis* 6803 (Muro-Pastor *et al.*, 1992), demostraban que estas enzimas estaban presentes en el heterocisto de manera más abundante que en las células vegetativas.

Por último, con objeto de detectar si el gen *glsF* se expresaba en el heterocisto y si este sufría algún tipo de regulación en las células vegetativas en respuesta a la fuente de nitrógeno, se realizaron experimentos de *northern blot*, utilizando como sonda un fragmento de DNA de la región 5' del gen *glsF*. El resultado obtenido (Fig. 6) mostraba que el gen *glsF* no se expresaba en el heterocisto y que los niveles del transcrito del gen *glsF* se mantienen casi constantes en las células vegetativas, indicando que la expresión del gen *glsF* no está regulada por la fuente de nitrógeno.

Todos estos resultados claramente demuestran que la enzima glutamato sintasa no se encuentra presente en los heterocistos de *Anabaena* 7120.

Teniendo en cuenta que las enzimas GS e IDH están presentes en el heterocisto (Fig. 5), (Wolk *et al.*, 1994; Böhme, 1998), el modelo para el metabolismo del nitrógeno que proponemos en estas células sería el siguiente: 1) la nitrogenasa reduce el dinitrógeno hasta amonio, el cual se incorpora al glutamato mediante la acción de la GS para producir glutamina; 2) la NADP-IDH, produciría en estas células 2-oxoglutarato y NADPH. Este último compuesto, se utilizaría como donador de electrones para reducir a la ferredoxina específica del heterocisto (FdxH) a través de la (FNR) mediante un transporte inverso de electrones, por otra parte el 2-oxoglutarato se exportaría a las células vegetativas; 3) el glutamato, al no poder ser producido en el heterocisto, por la ausencia de la GOGAT, tendría que ser importado desde las células vegetativas; 4) la glutamina que se produciría

en grandes cantidades en el heterocisto podría ser exportada a las células vegetativas, o bien convertida en arginina, ya que las enzimas requeridas para la biosíntesis de arginina están presentes en el heterocisto (Wolk et al., 1994). La arginina junto con el aspartato, podrían ser utilizadas para síntesis de cianoficina, un polímero compuesto de aspartato y arginina que sirve como fuente de nitrógeno. En este modelo, sería razonable la hipótesis de que el 2-oxoglutarato fuera intercambiado por glutamato entre el heterocisto y las células vegetativas.

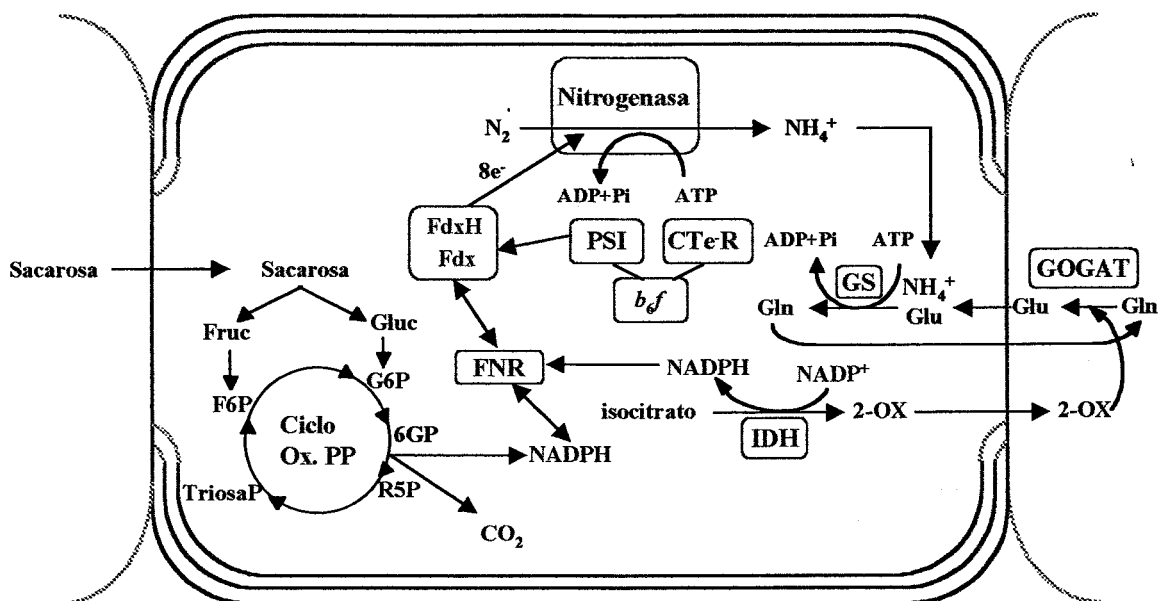


Figura 34. Esquema de las rutas metabólicas propuestas para los metabolismos del carbono y del nitrógeno en el heterocisto

En oscuridad, el poder reductor necesario para la reducción del N_2 , se generaría principalmente en forma de NADPH, mediante el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato o por la acción de la isocitrato deshidrogenasa. El NADPH reduciría a la ferredoxina (FdxH) a través de la FNR y la ferredoxina reduciría a su vez a la nitrogenasa. El ATP necesario se originaría mediante respiración. En la luz, el ATP se generaría en el PSI mediante el flujo cíclico de electrones. El glutamato tendría que ser importado desde las células vegetativas, y la glutamina y el 2-oxoglutarato serían exportados a las células adyacentes.

Abreviaturas utilizadas: *b_{6f}*, complejo citocromo *b_{6f}*; CTeR, cadena de transporte de electrones respiratoria; Ciclo Ox. PP, ciclo oxidativo de las pentosas fosfato; e^- , electrones; Fdx, ferredoxina; FdxH, ferredoxina específica del heterocisto; FNR, ferredoxina: NADP⁺ oxidoreductasa; Fruc, fructosa; F6P, fructosa-6-fosfato; 6PG, 6-fosfogluconato; Gluc, glucosa; G6P, glucosa-6-fosfato; Glu, glutamato; Gln, glutamina; GOGAT, glutamato sintasa; GS, glutamina sintetasa; IDH, isocitrato deshidrogenasa; 2-OX, 2-oxoglutarato; Pi, fosfato inorgánico, PSI, fotosistema I; R5P, ribulosa-5- fosfato; TriosaP, triosa fosfato.

4.2. Las tiorredoxinas de la cianobacteria *Synechocystis* sp PCC 6803

Como se ha comentado con anterioridad, el inicio de este trabajo coincidía con la secuenciación del genomio completo de la cianobacteria *Synechocystis* sp PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996). La aparición en la secuencia de este genomio de tres ORFs (*slr0233*, *slr1139* y *sll1057*), cuyos productos presentaban homología con tiorredoxinas, aparte del gen *trxA* previamente descrito en nuestro grupo (Navarro y Florencio, 1996), ofrecía la posibilidad de realizar un estudio global tanto del papel de estas proteínas en cianobacterias, como del patrón de expresión de estos genes en respuesta a diversos factores ambientales, ya que en organismos fotosintéticos, no se disponía de mucha información en ninguno de los dos aspectos. Con objeto de obtener una visión general de la respuesta del sistema ferredoxina/tiorredoxina, también llevamos a cabo estudios de la regulación de la expresión de los genes *ftnC* y *ftnV* que codifican respectivamente la subunidad catalítica y variable de la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR) en *Synechocystis* 6803.

4.2.1. Existencia de distintos genes que codifican tiorredoxinas en *Synechocystis* sp. PCC 6803

Aunque en eucariotas fotosintéticos se ha descrito la existencia de numerosas tiorredoxinas; (Mouahed *et al.*, 1998; Häberlein 1991; Konrad *et al.*, 1996; Jacquot *et al.*, 1997), clasificándose éstas dentro de tres tipos diferenciados (-*m*, -*f* y -*h*), y presentando las tiorredoxinas tipo-*m* y -*f* localización cloroplástica. En cianobacterias, consideradas como el ancestro del cloroplasto, solamente se habían descritos tiorredoxinas tipo-*m* (Muller y Buchanan, 1989; Gleason, 1994; Navarro y Florencio, 1996) y únicamente se habían clonado dos genes distintos para tiorredoxinas en la cianobacteria *Anabaena* 7120 (Lim *et al.*, 1986; Alam *et al.*, 1989; Gleason, 1982). En *Synechocystis* 6803, con anterioridad a la secuenciación completa del genomio (Kaneko *et al.*, 1996), se había clonado y secuenciado el gen *trxA* (Navarro y Florencio, 1996), que codifica una tiorredoxina cuya secuencia presenta identidades del 86% con la correspondiente proteína TrxA de *Anabaena* y del 82% con la tiorredoxina descrita en *A. nidulans* (Fig. 7), e identidades también altas, entre el 57-70% con las tiorredoxinas tipo-*m* de algas y plantas (Navarro y Florencio, 1996). Sin embargo, las tres ORFs citadas anteriormente (*slr0233*, *slr1139* y *sll1057*), denominadas: *trxQ*, *trxB* y *trxC* respectivamente, codificaban productos cuyas identidades con las tiorredoxinas tipo-*m*, tanto de cianobacterias como de algas y plantas eran bastante más bajas (alrededor del 40%) (Fig. 7), aunque estos valores de identidad con las tiorredoxinas tipo-*m* variaban de unas proteínas a otras, cabe destacar que siempre la identidad con las tiorredoxinas-*m* era mayor que con las tipo-*f* o -*h*, presentando estas tiorredoxinas las identidades más altas con las tiorredoxinas procariotas (Fig. 7). La proteína *trxB* de *Synechocystis* 6803 presenta una identidad del 59% con la segunda

tiorredoxina localizada en *Anabaena* 7120. La reciente secuenciación del genomio de esta cianobacteria (<http://www.kazusa.or.jp/anabaena>), muestra la existencia de tres ORFs adicionales que codificarían tiorredoxinas. Dos de las cuales presentan una identidad alta, 56 y 68 % respectivamente, con las proteínas TrxC y TrxQ de *Synechocystis* 6803, y una tercera que muestra una identidad del 70% con la proteína TrxA de *Synechocystis* y del 75% con la proteína TrxA de *Anabaena*. Demostrando que las tiorredoxinas halladas en *Synechocystis* 6803 se encuentran también en *Anabaena* 7120. En la Fig.35 se muestra un árbol filogenético en el que se representan las relaciones de identidad entre distintos grupos de tiorredoxinas. Las tres nuevas tiorredoxinas identificadas en el genomio de *Anabaena* 7120 se han denominado en el árbol filogenético como TrxC, TrxQ y TrxA2.

