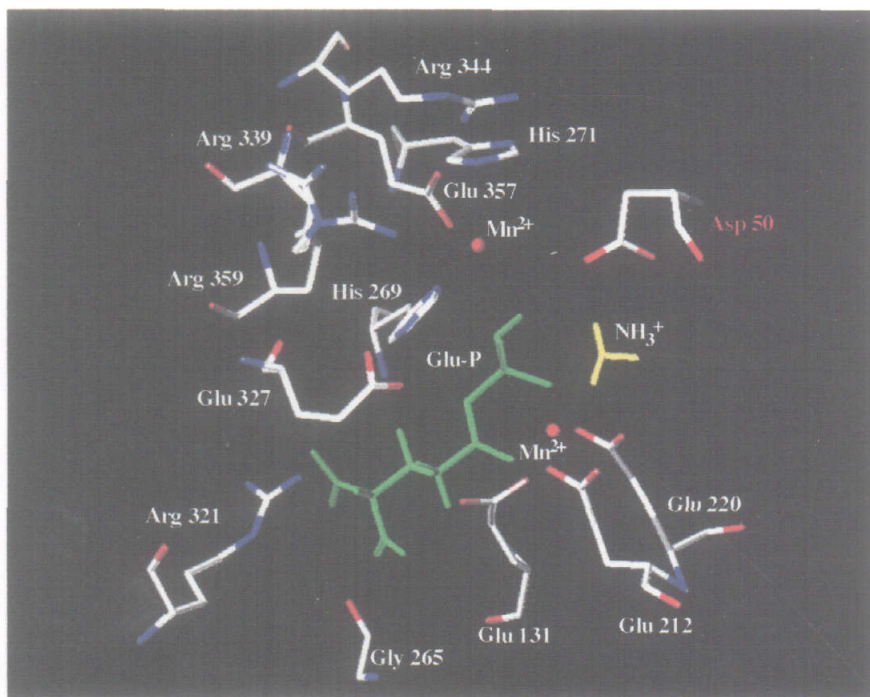


**LAS GLUTAMINA SINTETASAS DE *Anabaena azollae* (GSI) Y
Pseudanabaena sp. PCC 6903 (GSIII). MUTANTES DIRIGIDOS
AFECTADOS EN LA AFINIDAD POR EL AMONIO.**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS

Comunicación a la Comisión Doctoral
al número 27 número 343 del libro
correspondiente.

Sevilla, 09 FEB. 1999

El Jefe del Negociado de Teoría,

José Luis Crespo González

Universidad de Sevilla, Febrero de 1999

TD
458

R. 18.267



**LAS GLUTAMINA SINTETASAS DE *Anabaena azollae* (GSI) Y
Pseudanabaena sp. PCC 6903 (GSIII). MUTANTES DIRIGIDOS
AFECTADOS EN LA AFINIDAD POR EL AMONIO.**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas por el Licenciado
José Luis Crespo González

Sevilla, Febrero de 1999

Director:

Dr. Miguel García Guerrero
Catedrático de Bioquímica
y Biología Molecular

Director:

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

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS	9
1.INTRODUCCIÓN	11
1.1. LAS CIANOBACTERIAS	13
1.1.1. Características generales de las cianobacterias	13
1.1.2. Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias	14
1.2. LA GLUTAMINA SINTETASA	19
1.2.1. Características generales de la enzima	20
1.2.2. Inhibidores de la GS	22
1.2.3. Regulación de la GS en procariotas	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	29
2.1.1. Cianobacterias	29
2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias empleadas	29
2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo de cianobacterias	29
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	30
2.1.2.1. Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas	30
2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo de <i>E. coli</i>	31
2.1.2.3. Métodos de recogida de células	32
2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA	33
2.2.1. Ensayo transferasa de la actividad glutamina sintetasa	33
2.2.2. Ensayo acoplado de la actividad glutamina sintetasa	33
2.2.3. Inactivación <i>in vitro</i> de la GS de <i>A. azollae</i> con MSX y PPT. Cálculo de las constantes de inhibición (K_i)	34
2.3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	35
2.3.1. Preparación de extractos celulares	35
2.3.1.1. Rotura por ultrasonidos	35
2.3.1.2. Rotura con perlas de vidrio	35
2.3.2. Técnicas cromatográficas	36
2.3.2.1. Cromatografía de intercambio iónico	36
2.3.2.2. Cromatografía de afinidad en Blue-Sefarosa	36
2.3.3. Precipitación mediante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	36