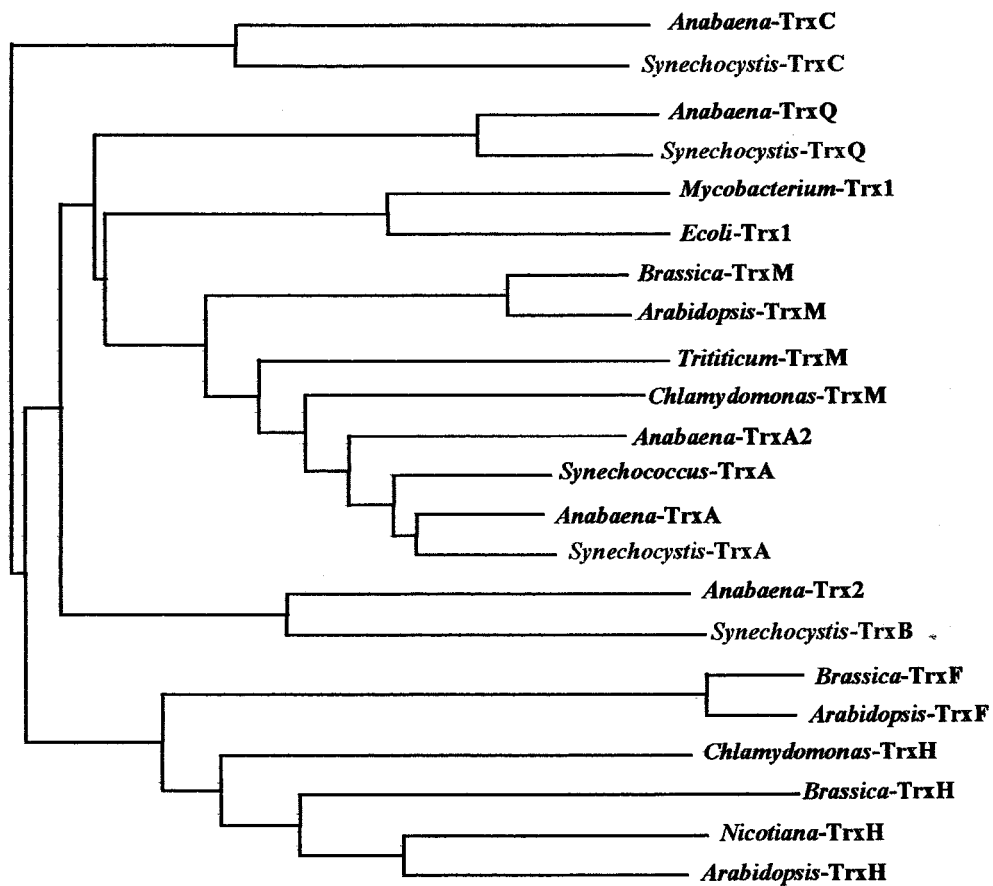


Figura 35. Dendrograma representativo de las relaciones de identidad entre diferentes secuencias de tiorredoxinas

El árbol filogenético es derivado del alineamiento de secuencias realizado con el programa Clustal X. Las secuencias de las diferentes tiorredoxinas se obtuvieron de las bases de datos del EMBL-GeneBank y del genomio de *Anabaena* sp. PCC 7120 (<http://www.kazusa.or.jp/anabaena>), y corresponden a los siguientes organismos: *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Triticum aestivum*, *Nicotiana tabacum*, *Escherichia coli* y *Mycobacterium tuberculosis*. Las proteínas de *Synechocystis* se muestran en rojo.

Como se puede observar en la figura, las tiorredoxinas TrxB, TrxC y TrxQ de *Synechocystis* 6803, aunque divergen significativamente en sus secuencias, se agrupan dentro de las tiorredoxinas tipo-*m*, apoyando aun más el origen procariota de este tipo de tiorredoxinas (Hartman *et al.*, 1990), siendo la proteína TrxC, la que parece estar más alejada del resto.

La presencia en cianobacterias de varias tiorredoxinas con secuencias relativamente divergentes, sugiere la existencia de papeles fisiológicos específicos para cada una de ellas.

4.2.2. Análisis de la expresión de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV* de *Synechocystis* 6803

4.2.2.1. Regulación a nivel transcripcional de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV*, en respuesta a los cambios luz-oscuridad.

Como primer paso en la caracterización del papel fisiológico de las diferentes tiorredoxinas de *Synechocystis* 6803, procedimos a analizar mediante *northern blot* la expresión de estos genes en respuesta a diversos factores ambientales, principalmente relacionados con la luz, ya que ésta ejerce como el principal factor regulador de la expresión de numerosos genes en organismos fotosintéticos (Mayfield *et al.*, 1995; Tandeau de Marsac y Houmard, 1993). De forma adicional, también se analizó la expresión de los genes *ftrC* y *ftrV*, que codifican las subunidades catalítica y variable de la ferredoxina:tiorredoxina reductasa (FTR) de *Synechocystis* (Kaneko *et al.*, 1996).

Como se observa en la Fig. 8 (3.2.2.1), todos estos genes se detectan como un transcrito único cuando las células se cultivan en condiciones de iluminación. Sin embargo, con la excepción del gen *trxQ*, la expresión de éstos se hacía casi indetectable tras incubar los cultivos durante 12 h en oscuridad, lo cual indicaba que la luz ejercía un efecto de inducción en la transcripción de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *ftrC*, y *ftrV*. Aunque por otra parte, la adición de glucosa al medio de cultivo inhibía en su mayor parte el descenso provocado por la oscuridad, sugiriendo que podría ser el estado *redox* del pool de plastoquinonas y no la luz directamente quién controlaría finalmente la expresión de dichos genes (Fig. 8). Ya que en *Synechocystis*, la glucosa se metaboliza a través del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, produciendo NADPH, que a su vez podría reducir al pool de plastoquinonas (Aoki y Kato, 1983; Hirano *et al.*, 1980). Una regulación *redox* similar a la que ocurre en estos genes se ha descrito también para los genes *glnA* y *glnB* y para el operón *rbcLS* en *Synechocystis* 6803 (Reyes y Florencio, 1995; García-Domínguez y Florencio, 1997; Mohamed y Jansson, 1991). Por otra parte, también se observaba que los niveles del transcrito del gen *trxQ* no

descendían más allá del 60% tras 12 h en oscuridad (Fig. 8B), indicando que la transcripción de este gen no debe estar regulada directamente por el estado redox celular.

El descenso en los niveles de transcrito provocado por la oscuridad era bastante rápido en el caso de los genes *trxA*, *trxB*, *ftrC*, y *ftrV*, alcanzándose en 1 h niveles inferiores al 20% de los detectados en luz (Fig. 9). Como era de esperar el transcrito del gen *trxQ* descendía bastante más lentamente al transferir las células a oscuridad, aunque tras 4 h en esta condición se apreciaba un descenso en los niveles, llegando a ser éstos de aproximadamente un 40% de los iniciales (Fig. 9). Más sorprendente era el comportamiento del gen *trxC* en este tipo de transiciones luz-oscuridad a tiempos cortos (Fig. 9), ya que los niveles del transcrito de este gen ascendían inicialmente al transferir las células a oscuridad, alcanzándose en 30 min valores superiores al 160% de los iniciales, para posteriormente comenzar a descender, aunque en este caso, tras 4 h en oscuridad los niveles de transcrito del gen *trxC* aún se mantenían altos. Este comportamiento no se observaba cuando las cinéticas se realizaban a tiempos más largos (Fig. 10), aunque también se podía observar que en el caso del gen *trxC*, tras 4 h en oscuridad las células aún presentaban niveles elevados de transcrito. Por otra parte, la reiluminación de los cultivos resultaba en un rápido ascenso de los niveles de transcrito de todos los genes, incluidos los genes *trxC* y *trxQ*, alcanzándose en 15 min niveles incluso superiores a los iniciales. Sin embargo, los niveles de transcrito del gen *trxB* solamente alcanzaban un 40% de los iniciales tras 30 min de reiluminación.

Por otra parte, la adición de rifampicina, que bloquea el inicio de la transcripción, a cultivos que estaban creciendo en luz y que inmediatamente se transferían a oscuridad, o bien se mantenían en las mismas condiciones de iluminación (Fig. 11), claramente indicaba que las diferencias observadas en los niveles de mRNA de los diferentes genes en las transiciones luz-oscuridad estaban debidas a diferencias en la tasa de transcripción de éstos y no a una distinta estabilidad de los transcritos de los diferentes genes. Se determinó una vida media para los transcritos de estos genes que oscilaba entre 1,5-2,5 min, tanto en luz como en oscuridad. Vidas medias similares se habían calculado para otros mensajeros de *Synechocystis* 6803, como en el caso de los mRNA de los genes *glnA* y *glnN* (Reyes *et al.*, 1997).

Además, el uso en presencia de luz de los inhibidores fotosintéticos DCMU y DBMIB, producía una caída de los niveles de transcrito similar a la producida por la oscuridad (figuras 10 y 12). Observándose con ambos inhibidores un descenso rápido en los niveles de los transcritos de los genes *trxA*, *trxB*, *ftrC* y *ftrV*. Por otra parte, en el caso de los genes *trxC* y *trxQ*, se observaba un aumento inicial de los niveles de los transcritos que posteriormente resultaba en un descenso lento de dichos niveles. Estos resultados se asemejan bastante a los se observados en los experimentos de

transición luz-oscuridad a tiempos cortos (Fig. 9). No obstante, cuando la adición de los inhibidores fotosintéticos se realizaba a cultivos creciendo en luz en presencia de glucosa 10 mM (Fig. 14A y B), sólo el DBMIB, provocaba un descenso en los niveles de los transcritos.

Todos estos datos indicaban que el efecto de la oscuridad sobre la transcripción de estos genes no era debido a la ausencia de luz en sí, sino al estado *redox* celular, y es probable por los resultados obtenidos con los inhibidores fotosintéticos, que sea el estado *redox* del pool de plastoquinonas el que esté involucrado en dicha regulación.

Finalmente, la transcripción del gen *trxQ* no parece estar regulada por el estado *redox* celular ya que responde muy lentamente a estos cambios, observándose descensos destacables en la transcripción de este gen solamente cuando las células se someten a periodos largos de oscuridad, indicando que el descenso en la transcripción de este gen podría estar debido a una disminución general de la transcripción provocada por la ausencia de una fuente de energía que permita el crecimiento y el metabolismo en unos niveles altos. La regulación transcripcional mostrada por este gen, sugiere que papel de esta tiorredoxina puede estar alejado del control *redox* del metabolismo fotosintético.

4.2.2.2. Expresión diferencial de los genes *trxA*, *trxB*, *trxC*, *trxQ*, *ftrC* y *ftrV*, en respuesta a agentes oxidantes.

La implicación de tiorredoxinas en la respuesta que presentan las células al estrés oxidativo ha sido descrita en distintos organismos. Por ejemplo, en la bacteria *Oenococcus oeni*, la presencia de H₂O₂ induce la expresión del gen *trxA*, que codifica una tiorredoxina en este organismo (Jobin *et al.*, 1998) igualmente en *E. coli*, la expresión del gen *trxC*, que codifica una segunda tiorredoxina, se induce en respuesta a los tratamientos con H₂O₂ (Ritz *et al.*, 2000). Finalmente, en *Saccharomyces cerevisiae* también se ha descrito que los genes que codifican el sistema, tiorredoxina peroxidasa (*TSA1*), tiorredoxina (*TRX2*) y tiorredoxina reductasa (*TRR1*) (Kuge y Jones, 1994; Morgan *et al.*, 1997; Godon *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999), se inducen en presencia de H₂O₂.

Para comprobar si los genes que codifican el sistema tiorredoxina-reductasa:tiorredoxina en *Synechocystis* 6803 se inducían por la presencia de agentes oxidantes, analizamos su expresión mediante *northern blot*, tras añadir a los cultivos H₂O₂ o menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona: vitamina K₃), ya que ambos compuestos producen especies de oxígeno reactivas que causan estrés oxidativo en las células.

Los resultados obtenidos mostraban que la menadiona y no el H₂O₂, provocaba un fuerte aumento de la transcripción de los genes *trxA*, *trxB* y *ftrC* (Fig. 14). El H₂O₂ tenía el efecto contrario en los niveles de mRNA de estos genes, provocando un descenso de aproximadamente un 50% en los

niveles de estos mensajeros cuando se utilizaba a la concentración de 4 mM. Sin embargo la expresión del gen *trxQ* presentaba una regulación opuesta, descendiendo los niveles de mRNA de este gen en presencia de menadiona y ascendiendo cuando se añadía al medio de cultivo H_2O_2 , aunque el aumento de la transcripción de este gen no era tan marcado como en el caso anterior. Por último, la expresión del gen *trxC*, no se afectaba por la adición de menadiona, aunque sí descendía en presencia de H_2O_2 .

El drástico aumento observado en los niveles de expresión de los genes *trxA* y *trxB* en presencia de menadiona claramente indica que estas proteínas deben estar jugando algún papel en la protección contra el estrés oxidativo, aumentos de la transcripción del mismo orden se habían descrito también en los genes *trxC* de *E. coli* y *TRX2* de *S. cerevisiae* (Ritz *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 1997). Sin embargo, los mecanismos de cómo estas proteínas pueden estar actuando no están claramente establecidos, aunque probablemente estos mecanismos incluyan la reducción de los residuos metionina sulfóxido que se forman en las metioninas o los puentes disulfuro que se forman entre cisteínas, por la acción de las especies de oxígeno reactivas y que inactivan a las proteínas donde se forman. Las tiorredoxinas actuarían como agentes reductores para las metionina sulfóxido reductasas o para las peroxidasas; recientemente se ha descrito la existencia de una tiorredoxina reductasa en *Synechocystis* 6803, la cual podría ser específica para alguna de estas tiorredoxinas (Yamamoto *et al.*, 1999). Este mecanismo parece también implicar la reducción de tiorredoxinas mediante la FTR, ya que los niveles del transcrito del gen *ftrC* ascienden de forma parecida a como lo hacen los de los genes *trxA* y *trxB*.

Por otra parte, el comportamiento que presentan estas tiorredoxinas a la presencia de H_2O_2 es difícil de explicar, ya que sólo aumentan los niveles de transcrito gen *trxQ*, descendiendo los de los demás, incluidos los del gen *ftrC*. Quizás el H_2O_2 produzca a estas concentraciones daños irreparables en el aparato fotosintético que provoquen un descenso de la transcripción de estos genes, ya que a mayor concentración de H_2O_2 más marcado es este efecto, y que solamente la transcripción del gen *trxQ* que parece ser independiente del proceso fotosintético, pudiera activarse en estas condiciones. Aunque también este efecto se podría entender como una respuesta distinta al estrés oxidativo producido por el H_2O_2 que al producido por el anión superóxido. Recientemente se ha demostrado por experimentos de complementación en *S. cerevisiae* que las tiorredoxinas-*m*, presentes en *A. thaliana*, muestran distinta eficiencia en la protección al daño provocado por el H_2O_2 en este organismo (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001), lo que corroboraría en cierta medida la existencia de diferencias en la respuesta de las tiorredoxinas de *Synechocystis* al estrés oxidativo provocado por diferentes agentes oxidantes. De todas formas claramente podemos concluir que los genes *trxA*, *trxB* y *trxQ* aumentan la expresión en presencia de agentes que producen especies

oxidantes en el interior celular, sugiriendo una implicación de estas tiorredoxinas en los procesos de protección que presentan las células al daño producido por el estrés oxidativo.

4.2.3. Generación y caracterización de estirpes mutantes de los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ*

La inactivación de genes de *Synechocystis* 6803 por inserción en éstos de genes que confieren resistencia a antibióticos ha sido una técnica ampliamente utilizada en la generación de mutantes de este organismo (Williams, 1988). Con anterioridad a este trabajo se había demostrado que el gen *trxA* de *Synechocystis* 6803 (Navarro y Florencio, 1995), al igual que ocurría con el gen *trxM* de *Anacystis nidulans* (Muller y Buchanan, 1989), eran esenciales para el crecimiento de estas cianobacterias. Para analizar si las tiorredoxinas TrxB, TrxC y TrxQ eran o no esenciales para el crecimiento de *Synechocystis* 6803 y con objeto de analizar *in vivo* las posibles funciones de estas tiorredoxinas, llevamos a cabo la interrupción de los genes *trxB* y *trxQ* con el casete de resistencia a kanamicina C.K1 y la del gen *trxC* con el casete de resistencia a cloramfenicol C.C1. Las mutaciones de los genes *trxB* y *trxQ* se segregaron completamente en el genomio de *Synechocystis*, pero la mutación del gen *trxC* no fue posible segregarla por completo (Fig. 17), indicando que la proteína TrxC era necesaria, al menos en las condiciones de cultivo analizadas, para el crecimiento de *Synechocystis*, mientras que las proteínas TrxB y TrxQ parecen ser dispensables para el crecimiento esta cianobacteria en las mismas condiciones de cultivo.

Los estudios de la tasa de crecimiento en condiciones fotoautotróficas de las estirpes mutantes de los genes *trxB*, *trxC* y *trxQ* denominadas respectivamente STXB1, STXC1 y STXQ1 mostraban que las estirpes STXB1 y STXQ1 presentaban unas tasas de crecimiento prácticamente iguales a la de la estirpe silvestre (Fig. 18), indicando que las mutaciones simples de estos genes no deben afectar en absoluto a la capacidad para crecer fotoautotróficamente de *Synechocystis* 6803. Sin embargo, la estirpe STXC1 presentaba durante los primeros días de cultivo una tasa de crecimiento claramente disminuida con respecto a la estirpe silvestre, aunque cuando los cultivos de esta estirpe alcanzaban una concentración de clorofila de aproximadamente 2 µg/ml la tasa de crecimiento se recuperaba y alcanzaba valores similares a los de las demás estirpes.

Dado que en un principio el efecto que tenía sobre el crecimiento de *Synechocystis*, la mutación del gen *trxC*, sólo era detectable durante las primeras etapas del cultivo sugería un posible papel de esta tiorredoxina en la fase exponencial de crecimiento y que esta función podría ser dispensable cuando las células alcanzaban la fase estacionaria de crecimiento. Un efecto similar aunque opuesto, de separación temporal de las funciones de una proteína, se ha descrito recientemente en *Synechocystis* 6803 con la enzima NADP-GDH, esta enzima presenta la máxima

actividad cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria, siendo esencial para el crecimiento de esta cianobacteria solamente en esta fase (Chávez et al., 1999)

Por otra parte, la determinación en condiciones de iluminación saturantes, de la velocidad de desprendimiento de oxígeno de las diferentes estirpes mutantes mostraba, que como ocurría con la tasa de crecimiento, las estirpes STXB1 y STXQ1 exhibían valores similares a los de la estirpe silvestre (Tabla 10), pero la estirpe STXC1 presentaba una tasa de desprendimiento de oxígeno fuertemente disminuida con respecto a la estirpe silvestre (Tabla 10). Este resultado sugería que el fenotipo mostrado por esta estirpe podría estar debido más, a una alteración de la capacidad fotosintética de las células que a una función específica de esta tiorredoxina relacionada con la fase de crecimiento. Las diferencias en la tasa de crecimiento observadas, podrían estar debidas a que durante la fase exponencial, la capacidad fotosintética máxima de la estirpe STXC1 no podría mantener la misma tasa de crecimiento que la estirpe silvestre, siendo ésta bastante inferior a la mostrada por la estirpe silvestre. Cuando el crecimiento de los cultivos se hace más lento, probablemente porque la luz que llega a cada célula es bastante menor, debido a la sombra que se dan unas a otras, la actividad fotosintética de los cultivos desciende, y la capacidad fotosintética presentada por la estirpe STXC1 sería suficiente para mantener una tasa de crecimiento equivalente a la de la estirpe silvestre y entonces no se observarían diferencias entre las velocidades de crecimiento de ambas estirpes, alcanzando finalmente los cultivos concentraciones de células bastante similares.