2.3.4. Electroforesis de proteínas	37
2.3.4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	37
2.3.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturizante	37
2.3.4.3. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	37
2.3.4.4. Detección de la actividad transferasa de la GS en geles de poliacrilamida	38
2.3.4.5. Detección de la actividad biosintética de la GS en geles de poliacrilamida	38
2.3.5. Técnicas inmunológicas: Detección de GS en geles de acrilamida mediante Western blot	38
2.3.6. Concentración de proteínas por ultrafiltración	39
2.3.7. Cambio de tampón y eliminación de sales y moléculas pequeñas de preparaciones de proteínas y DNA	39
2.4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA Y RNA <i>IN VITRO</i>	39
2.4.1. Plásmidos utilizados	40
2.4.2. Aislamiento y análisis de DNA	40
2.4.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	40
2.4.2.2. Aislamiento de DNA total de cianobacterias	41
2.4.2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	42
2.4.2.4. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida	42
2.4.2.5. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa	43
2.4.2.6. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación con sondas radiactivas (Southern blot)	43
2.4.2.7. Manipulaciones enzimáticas del DNA	44
2.4.3. Aislamiento y análisis de RNA total de cianobacterias	44
2.4.3.1. Extracción de RNA con perlas de vidrio	44
2.4.3.2. Detección de RNAm mediante hibridación con sondas de DNA radiactivas (Northern blot)	45
2.4.3.3. Determinación del primer nucleótido de un RNAm mediante la técnica de extensión de cebadores (primer extension)	46
2.4.4. Secuenciación de DNA	47
2.4.4.1. Obtención de delecciones seriadas de fragmentos de DNA mediante digestión con exonucleasa III	47
2.4.4.2. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea poliacrilamida	47
2.4.5. Construcción de genotecas de DNA genómico de cianobacterias	48
2.4.6. Ensayos de retardo en geles de poliacrilamida	49

2.5. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	49
2.5.1. Obtención de células competentes y transformación de <i>E. coli</i>	49
2.5.2. Conjugación de <i>Anabaena azollae</i> y <i>Anabaena 7120</i>	50
2.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LOS GENES <i>glnA</i> DE <i>A. azollae</i> Y <i>glnN</i> DE <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	51
2.6.1. Hibridación de los oligonucleótidos al plásmido y síntesis de la cadena de DNA mutada	52
2.6.2. Primera ronda de selección	52
2.6.3. Segunda ronda de selección	53
2.6.4. Obtención e identificación de mutantes	53
2.7. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS	53
2.7.1. Determinación de clorofila	53
2.7.2. Determinación de proteínas	54
2.7.3. Determinación de γ -glutamihidroxiato	54
2.7.4. Determinación de amonio	54
2.7.5. Cuantificación de DNA y RNA	55
2.8. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEINAS	55
3. RESULTADOS	57
3.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES MSX Y PPT SOBRE LA ACTIVIDAD GS Y LA EXCRECIÓN DE AMONIO	59
3.1.1. Efecto de la adición de los inhibidores MSX y PPT a cultivos de <i>A. azollae</i>	59
3.1.2. Búsqueda de mutantes de <i>A. azollae</i> resistentes a los compuestos PPT y/o MSX	59
3.1.2.1. Búsqueda de mutantes de <i>A. azollae</i> resistentes al inhibidor PPT	59
3.1.2.2. Análisis de la actividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la actividad GS en los mutantes de <i>A. azollae</i> resistentes a PPT	60
3.1.2.3. Resistencia a MSX de los mutantes resistentes a PPT	61
3.1.2.4. Efecto de la adición de PPT o MSX en la excreción de amonio en los mutantes doble resistentes	62
3.2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>glnA</i> DE <i>A. azollae</i> AS-DS	63
3.2.1. Clonación del gen <i>glnA</i> de <i>A. azollae</i> AS-DS	63