El cultivo de las estirpes silvestre y STXC1 bajo distintas intensidades luminosas, que iban desde luz tenue ($10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a luz de intensidad alta (150 y $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) pasando por luz de intensidad moderada ($50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), que es la utilizada normalmente para cultivar *Synechocystis*; mostraba por una parte, que la estirpe mutante apenas era capaz de crecer bajo intensidades luminosas superiores a $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (figuras 20 y 21) y que además a partir de $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz, los cultivos de esta estirpe tomaban una tonalidad amarillenta-anaranjada mucho más marcada incluso que en la estirpe silvestre cuando ésta se cultivaba a $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz (Fig. 19), donde se ha descrito que las células como mecanismo de protección acumulan carotenoides (Goodwin, 1980; Hirschberg y Chamovitz, 1994). Es más, la composición de carotenoides de la estirpe STXC1, no era distinta que la de la estirpe silvestre en estas mismas condiciones, lo que eliminaba la posibilidad de que fuera un anormal acúmulo de carotenoides lo que estaba provocando esta coloración.

Por otra parte la determinación de las concentraciones de ficobiliproteínas; ficocianina y aloficocianina en células de las estirpes silvestre y STXC1 cultivadas en 10 ó en $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz, mostraba que mientras a $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, ambas estirpes presentaban cantidades de

ficocianina y aloficocianina muy similares, a $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ los cultivos de la estirpe STXC1 presentaban aproximadamente la mitad de ficobiliproteínas que la estirpe silvestre, cuando esta se calculaba en relación a la cantidad de clorofila de los cultivos. Este resultado junto al hecho de que los cultivos crecían más en proporción a la cantidad de proteína total de las células que en proporción a la cantidad de clorofila (figuras 20 y 21), indicaban que probablemente estaba ocurriendo un proceso de degradación de los fotosistemas provocado en principio, por la intensidad de luz recibida.

La proteína D1 es una subunidad clave en los procesos de fotodegradación del PSII. El mantenimiento del PSII en estado funcional se consigue fundamentalmente por un equilibrio rápido entre la síntesis y la degradación de esta proteína (Samuelsson *et al.*, 2087). En cianobacterias se ha demostrado que la tasa de síntesis de la proteína D1 está regulada a nivel transcripcional, y que la luz es el principal efector de la transcripción de los genes *psbA* (Mohamed y Jansson, 2089, Golden, 2095). Dado que en *Synechococcus* 7942, la expresión diferencial de las distintas copias del gen *psbA*, que provoca la iluminación con luz de distintas intensidades parece estar regulada por un agente que reduce grupos tioles (Sippola *et al.*, 1999), ya que la adición a los cultivos de DTTred, que reduce grupos tioles, provoca el mismo efecto en la transcripción de los genes *psbAIII-III* que la iluminación con luz de alta intensidad y por otra parte el ácido *o*-iodosobenzoico y la diamida que oxidan grupos tioles tienen el efecto opuesto, hacía pensar que la tiorredoxina TrxC pudiera estar implicada en *Synechocystis* en la regulación de la transcripción de los genes *psbA*, y que el mutante STXC1 no pudiera regular la síntesis de la proteína D1 para adaptarse a las condiciones de mayor intensidad de luz, aunque hay que destacar que en *Synechocystis* la regulación de la transcripción de estos genes por luz es distinta a la que ocurre en *Synechococcus* (Mohamed *et al.*, 1993; Scafefer y Golden, 1989). Sin embargo, el análisis de los niveles de transcrito de los genes *psbA2-3*, en células de las estirpes silvestre y mutante iluminadas con luz de 10 ó $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad, mostraba que ambas estirpes STXC1 presentaban niveles de transcrito similares (Fig. 21), indicando que la estirpe STXC1 no estaba afectada en la transcripción de estos genes.

Por otro lado, como la vida media de los transcritos de los genes *psbA* en *Synechocystis* pasa a ser de 7 h en condiciones de oscuridad a 15 min en condiciones de iluminación (Mohamed y Jansson, 1991), sugiriendo que posiblemente la traducción de estos mensajeros esté provocando la distinta estabilidad de los mismos, y por otra parte se ha descrito que en *C. reinhardtii* la traducción del gen *psbA* parece estar regulada por la reducción mediante tiorredoxinas, de proteínas que se unen a la región 5' del mRNA de este gen (Trebitch *et al.*, 2000), parecía probable que la tiorredoxina TrxC pudiera estar implicada en la traducción de los genes *psbA* en *Synechocystis* 6803. El análisis

de las vidas medias de los mRNA de los genes *psbA* en las estirpes silvestre y STXC1 de *Synechocystis* 6803, claramente indicaba que no existían diferencias en la estabilidad de los mensajeros de estos genes entre ambas estirpes (Fig. 21), indicando que probablemente la estirpe STXC1 no estaba afectada en la traducibilidad de los mensajeros de los genes *psbA*.

Finalmente los estudios de inmunodetección mediante *western blot* de la proteína D1, realizados en muestras de las estirpes silvestre y STXC1 cultivadas a 10 y 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad de luz, utilizando anticuerpos contra la proteína D1 de espinaca (Fig. 21), ponían de manifiesto que la estirpe STXC1 no estaba afectada en los niveles de esta proteína, descartando totalmente la posibilidad de que el fenotipo observado en la estirpe STXC1, cuando se cultivaba a intensidades de luz superiores a 10 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, estuviera debido a un proceso de degradación de la proteína D1 y por tanto podíamos también descartar que el PSII se estuviera afectando, ya que esta proteína es la principal diana en los procesos de fotodegradación que afectan a este fotosistema (Aro *et al.*, 1983)

Aunque se considera al PSII más sensible a los procesos de fotoinhibición que el PSI (Aro *et al.*, 1993), una vez excluida la implicación del PSII en el fenotipo mostrado por el mutante STXC1, procedimos a analizar si el PSI estaba o no afectado en esta estirpe mutante.

El primer paso fue el análisis de los niveles de transcrito de los genes *psaA*, *psaB* y *psaC*. Los polipéptidos PsaA y PsaB están formando el núcleo central del PSI (Fish y Bogorad, 1986) y junto a PsaC, son los únicos polipéptidos del PSI que contienen cofactores redox (Ikeuchi, 1992). Por este último motivo, se escogieron como los polipéptidos del PSI con más probabilidades de ser dianas de la tiorredoxina TrxC. Sin embargo los niveles de transcrito detectados tanto con la sonda del gen *psaA*, que hibridaba además de con el mRNA del gen *psaA*, con el cotranscrito de los genes *psaA-psaB* (Fig. 25) (Smart y McIntosh, 1991), como con la sonda del gen *psaC* (Fig. 25), fueron prácticamente idénticos en ambas estirpes, con lo que también se podía descartar que la estirpe STXC1 estuviese afectada en la transcripción de estos genes.

El siguiente paso fue la detección mediante *western blot* en las estirpes silvestre y mutante de los niveles de proteínas del PSI. Esto se llevó a cabo utilizando anticuerpos policlonales obtenidos contra el complejo completo del PSI de espinaca. En este caso encontramos que aunque los anticuerpos reaccionaban con una sola banda en las muestras de *Synechocystis*, los niveles de esta aparecían claramente disminuidos en las muestras correspondientes a la estirpe STXC1 cultivada a 50 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 26), indicando que la estirpe STXC1 está afectada en los niveles de al menos uno de los polipéptidos que conforman el PSI. Por el tamaño de la banda, aproximadamente 17 kDa, ésta podría corresponderse con las subunidades PsaF o PsaL, cuyos tamaños deducidos son 16 kDa y 17 kDa respectivamente. La aparición de una sola banda en el *western* no nos permite confirmar que las

demás subunidades del PSI estén también afectadas, pero el fenotipo tan drástico presentado por la estirpe mutante cuando se cultiva a intensidades de luz superiores a $10 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sugiere que el proceso de fotodegradación debe afectar a la mayor parte de los polipéptidos del PSI.

Este proceso de fotodegradación del PSI podría estar provocado quizás, por una incapacidad de la estirpe mutante para eliminar de manera eficaz las especies de oxígeno altamente reactivas que se forman durante el transporte fotosintético de electrones. La tiorredoxina TrxC podría estar implicada en la activación de los mecanismos de eliminación de estas especies, como por ejemplo, en la activación de enzimas como la superóxido dismutasa para la eliminación del radical superóxido (O_2^-). La inactivación del gen *sodB* en *Synechococcus* 7942 que codifica una superóxido dismutasa dependiente de Fe (FeSOD) (Herbert *et al.*, 1992), provocaba en esta cianobacteria un fenotipo similar al del mutante STXC1, la reacción llevada a cabo por la superóxido dismutasa produce H_2O_2 y O_2 , el H_2O_2 es reducido a H_2O por la peroxidasa o por la catalasa, la actividad de estas enzimas también podrían ser objeto de regulación en *Synechocystis* de la tiorredoxina TrxC.

Por otra parte, esta tiorredoxina también podría estar mediando la activación de alguna de las enzimas del ciclo reductivo de las pentosa fosfato como por ejemplo a la fosforibuloquinasa, a la fructosa-1,6-bisfosfatasa o a la pseudoheptulosa-1,7-bisfosfatasa que en plantas son activadas *in vivo* por tiorredoxinas tipo (Buchanan, 1980, Tabita, 1988, Knaff, 1989). Si la actividad de estas enzimas no aumenta cuando en las células aumenta la tasa fotosintética, podría generarse un excedente de poder reductor que podría provocar la fotoinhibición del PSI. Una mutación puntual en el gen que codifica la fosforibuloquinasa de *Synechocystis* 6803, provocaba que las células pudieran crecer fotosintéticamente iluminando los cultivos con luz tenue, pero eran incapaces de hacerlo cuando se iluminaban con luz de mayor intensidad (Su y Bogorad, 1991).

El fenotipo de la estirpe STXC1 podría también ser explicado en parte porque los procesos de fotodegradación que afectan al PSI son irreversibles debido a la falta de mecanismos de reparación (Sonoike, 1996), lo que podría estar provocando que la fotoinhibición se estuviera observando solamente a nivel del PSI y no a nivel PSII donde existe una alta tasa de recambio de la proteína D1.

Un estudio más extenso de la estirpe STXC1 será necesario para definir las causas finales del fenotipo observado, aunque los estudios realizados hasta ahora parecen apuntar a que la tiorredoxina TrxC debe tener un papel importante, bien en la protección del PSI de los agentes oxidantes producidos durante el transporte fotosintético de electrones, o bien en la aclimatación de las células a los cambios en la intensidad luminosa recibida, recientemente se ha descrito que el gen

pmgA de *Synechocystis* 6803, esencial para mantener el crecimiento mixotrófico de esta cianobacteria, está implicado en la regulación de la estequiometría entre ambos fotosistemas (Hihara *et al.*, 1992). De todas formas tampoco se puede descartar que esta tiorredoxina esté implicada en la activación de algunas de las enzimas del ciclo reductivo de las pentosa fosfato.

4.2.4. Generación y caracterización de mutantes del gen *trxA* de *Synechocystis* 6803

Como se ha comentado en varios apartados de este trabajo, el gen *trxA* de *Synechocystis* 6803 es esencial tanto para el crecimiento fotoautotrófico como heterotrófico de esta cianobacteria (Navarro y Florencio, 1995). Anteriormente se había descrito que el gen *trxM* también era esencial para el crecimiento fotoautotrófico de *Synechococcus* 7942 (Muller y Buchanan, 1989). Por tanto no era posible la segregación total de las mutaciones de estos genes en los genomas de las citadas cianobacterias. Con objeto de poder estudiar *in vivo* las posibles funciones que pudiera realizar esta tiorredoxina en *Synechocystis* 6803, llevamos a cabo la generación de una estirpe mutante, STXA1, en la cual el gen *trxA* se encontraba bajo el control del promotor del gen *petJ*, este gen codifica el citocromo c_6 de *Synechocystis* 6803 (Zhang *et al.*, 1992). Como se comenta en el apartado 3.2.6, la expresión del gen *petJ* se reprime por la presencia de cobre en el medio de cultivo, a la vez que se induce la expresión del gen *petE* que codifica la plastocianina de esta cianobacteria (Zhang *et al.*, 1992). Como también se comenta en el mismo apartado, en nuestro laboratorio se estaba utilizando con éxito la expresión regulada por cobre desde promotor del gen *petJ* de genes esenciales cuya inactivación no podía ser segregada completamente (García-Domínguez, comunicación personal).

La sustitución en el cromosoma de *Synechocystis* 6803 del promotor del gen *trxA* por el del gen *petJ*, se segregó totalmente cultivando esta estirpe en presencia de kanamicina, en un medio BG11c donde se había eliminado totalmente de su composición el CuSO_4 . Este medio denominado BG11- Cu^{2+} , se utilizó en todos los experimentos llevados a cabo con esta estirpe. Con objeto de reprimir la expresión del gen *trxA* en la estirpe STXA1, se añadía al medio de cultivo CuSO_4 a una concentración final de 5 μM .

Sin embargo, cuando se analizó la expresión regulada por cobre de este gen en la estirpe STXA1 (Fig. 28A), se observaba que aunque inicialmente los niveles de mRNA del gen *trxA* desaparecían casi completamente tras la adición de cobre al medio de cultivo, estos volvían a alcanzar niveles similares a los iniciales cuando habían transcurrido 4 h de la adición del cobre. Al ser este comportamiento bastante sorprendente, ya que la concentración de cobre que estábamos usando debería ser suficiente para mantener reprimida la transcripción desde el promotor del gen *petJ*, durante al menos 98 h (Zhang *et al.*, 1992), procedimos a analizar la regulación de los genes *petJ* y *petE*, en esta estirpe y en la estirpe silvestre (Fig. 28B-C). El resultado obtenido fue aún más

sorprendente, ya que mientras en la estirpe silvestre la expresión de ambos genes se regulaba como era esperado (Zhang *et al.*, 1992), en la estirpe STXA1 la expresión de estos genes se presentaba desregulada de la misma forma que ocurría con la del gen *trxA*, es decir, tras 4 h de la adición de cobre, se perdía la regulación y los niveles de transcrito de estos genes volvían a ser similares a los iniciales. Además en la estirpe STXA1 los niveles de transcrito del gen *petE* que se alcanzaban tras la adición de cobre, eran bastante inferiores a los detectados en la estirpe silvestre (Fig. 28C).

La hipótesis de una regulación cíclica de estos promotores dependiente de los niveles de tiorredoxina TrxA, fue en parte rechazada por el estudio de la expresión de este gen a tiempos más largos en la estirpe STXA1 (Fig. 29). Donde se comprobaba que una vez que los niveles de transcrito del gen *trxA* ascendían a valores similares a los iniciales, éstos no volvían a descender al menos en las 12 h siguientes a la adición del cobre. Si la hipótesis hubiese sido válida, esperaríamos que los niveles de transcrito del gen *trxA* hubieran descendido de formar similar a como lo hacían inicialmente, una vez que éstos alcanzaban niveles similares a los iniciales.

Los estudios de la regulación transcripcional de estos genes llevados a cabo en la estirpe mutante STXA1.2, generada en una nueva transformación con el plásmido pTXA5, mostraban que en esta nueva estirpe, la expresión mediada por cobre de los genes *petJ*, *petE* y *trxA* seguía desregulada de la misma manera que en la estirpe STXA1 (Fig. 30). Por otra parte también se comprobaba que la expresión del operón *mssA* (Fig. 30), que se induce por la presencia de cobre en el medio de cultivo (López-Maury, comunicación personal), presentaba el mismo patrón de expresión que en la estirpe silvestre, indicando que la desregulación de los promotores inducidos o reprimidos por cobre no era general, sino que más bien debía estar limitada a los genes que implicasen el mismo sistema de regulación que el de los genes *petJ* y *petE*.

Es interesante indicar que los niveles de transcripción del gen *trxA* detectados en las estirpes STXA1 y STXA1.2, eran de partida bastante más bajos que los detectados en la estirpe silvestre, indicando que la expresión del gen *trxA* desde su propio promotor era mayor que desde el promotor del gen *petJ*. Estos niveles inferiores de transcrito del gen *trxA* podrían ser una de las causas que provocasen la desregulación de estos promotores.

Por otra parte, en la estirpe STXA1.2 la regulación de la expresión de los genes *petJ* y *petE* que provocaba las transiciones luz-oscuridad no se veía alterada, presentando los mismos niveles de transcrito que la estirpe silvestre (no mostrado).

Sin embargo, el análisis de la expresión de los genes *petJ* y *petE* en una estirpe mutante de *Synechocystis* en la que se había seguido la misma estrategia que en estos mutantes, en la sustitución el promotor del gen *glnB* por el del gen *petJ* (concesión de García-Domínguez), mostraba que en esta estirpe, la expresión de los genes *petJ* y *petE* mantenía la misma regulación por cobre que en la

estirpe silvestre, sugiriendo que no debía ser la duplicación del promotor del gen *petJ*, la causa de la desregulación observada en las estirpes STXA1 y STXA1.2.

Para comprobar si la expresión en estas estirpes del gen *trxA* desde su propio promotor restauraba la regulación de los promotores de los genes *petJ* y *petE*, se generó una nueva estirpe mutante derivada de STXA1.2, la cual contenía insertada una copia del gen *trxA* bajo el control de su propio promotor en el *locus* del gen *glnN* (Fig.31), que codifica la glutamina sintetasa tipo III de *Synechocystis* 6803 (Reyes y Florencio, 1994). En esta nueva estirpe denominada STXA2, los niveles de mRNA del gen *trxA* se mantenían en niveles similares a los iniciales, tras la adición de CuSO_4 5 μM , aunque en las dos primeras horas se detectaba una cierta disminución de los niveles de mRNA de este gen, pero que no llegaba ni siquiera a ser del 20% (Fig. 32). Sin embargo en esta nueva estirpe la expresión de los genes *petJ* y *petE* seguía desregulada de la misma forma que en las estirpes STXA1 y STXA1.2, demostrando que niveles de transcrito del gen *trxA* y por lo tanto de proteína TrxA similares a los silvestres, no recuperaban la regulación de estos promotores, descartando una implicación de la tiorredoxina TrxA, en la regulación mediada por cobre de los promotores de los genes *petJ* y *petE*.

Con los datos de expresión de los genes *trxA*, *petJ* y *petE* obtenidos con las distintas estirpes mutantes generadas en este trabajo, se hace difícil encontrar una explicación al fenotipo mostrado por dichas estirpes. Porque ya que si en un principio parecía, que podía existir una implicación de la proteína TrxA en la regulación de estos promotores, debido a que era, cuando el transcrito del gen *trxA* desaparecía tras la adición de cobre, cuando se perdía la regulación de los promotores. Esta hipótesis se veía rechazada, porque cuando en las células se alcanzaban los niveles de transcrito iniciales, el sistema no recuperaba la regulación, manteniéndose alta la transcripción del gen *trxA*, al menos durante 8 h después de haber alcanzado los niveles iniciales.

Por otra parte, la generación de la estirpe STXA2 que mostraba niveles de transcripción del gen *trxA* similares a los de la estirpe silvestre y constantes durante el transcurso de los experimentos, y que mantenía desregulados los promotores *petJ* y *petE*, descartaba que fueran los niveles más bajos de expresión del gen *trxA* desde el promotor del gen *petJ* lo que provocaba la desregulación.

Por último el análisis de la expresión de estos genes llevado a cabo en otra estirpe que presentaba una duplicación similar del promotor *petJ*, indicaba que tampoco era la duplicación del promotor *per se*, lo que provocaba el fenotipo.

Teniendo en mente estos datos, la hipótesis que proponemos para explicar estos resultados sería la siguiente: 1) La expresión del gen *petJ* requeriría de un activador que presentaría afinidad por el promotor de este gen en ausencia de cobre. 2) En presencia de cobre este activador perdería la

afinidad que tiene por el promotor del gen *petJ*, debido a que se le uniría una molécula correpresora, que podrían ser directamente iones Cu^{2+} , o bien otra molécula, probablemente una proteína, que detectaría la presencia de cobre. A su vez este activador con el correpresor unido, tendría afinidad por el promotor del gen *petE* activando su expresión. 3) Los bajos niveles de expresión que presenta el gen *trxA* desde el promotor *petJ*, harían que se seleccionaran positivamente mutaciones que aumentasen la afinidad del activador por el promotor, obteniéndose así mayores niveles de transcripción de este gen cuya inactivación es inviable y los niveles de transcripción en la estirpe silvestre son altos (Navarro *et al.*, 2000). 4) Estas mutaciones conllevarían la pérdida de afinidad del activador por el correpresor, con lo cual también perdería afinidad por el promotor del gen *petE*. 5) La adición de altas concentraciones de cobre, por ejemplo 5 μM , provocaría que hubiese dentro de las células grandes cantidades de moléculas correpresoras que inicialmente reprimirían la expresión desde el promotor del gen *petJ* y activarían la expresión del gen *petE*. 6) Una vez que la célula detecta las altas concentraciones de cobre intracelular, activaría los sistemas de excreción de cobre, por ejemplo del operón *mssA*, y los niveles de estos iones descenderían en el interior celular hasta valores que permitieran el normal crecimiento de las células. Este descenso de los niveles intracelulares de cobre conllevaría también un descenso del número de moléculas correpresoras del activador del promotor *petJ*, y este activador mutado que presenta baja afinidad por el correpresor, se volvería a unir al promotor *petJ*, recuperándose de nuevo los niveles iniciales de expresión.