3.2.2. Secuenciación y análisis de la secuencia del gen <i>glnA</i>	65
3.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA GSI DE <i>A. azollae</i>	66
3.3.1. Elección de las mutaciones específicas	66
3.3.2. Proceso de mutagénesis	66
3.4. ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DIRIGIDOS EN <i>E. COLI</i>	68
3.4.1. Expresión del gen <i>glnA</i> de <i>A. azollae</i> y los cinco mutantes dirigidos en la estirpe de <i>E. coli</i> ET6017	68
3.4.2. Identificación del producto de expresión del gen <i>glnA</i> y los mutantes dirigidos en <i>E. coli</i>	69
3.4.3. Complementación del mutante de <i>E. coli</i> ET6017 en medio mínimo	70
3.5. PURIFICACIÓN DE LA GS SILVESTRE Y LOS CINCO MUTANTES DIRIGIDOS EXPRESADAS EN <i>E. coli</i>	71
3.5.1. Purificación de la GS silvestre	71
3.5.1.1. Precipitación al 35-70 % de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	71
3.5.1.2. Cromatografía en DEAE-celulosa	72
3.5.1.3. Cromatografía de afinidad en Blue-Sepharosa	73
3.5.2. Purificación de los mutantes dirigidos de la GS de <i>A. azollae</i>	75
3.6. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA GS SILVESTRE Y DE LOS CINCO MUTANTES DIRIGIDOS	78
3.6.1. Actividades biosintética y transferasa	78
3.6.2. Constantes de Michaelis-Menten (K_m)	80
3.6.3. Constantes catalíticas (k_{cat})	81
3.6.4. Efecto de los inhibidores MSX y PPT sobre la actividad GS en las proteínas silvestre y mutantes	81
3.7. REGULACIÓN POR FUENTE DE NITRÓGENO DE LA GS DE <i>A. azollae</i>	85
3.7.1. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de actividad GS y de RNAm del gen <i>glnA</i>	85
3.7.2. Inactivación por amonio de la GSI de <i>A. azollae</i>	87
3.8. ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DIRIGIDOS DE LA GSI DE <i>A. AZOLLAE</i> EN CIANOBACTERIAS	88
3.9. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>glnN</i> DE <i>Pseudanabaena</i> SP. PCC 6903	91
3.9.1. Clonación del gen <i>glnN</i> de <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	91

3.9.2. Secuenciación y análisis de la secuencia del gen <i>glnN</i>	92
3.10. PRESENCIA DE UN ÚNICO TIPO DE GS EN <i>PSEUDANABAENA</i> 6903	95
3.11. REGULACIÓN EN <i>Pseudanabaena</i> 6903 DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>glnN</i> Y DE LA ACTIVIDAD GS POR LA FUENTE DE NITRÓGENO	97
3.11.1. Niveles de actividad GS y RNAm del gen <i>glnN</i> en función de la fuente de nitrógeno	97
3.11.2. Regulación de la actividad GS, cantidad de proteína GSIII y transcrito <i>glnN</i> debida al cambio en la fuente de nitrógeno	99
3.11.3. Análisis del promotor del gen <i>glnN</i> de <i>Pseudanabaena</i> 6903: regulación por NtcA	102
3.12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA GS TIPO III DE <i>PSEUDANABAENA</i> 6903	105
3.12.1. Elección de las mutaciones específicas	105
3.12.2. Proceso de mutagénesis	105
3.13.3. Análisis de la actividad GS de los mutantes dirigidos expresados en <i>E. coli</i>	106
4. DISCUSIÓN	109
4.1. RESISTENCIA DE <i>A. azollae</i> A LA PPT Y AL MSX	111
4.2. EL GEN <i>glnA</i> DE <i>A. azollae</i>	113
4.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA GSI DE <i>A. azollae</i>	114
4.4. INHIBICIÓN DE LA GS DE <i>A. azollae</i> POR MSX Y PPT	119
4.4. LA GSIII DE <i>Pseudanabaena</i> 6903	120
4.5. REGULACIÓN DE LA GSIII EN <i>Pseudanabaena</i> 6903 POR FUENTE DE NITRÓGENO	123
4.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA GSIII DE <i>Pseudanabaena</i> 6903	124
5. CONCLUSIONES	127
6. BIBLIOGRAFÍA	131