Este proceso no tendría lugar en el mutante del gen *glnB*, debido a que la expresión de este gen en *Synechocystis* es más baja que la que presenta desde el promotor del gen *petJ*, e incluso este mutante requiere de la presencia de ciertas cantidades de cobre en el medio de cultivo para el normal crecimiento (García-Domínguez, comunicación personal).

Esta hipótesis totalmente teórica, necesitaría de muchos resultados empíricos para su demostración y claramente dirigiría esta investigación hacia objetivos que no son los inicialmente concebidos en este trabajo, aunque sin lugar a dudas, el estudio de la regulación de estos promotores sería un proyecto de investigación realmente interesante.

La conclusión que podemos sacar de estos resultados es que probablemente, el requerimiento de altas cantidades de proteína TrxA, para el crecimiento de *Synechocystis*, impide la inactivación de este gen, incluso temporalmente.

5. CONCLUSIONES

1. La cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 posee un único gen, *glsF*, que codifica glutamato sintasas. La secuencia del gen *glsF*, 4647 pb, codifica una proteína de 1549 aminoácidos con una masa molecular calculada de 170 kDa. El análisis de la comparación de la secuencia de aminoácidos deducida indica que el gen *glsF* codifica una glutamato sintasa dependiente de ferredoxina (Fd-GOGAT).
2. Se ha demostrado; mediante medidas de actividad Fd-GOGAT, experimentos de inmunodetección, y análisis de la expresión del correspondiente gen *glsF*, que esta enzima no se encuentra presente en el heterocisto de *Anabaena* 7120. Lo que sugiere una clara compartimentación del metabolismo del nitrógeno entre el heterocisto y las células vegetativas.
3. La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 presenta cuatro genes denominados *trxA*, *trxB*, *trxC* y *trxQ*, que codifican tiorredoxinas. Adicionalmente al gen *trxA*, el gen *trxC*, resulta esencial para el crecimiento fotoautotrófico de esta cianobacteria. Mientras que los genes *trxB* y *trxQ* son dispensables para el normal crecimiento de ésta.
4. Los genes *trxA*, *trxB* y *trxC* están regulados a nivel transcripcional en esta cianobacteria por cambios en el estado *redox* celular. La regulación de la transcripción del gen *trxQ* no parece estar regulada por estos cambios.
5. El estrés oxidativo induce fuertemente la expresión de los genes *trxA* y *trxB* y en menor medida la expresión del gen *trxQ*. La expresión del gen *trxC* por el contrario, no se afecta en estas condiciones.
6. Los mutantes del gen *trxC* presentan, pese a no segregar completamente la mutación, un fenotipo pleiotrópico que les impide crecer a intensidades de luz moderadas. Este fenotipo tiene como primer resultado la destrucción de al menos uno de los polipéptidos que componen el fotosistema I.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Alam J, Curtis S, Gleason FK, Gerami-Nejad M, Fuchs JA. 1989. Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of an unusual thioredoxin gene from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* 171: 162-171
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers y D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Anderson, M. Vance, C. Heichel, G. y Miller, S. 1989. Purification and characterization of the NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 90:351-358
- Anderson S L, McIntosh L. 1991. Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* 173: 2761-2767
- Arner, E.S. y Holmgren, A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* 267:6102-9
- Aro E, Virgin MI, Andersson B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143: 113-134
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl (eds.). 1996. *Currents Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Beale, S.I. 1994. Biosynthesis of cyanobacterial tetrapyrrole pigments: hemes, chlorophylls, and phycobilins. En Bryant, D.A. (ed.). *The molecular biology of cyanobacteria*. pp. 519-558. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, Dordrecht.
- Besse I, Buchanan BB. (1997) Thioredoxin-linked plant and animal processes: the new generation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 38: 1-11
- Birnboim, H.C. y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bhattacharya, D. y L. Medlin. 1998. Algal phylogeny and the origin of lands plants. *Plant. Physiol.* 116: 9-15
- Blankenship, R.E. (1992). Origin and evolution of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 33:91:111.
- Boussiba, S., W. Dilling y J. Gibson. 1984. Methylammonium transport in *Anacystis nidulans* R-2. *J. Bacteriol.* 160:204-210
- Böhme, H. 1998. Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria *Trends in Plant Science* , 3:9:346-351
- Böhme H, Haselkorn R. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of the gene coding for heterocyst ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Gen. Genet.* 214: 278-85
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254

- Buchanan BB.** (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu Rev Plant Physiol* 31: 341-374.
- Buchanan BB.** (1992). Carbon dioxide assimilation in oxygenic and anoxygenic photosynthesis. *Photosynth Res* 33: 147-162
- Buick, R.** 1992. The antiquity of the oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-depleted archaean lakes. *Science* 255:74-77
- Burger-Wiersma, T. y A.F. Post.** 1989. Functional analysis of the photosynthetic apparatus of *Prochlorothrix hollandica* (Prochlorales), a chlorophyll *b* containing procaryote. *Plant Physiol.* 91:770-774
- Campbell D., J. Houmard y N. Tandeau de Marsac.** 1993. Electron transport regulates cellular differentiation in the filamentous cyanobacterium *Calothrix*. *Plant Cell* 5: 451-463.
- 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
- Capitani G, Markovic-Housley Z, DelVal G, Morris M, Jansonius JN, Schurmann P.** 2000. Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *J Mol Biol.* 302:135-154.
- Carlberg I y Nordlund S.** 1991. Purification and partial characterization of glutamate synthase from *Rhodospirillum rubrum* grown under nitrogen-fixing conditions. *Biochem J.* 279:151-4.
- Cogoni C, Valenzuela L, Gonzalez-Halphen D, Olivera H, Macino G, Ballario P, Gonzalez A.** 1995. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J. Bacteriol.* 177:792-8.
- Cohen-Kupiec, R., M. Gurevitz y A. Zilberstein.** 1993. Expression of *glnA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is initiated from a single *nif* like promoter under various nitrogen conditions. *J Bacteriol* 175: 7727-7731.
- Collier JL, Grossman AR.** 1995. Disruption of a gene encoding a novel thioredoxin-like protein alters the cyanobacterial photosynthetic apparatus. *J Bacteriol.* 177:3269-3276
- Constant S, Perewoska I, Alfonso M, Kirilovsky D.** (1997). Expression of the *psbA* gene during photoinhibition and recovery in *Synechocystis* PCC 6714: inhibition and damage of transcriptional and translational machinery prevent the restoration of photosystem II activity. *Plant Mol Biol* 34: 1-13.
- Crawford N A, Droux M, Kosower NS, Buchanan BB.** (1989). Evidence for function of the ferredoxin/thioredoxin system in the reductive activation of target enzymes of isolated intact chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 271: 223-239
- Crespo, J.L., M. García-Domínguez y F.J. Florencio.** 1998. Nitrogen control of the *glnN* gene that codes for the GS type III, the only glutamine synthetase in the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. *Mol. Microbiol.* 30: 1101-1112
- Chapman, J. y J. Meeks.** 1983. Glutamine and glutamate transport by *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 156: 122-129.

- Chauvat, F., L. De Vries, A. Van der Ende y G.A. Van Arkel. 1986. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* 204, 165-191.
- Chávez, S. y P. Candau. 1991. An NAD-specific glutamate dehydrogenase from cyanobacteria. Identification and properties. *FEBS Lett.* 285:35-38.
- Chávez S, Lucena JM, Reyes JC, Florencio FJ, Candau P. 1999. The presence of glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the Cyanobacterium *synechocystis* sp. strain PCC 6803 under nonexponential growth conditions. *J. Bacteriol.* 181:808-13.
- Chávez, S., J.C. Reyes, F. Chauvat, F.J. Florencio y P. Candau. 1995. The NADP-glutamate dehydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803: cloning, transcriptional analysis and disruption of the *gdhA* gene. *Plant. Mol. Biol.* 28: 173-188.
- Chen, F. y Cullimore, J. 1989. Localization of two isoforms of NADH dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Planta.* 179:441-447
- Danon A, Mayfield SP. (1994). Light-regulated translation of chloroplast messenger RNAs through redox potential. *Science* 266: 1717-1719
- Decottignies P, Schmitter JM, Jacquot JP, Dutka S, Picaud A, Gadal P. 1990. Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a thioredoxin from a green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch Biochem Biophys.* 280:112-21
- Dinkins RD, Bandaranayake H, Baeza L, Griffiths AJ, Green BR. (1997). *hcf5*, a nuclear photosynthetic electron transport mutant of *Arabidopsis thaliana* with a pleiotropic effect on chloroplast gene expression. *Plant Physiol* 113: 1023-1031
- Douglas, S.E. y S. Turner. 1991. Molecular evidence for the origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. *J. Mol. Evol.* 33:267-273
- Droux M, Jacquot JP, Miginaç-Maslow M, Gadal P, Huet JC, Crawford NA, Yee BC, Buchanan BB. 1987. Ferredoxin-thioredoxin reductase, an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: purification and properties of the enzyme from C3, C4, and cyanobacterial species. *Arch Biochem Biophys.* 252:426-39.
- Elhai, J. y C.P. Wolk. 1988. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 68:119-138.
- Elmorjani, K. y M. Herdman. 1987. Metabolic control of phycocyanin degradation in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: a glucose effect. *J. Gen. Microbiol.* 133:1685-1694.
- Florencio, F.J., S. Marqués y P. Candau. 1987a. Identification and characterization of glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Lett.* 223:37-41.
- 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 A. Herrero (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En *The molecular Biology of the Cyanobacteria*. D. A. Bryant, (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 487-517

- Flores, E., M.G. Guerrero y M. Losada. 1980. Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. Arch. Microbiol. 128:137-144.
- Flores, E., M.G. Guerrero y M. Losada. 1983. Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochim. Biophys. Acta 722:408-416
- Flores, E. y M.I Muro-Pastor. 1988. Uptake of glutamine and glutamate by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. FEMS Microbiol. Lett. 56: 127-130.
- Fork DC, Herbert SK. (1993). Electron transport and photophosphorylation by photosystem I *in vivo* in plants and cyanobacteria. Photosynth Res 36: 149-168
- Frías, J.E., E. Flores y A. Herrero. 1997. Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J. Bacteriol. 179: 477-486
- Galván, F., A Márquez, y J. Vega J. 1984. Purification and molecular properties of ferredoxin-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Planta. 162:180-187
- García-Domínguez M, Florencio FJ. (1997). Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding PII protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Plant Mol Biol 35: 723-734
- García-Domínguez M, Reyes JC, Florencio FJ. 1999. Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 96:7161-7166.
- Giovannoni, S.J., S. Turner, G.J. Olsen, S. Barns, D.J. Lane y N.R. Pace. 1988. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. J. Bacteriol. 170: 3584-3592
- Gleason FK. (1992). Activities of two dissimilar thioredoxins from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J Bacteriol 174: 2592-2598
- Gleason FK, Holmgren A. 1981. Isolation and characterization of thioredoxin from the cyanobacterium, *Anabaena* sp. J Biol Chem. 256:8306-9
- Gray, M.W. 1989. The evolutionary origins of organelles. Trends Gen. 5:294-299
- Gregerson RG, Miller SS, Twary SN, Gantt JS, Vance CP. 1993. Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. Plant Cell. 5:215-226
- Grigorieva, G. y S. Shestakov. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. FEMS Microbiol. Lett. 13:367-370
- Guerrero, M.G., J.M. Vega y M. Losada. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. Annu. Rev. Plant Physiol. 32:169-204
- Gupta M, Carr NG. 1981. Detection of glutamate synthase in heterocysts of *Anabaena* sp. strain 7120. J. Bacteriol. 148:980-982.
- Häger, K.P., Danneberg, G. and Bothe, H. (1983) FEMS Microbiol. Lett. 17, 179-183.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166:557-580.

- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. En *DNA cloning*, vol. 1 (D. M. Glover, ed.) IRL Press, Oxford.
- Hemmilä IA y Mäntsälä PI. 1978. Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J.* 173: 45-52
- Herdman, M., M. Janvier, J.B. Waterbury, R. Rippka y R.Y. Stanier. 1979. Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 63-71
- Hirano M, Satoh K, Katoh S. (1980). Plastoquinone as a common link between photosynthesis and respiration in a blue-green alga. *Photosynth Res* 1: 149-162
- Hirasawa M, Hurley JK, Salamon Z, Tollin G, Knaff DB. 1996. Oxidation-reduction and transient kinetic studies of spinach ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Arch Biochem Biophys.* 330:209-215
- Hirasawa M, Schurmann P, Jacquot JP, Manieri W, Jacquot P, Keryer E, Hartman FC, Knaff DB. 1999. Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry.* 38:5200-5205.
- Hodges M, Miginiac-Maslow M, Decottignies P, Jacquot JP, Stein M, Lepiniec L, Cretin C, Gadal P. 1994. Purification and characterization of pea thioredoxin f expressed in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol.* 26:225-34
- Holmes, D.S. y M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197.
- Holmgren A. 1968. Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 6:475-84.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54: 237-271
- Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem.* 264:13963-13966.
- Huang, T.C. y T.J. Chow. 1988. Comparative studies of some nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria isolated from rice fields. *J. Gen. Microbiol.* 134: 3089-3097.
- Issakidis-Bourguet E, Mouaheb N, Meyer Y, Miginiac-Maslow M. 2001. Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *Plant J.* 25:127-135.
- Iwate H, Yano K, Kamo M, Gardet-Salvi L, Schurmann P, Tsugita A. 1994. Amino acid sequence of spinach ferredoxin:thioredoxin reductase variable subunit. *Eur J Biochem.* 223:465-471
- Jacquot JP. 1997. Thioredoxins: structure and function in plant cells *New Phytol* 136: 543-570
- Jacquot JP, Lopez-Jaramillo J, Miginiac-Maslow M, Lemaire S, Cherfils J, Chueca A, Lopez-Gorge J. (1997) Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett* 401: 143-147

- Jiang, F., U. Hellman, G.E. Sroga, B. Bergman y B. Mannervik. 1995. Cloning, sequencing, and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 270: 22882-22889.
- Jovin, T., A. Chrambach y M.A. Naughton. 1964. Apparatus for preparative temperature regulated polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 9:351-364.
- Jürgens, U.J., G. Drews y J. Weckesser. 1983. Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6741. *J. Bacteriol.* 154: 471-478
- Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirose, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A. Watanabe, M. Yamada, M. Yasuda y S. Tabata. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3: 109-136
- Kim J, Mayfield SP. (1997). Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. *Science* 278: 1954-1957
- Kleiner, D., 1981. The transport of NH₃ and NH₄⁺ across biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 639:41-52
- Knaff DB, Hirasawa M, Ameyibor E, Fu W, Johnson MK. 1991. Spectroscopic evidence for a [3Fe-4S] cluster in spinach glutamate synthase. *J Biol Chem.* 266:15080-15084.
- Knaff DB, Hirasawa M. 1991. Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 1056:93-125.
- Labarre, J., P. Thuriaux y F. Chauvat. 1987. Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. *J. Bacteriol.* 169:4668-4673
- 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.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh MH, Coruzzi G. 1995. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell.* 7:887-898.
- Lancelin JM, Guilhaudis L, Krimm I, Blackledge MJ, Marion D, Jacquot JP. 2000 NMR structures of thioredoxin m from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteins.* 41:334-49.
- Lara, C., J.M. Romero y M.G. Guerrero. 1987. Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* 169:4376-4378
- Lea PJ, Mifflin BJ. 1974. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature.* 251:614-616

Lemaire S, Keryer E, Stein M, Schepens I, Issakidis-Bourguet E, Gerard-Hirne C, Miginiac-Maslow M, Jacquot JP. 1999. Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*;120:773-8

Lemaire SD, Stein M, Issakidis-Bourguet E, Keryer E, Benoit V, Pineau B, Gerard-Hirne C, Miginiac-Maslow M, Jacquot JP. 1999 The complex regulation of ferredoxin/thioredoxin-related genes by light and the circadian clock. *Planta*. 12;209:221-229

Li R, Golden SS. (1993). Enhancer activity of light-responsive regulatory elements in the untranslated leader regions of cyanobacterial *psbA* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11678-11682

Liang, Y.Y., M. de Zamaroczy, F. Arsene, A. Paquelin y C. Elmerich. 1992. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* 79: 113-119.

Lim CJ, Gleason FK, Fuchs JA. (1986). Cloning, expression, and characterization of the *Anabaena* thioredoxin gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 168: 1258-1264

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

Luque, I., A. Herrero, E. Flores y F. Madueño. 1992. Clustering of genes involved in nitrate assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Mol. Gen. Genet.* 232:7-11

Luque, I., E. Flores y A. Herrero. 1993. Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942: homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant. Mol. Biol.* 21:1201-1205.

Luria, S.E. y J.L. Suit. 1987. Colicins and Col plasmids. En F.C. Neidhart, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds.). *Escherichia coli y Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. pp. 1615-1624. American Society for Microbiology, Washington, DC.

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

Manzano, C., P. Candau, C. Gomez-Moreno, A.M. Relimpio y M. Losada. 1976. Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*. *Mol. Cell Biochem.* 10: 161-169

Marraccini P, Cassier-Chauvat C, Bulteau S, Chávez S, Chauvat F. (1994). Light-regulated promoters from *Synechocystis* PCC 6803 share a consensus motif involved in photoregulation. *Mol Microbiol* 12: 1005-1012

Marqués, S., F.J. Florencio y P. Candau. 1989. Ammonia assimilating enzymes from cyanobacteria: *in situ* and *in vitro* assay using high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 180:152-157.

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

- Márquez, A.J. 1985. Biosíntesis de glutamato en *Chlamydomonas reinhardtii*. Purificación y propiedades de las enzimas con actividad glutanato sintasa. Tesis Doctoral Universidad de Sevilla.
- Márquez, A.J., F. Galván y J. Vega. 1984. Purification and characterization of the NADH-glutamate synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant. Sci. Lett.* 34:305-314
- Martin, W., B. Stoebe, V. Goremykin, S. Hansmann, M. Hasegawa y K.V. Kowallik. 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393: 162-165
- Masepohl B, Scholisch K, Gorlitz K, Kutzki C, Bohme H. 1997. The heterocyst-specific *fdxH* gene product of the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 is important but not essential for nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 27;253:770-6
- Meeks, J.C., C.P. Wolk, W. Lockau, N. Schilling, P.W. Shaffer y W.S. Chien. 1978. Pathways of assimilation of [^{13}N]N $_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *J. Bacteriol.* 134:125-130.
- Meeks, J.C., C.P. Wolk, J. Thomas, W. Lockau, P.W. Shaffer, M.A. Austin, W.S. Chien y A. Galonsky. 1977. The pathways of assimilation of $^{13}\text{NH}_4^+$ by the cyanobacterium, *Anabaena cylindrica*. *J. Biol. Chem.* 252:7894-7900
- Melkonian, M. 1996. Systematics and evolution of the algae: endocytobiosis and evolution of the major algal lineages. En Behnke, H.-D., U. Lüttge, K. Esser, J.W. Kadereit y M. Runge (eds.) *Progress in Botany*, vol. 57. pp. 281-311. Springer-Verlag, Berli, Heidelberg
- Mérida, A., P. Candau y F.J. Florencio. 1991. Regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by the nitrogen source: effect of ammonium. *J. Bacteriol.* 173:4095-4100
- Mérida, A., L. Leurentop, P. Candau y F.J. Florencio. 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
- Mestres-Ortega D, Meyer Y. 1999. The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene*.240:307-16
- Miller R y Stadman E. 1972. Glutamate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 247: 7407-7419
- Mohamed A, Jansson C. (1989). Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* 13: 693-700
- Mohamed A, Jansson C. (1993). Photosynthetic electron transport controls degradation but not production of *psbA* transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* 16: 891-897 (1991).
- Mohamed A, Eriksson J, Osiewacz HD, Jansson C. Differential expression of the *psbA* genes in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Mol Gen Genet* 238: 161-168
- Montesinos, M.L., A.M. Muro-Pastor, A. Herrero y E. Flores. 1998. Ammonium-methylammonium permeases of a cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated *amt* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 273: 31463-31470