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Imágenes de las cianobacterias empleadas en este trabajo al microscopio óptico y del helecho acuático <i>Azolla</i> .	15
FIGURA 2.	Ruta de asimilación del nitrato y del amonio en cianobacterias.	17
FIGURA 3.	Esquema del proceso catalítico de la glutamina sintetasa.	21
FIGURA 4.	Mecanismo de acción de la GS después de la formación del γ -glutamil-fosfato y de la unión del amonio.	22
FIGURA 5.	Reacción de fosforilación del MSX y de la PPT.	23
FIGURA 6.	Modelo esquemático de la regulación de la actividad GS y NtrC de <i>E. coli</i> en respuesta al estado nitrogenado de la célula.	25
FIGURA 7.	Efecto de los inhibidores MSX y PPT sobre la actividad GS y la excreción de amonio en células de <i>A. azollae</i> .	60
FIGURA 8.	Efecto de los inhibidores MSX y PPT sobre la actividad GS y la excreción de amonio en los mutantes de <i>A. azollae</i> PPT ^R y PPT/MSX ^R .	62
FIGURA 9.	Secuencia de nucleótidos del gen <i>glnA</i> de <i>A. azollae</i> y secuencia de aminoácidos deducida.	64
FIGURA 10.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las GSs de <i>A. azollae</i> , <i>Anabaena</i> 7120 y <i>E. coli</i> .	65
FIGURA 11.	Esquema del plásmido pJL2 utilizado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida del gen <i>glnA</i> de <i>A. azollae</i> .	67
FIGURA 12.	Secuenciación de la zona del gen <i>glnA</i> correspondiente a los nucleótidos que codifican el residuo Asp-51 en la proteína silvestre y en los cinco mutantes dirigidos.	68
FIGURA 13.	Expresión de las formas mutantes de la GSI de <i>A. azollae</i> en <i>E. coli</i> ET6017.	70
FIGURA 14.	Perfil de elución de la GS recombinante en la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.	72
FIGURA 15.	Perfil de elución de la GS recombinante en cromatografía de Blue-Sefarosa.	73
FIGURA 16.	Patrones electroforéticos de proteínas de las diferentes etapas en la purificación de la GS silvestre recombinante.	74
FIGURA 17.	Patrones electroforéticos de proteínas de las diferentes etapas en la purificación del mutante dirigido de la GS D51E expresado en <i>E. coli</i> .	76
FIGURA 18.	Patrones electroforéticos de las GS silvestre y los cinco mutantes dirigidos purificados.	78
FIGURA 19.	Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes de las GSs purificadas.	79
FIGURA 20.	Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes de la GS silvestre y la forma mutante D51E inactivadas con MSX o con PPT.	82
FIGURA 21.	Inactivación de la GS silvestre de <i>A. azollae</i> y el mutante dirigido D51E con MSX o con PPT.	83
FIGURA 22.	Representaciones de Dixon para el cálculo de los valores de K_i para el MSX y la PPT en la GS silvestre de <i>A. azollae</i> y la forma mutante D51E.	84
FIGURA 23.	Niveles de actividad GS, proteína GSI y transcrito <i>glnA</i> de <i>A. azollae</i> cultivada con distintas fuentes de nitrógeno.	86
FIGURA 24.	Inactivación de la actividad GS de <i>A. azollae</i> por amonio.	88
FIGURA 26.	Inmunodetección de la GS tipo III en los clones complementantes de <i>E. coli</i> ET6017.	92
FIGURA 27.	Secuencia de nucleótidos del gen <i>glnN</i> de <i>Pseudanabaena</i> 6903 y secuencia de aminoácidos deducida.	93
FIGURA 28.	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las GSs tipo III.	95
FIGURA 29.	Existencia de un único tipo de GS (GSIII) en <i>Pseudanabaena</i> 6903.	96
FIGURA 30.	Detección por hibridación de secuencias homólogas al gen <i>glnA</i> de <i>Synechocystis</i> 6803 en diferentes cianobacterias.	97