- 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
- Muller EG. (1991). Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem* 266: 9194-9202
- Muller EG, Buchanan BB. (1989). Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. The thioredoxin *m* gene of *Anacystis nidulans*. *J Biol Chem* 264: 4008-4014
- Mullineaux, P.M., J.R. Gallon y A.E. Chaplin (1981) Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles. *FEMS Microbiol Lett* 10: 245-247
- Muro-Pastor, M.I. y F.J. Florencio. 1994. NADP(+)-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: purification and characterization of the enzyme and cloning, sequencing, and disruption of the *icd* gene. *J. Bacteriol.* 176: 2718-2726
- Muro-Pastor, M.I., J.C. Reyes y F.J. Florencio. 1996. The NADP⁺-isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) is nitrogen regulated in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 178: 4070-4076.
- Navarro F., E. Martín-Figueroa, P. Candau y F.J. Florencio. 2000. The ferredoxin-dependent iron-sulfur flavoprotein glutamate synthase (GlsF) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Expression and assembly in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys* 379,.
- Navarro, F., S. Chávez, P. Candau y F.J. Florencio. 1995. Existence of two ferredoxin-glutamate synthases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Isolation and insertional inactivation of *gltB* and *gltS* genes. *Plant. Mol. Biol.* 27: 753-767
- Navarro F, Florencio FJ. (1996). The cyanobacterial thioredoxin gene is required for both photoautotrophic and heterotrophic growth. *Plant Physiol* 111: 1067-1075
- Neilson, A. H. y M. Doudoroff. 1973. Ammonia assimilation in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 89:15-22
- Okuhara H, Matsumura T, Fujita Y, Hase T. 1999. Cloning and inactivation of genes encoding ferredoxin- and NADH-dependent glutamate synthases in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. Imbalances in nitrogen and carbon assimilations caused by deficiency of the ferredoxin-dependent enzyme *Plant Physiol.* 120:33-42.
- Omata, T. 1995. Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 36:207-213.
- Omata, T., X. Andriessse y A. Hirano. 1993. Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol. Gen. Genet.* 236:193-202
- Pagano EA, Chueca A, Lopez-Gorge J. 2000. Expression of thioredoxins f and m, and of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase, in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions. *J Exp Bot.* 51:1299-307.

- Pakrasi HB, Williams JG, Arntzen CJ. (1988). Targeted mutagenesis of the *psbE* and *psbF* genes blocks photosynthetic electron transport: evidence for a functional role of cytochrome b559 in photosystem II. *EMBO J* 7: 325-332
- Pearce, J., C.K. Leach y N.G. Carr. 1969. The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* 55:371-378.
- Prusiner, S. y E.R. Stadtman (eds.). 1973. The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press. New York.
- Rai, A.N., Rowell, P. and Stewart, W.D.P. 1982. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2203-2205
- Rai, A.N., P. Rowell y W.D.P Stewart. 1984. Evidence for an ammonium transport system in free-living and symbiotic cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 137: 241-246
- Ramasubramanian, T.S., T.-F. Wei y J.W. Golden. 1994. Two *Anabaena* sp. strain PCC7120 DNA-binding factors interact with vegetative cell- and heterocyst-specific genes. *J. Bacteriol.* 176: 1214-1223.
- Reitzer, L.J. y B. Magasanik. 1987. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and Molecular Biology*, Vol. 1 (F. C. Neidhart, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger, eds.) pp. 302-320. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Reyes JC, Florencio FJ. (1994). A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J Bacteriol* 176: 1260-1267
- Reyes JC, Florencio FJ. (1995). Electron transport controls transcription of the glutamine synthetase gene (*glnA*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* 27: 789-799
- Reyes, J.C., M.I. Muro-Pastor y F.J. Florencio. 1997. Transcription of glutamine synthetase genes (*glnA* and *glnN*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *J. Bacteriol.* 179: 2678-2689.
- Rippka, R., J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herman y R.Y. Stanier. 1979. Generic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61
- Rivera-Madrid R, Mestres D, Marinho P, Jacquot JP, Decottignies P, Miginiac-Maslow M, Meyer Y. 1995. Evidence for five divergent thioredoxin h sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5620-56244.
- Rodríguez, R., C. Lara y M.G. Guerrero. 1992. Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Kinetic and energetic aspects. *Biochem. J.* 282:639-643
- Ruelland E, Miginiac-Maslow M. (1999). Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition?. *Trends in Plant Science*, 4: 136-141

- Salamon Z, Tollin G, Hirasawa M, Gardet-Salvi L, Stritt-Etter AL, Knaff DB, Schurmann P. 1995. The oxidation-reduction properties of spinach thioredoxins f and m and of ferredoxin:thioredoxin reductase. *Biochim Biophys Acta*. 1230:114-118
- Sampaio, M.J.A.M., P. Rowell y W.D.P. Stewart. 1979. Purification and some properties of glutamine synthetase from the nitrogen fixing cyanobacteria *Anabaena cylindrica* and a *Nostoc* sp. *J. Gen. Microbiol.* 111:181-191.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467
- Schaefer MR, Golden SS. (1989). Differential expression of members of a cyanobacterial *psbA* gene family in response to light. *J Bacteriol* 171: 3973-3981
- Schmidt, A. 1988. Sulfur metabolism in cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167:572-583
- Schopf, J.W. 1993. Microfossils of the early archean apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260:640-646
- Schrautemeier B, Böhme H. 1992. Coding sequence of a heterocyst ferredoxin gene (*fdxH*) isolated from the nitrogen-fixing cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601. *Plant. Mol. Biol.* 18:1005-1006
- 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
- Sippola K, Aro EM. 1999. Thiol redox state regulates expression of *psbA* genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Mol Biol*;41:425-33
- Smart LB, McIntosh L. (1991). Expression of photosynthesis genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: *psaA-psaB* and *psbA* transcripts accumulate in dark-grown cells. *Plant Mol Biol* 17: 959-971
- 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
- Stadtman, E.R. y A. Ginsburg. 1974. The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. pp 755-807. En: *The Enzymes* Vol X. Boyer, P.D. (ed.). Academic Press. New York
- Stanier, R.Y. y G. Cohen-Bazire (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann Rev Microbiol* 31: 225-274
- Stewart EJ, Aslund F, Beckwith J. 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* 17:5543
- Stein M, Jacquot JP, Jeannette E, Decottignies P, Hodges M, Lancelin JM, Mittard V, Schmitter JM, Miginiac-Maslow M. 1995. Chlamydomonas reinhardtii thioredoxins: structure of the genes coding for the chloroplastic m and cytosolic h isoforms; expression in *Escherichia coli* of the recombinant proteins, purification and biochemical properties. *Plant Mol Biol.* 28:487-503
- Suzuki A y Gadal P. 1984. Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plant and other organism. *Physiol Veg* 22: 471-476

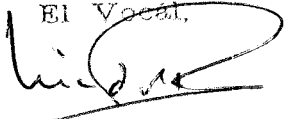
- Tandeau de Marsac, N. Y Houmard (1993).** Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new step towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104:466-470
- Thomas J., Meeks, J.C., Wolk, C.P., Shaffer, P.W., Austin, S.M. and Chien, W.S. (1977)** Formation of glutamine from [¹³N]ammonia, [¹³N]dinitrogen, and [¹⁴C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*.
- Trebitsh T, Levitan A, Sofer A, Danon A. 2000.** Translation of chloroplast *psbA* mRNA is modulated in the light by counteracting oxidizing and reducing activities. *Mol Cell Biol.* 20:1116-23.
- Trebst, A. (1980).** Inhibitors in the electron flow. *Methods Enzymol.* 69: 675-715
- Tumer, N.E., S.J. Robinson y R. Haselkorn. 1983.** Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. *Nature* 306:337-342.
- Valentin K, Kostrzewa M, Zetsche K. 1993.** Glutamate synthase is plastid-encoded in a red alga: implications for the evolution of glutamate synthases. *Plant Mol Biol.* 23:77-85
- Vanoni MA, Curti B y Zanetti G. 1991.** Glutamate synthase. En Muller F (eds) *Chemistry and Biochemistry of Flavoproteins*, vol III, 309-317, Walter De Gruiter, Berlin
- Vioque A. (1992).** Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res* 20: 6331-6337
- Weathers, P.J. y M.M. Allen. 1978.** Variations in short term products of inorganic carbon fixation in exponential and stationary phase cultures of *Aphanocapsa* 6308. *Arch. Microbiol.* 116:231-234
- Whittaker MM, Gleason FK. 1984.** Isolation and characterization of thioredoxin f from the filamentous cyanobacterium, *Anabaena* sp. 7119. *J Biol Chem.* 259:14088-93
- Woese, C.R. 1987.** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271
- Wolfe, G.R., F.X. Cunningham, D. Durnford, B.R. Green y E. Gantt. 1994.** Evidence for a common origin of chloroplast with light-harvesting complex of different pigmentation. *Nature* 367:566-568
- 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 CP, Austin SM, Bortins J, Galonsky A. 1974.** Autoradiographic localization of ¹³N after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by a heterocyst-forming blue-green alga. *J. Cell Bi.ol.* 61:440-53.
- Wolk, C.P., A. Ernst y J. Elhai. 1994.** Heterocyst metabolism and development. En Bryant, D.A. (ed.). *The molecular biology of cyanobacteria*. pp. 769-823. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, Dordrecht
- Wolk, C.P., J. Thomas, W. Lockau, P.W. Shaffer, S.M. Austin, W.-S. Chien y A. Galonsky (1976)** Pathway of nitrogen metabolism after fixation of ¹³N-labeled nitrogen gas by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J Biol Chem* 251: 5027-5034

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Eugenio Martín Figueroa
titulada Estudio del pen de la heredoxxxx: platamento sintasa
(plsF) de Anabacem sp. PCC 7120 y de los penes del sistema
de los heredoxxxx de Synechocystis sp. PCC 6803
acordó otorgarle la calificación de sobresaliente cum laude
por unanimidad

Sevilla, 23 de abril 2001

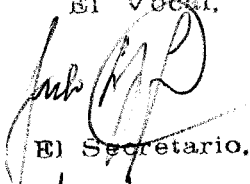
El Vocal,



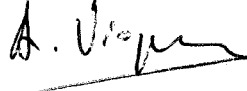
El Presidente



El Vocal,



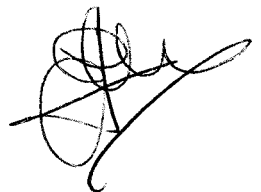
El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600031154