FIGURA 31.	Niveles de actividad GS, proteína GSIII y transcrito <i>glnN</i> de <i>Pseudanabaena</i> 6903 cultivada con distintas fuentes de nitrógeno.	98
FIGURA 32.	Efecto en el nivel de actividad GS, cantidad de proteína GSIII y transcrito <i>glnN</i> provocado por la adición de amonio o estrés de nitrógeno en <i>Pseudanabaena</i> 6903.	100
FIGURA 33.	Efecto de la adición de amonio o nitrato a células de <i>Pseudanabaena</i> 6903 sometidas a deficiencia de nitrógeno.	101
FIGURA 34.	Determinación del punto de inicio de transcripción del gen <i>glnN</i> de <i>Pseudanabaena</i> 6903.	103
FIGURA 35.	Ensayos de retardo en gel del promotor del gen <i>glnN</i> de <i>Pseudanabaena</i> 6903 con NtcA de <i>Synechocystis</i> 6803.	104
FIGURA 36.	Esquema del plásmido pJL20 utilizado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de la proteína GSIII de <i>Pseudanabaena</i> 6903.	106
FIGURA 37.	Comprobación por análisis de restricción con la enzima <i>Pst</i> I de la mutación dirigida D130A.	107
FIGURA 38.	Representación del sitio activo de la GS de <i>E. coli</i> .	118
FIGURA 39.	Dendrograma indicativo de las relaciones de similitud entre las diferentes secuencias de GSs.	122



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	31
TABLA 2.	Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.	40
TABLA 3.	Plásmidos construidos en este trabajo.	41
TABLA 4.	Efecto de la PPT y el MSX <i>in vitro</i> sobre la actividad GS de las estirpes mutantes PPT/MSX ^R de <i>A. azollae</i> .	61
TABLA 5.	Actividad de las GSs silvestre y mutantes dirigidos expresados en ET6017.	69
TABLA 6.	Complementación de la estirpe ET6017 de <i>E. coli</i> en medio mínimo con las construcciones que expresan la GS de <i>A. azollae</i> y los cinco mutantes dirigidos.	71
TABLA 7.	Purificación de la GS de <i>A. azollae</i> expresada en <i>E. coli</i> ET6017.	74
TABLA 8.	Purificación de la GS mutante D51S de <i>A. azollae</i> expresada en <i>E. coli</i> ET6017.	76
TABLA 9.	Purificación de la GS mutante D51A de <i>A. azollae</i> expresada en <i>E. coli</i> ET6017.	77
TABLA 10.	Purificación de la GS mutante D51N de <i>A. azollae</i> expresada en <i>E. coli</i> ET6017.	77
TABLA 11.	Purificación de la GS mutante D51E de <i>A. azollae</i> expresada en <i>E. coli</i> ET6017.	77
TABLA 12.	Actividades específicas de las GSs purificadas silvestre y mutantes.	79
TABLA 13.	Constantes de Michaelis-Menten (K_m) y catalíticas (k_{cat}) de las GSs recombinantes.	80
TABLA 14.	Constantes específicas para los diferentes sustratos de las proteínas purificadas recombinantes.	81
TABLA 15.	Inactivación de las GSs purificadas silvestre y mutantes con MSX y PPT.	82
TABLA 16.	Valores de K_i de la GS silvestre y de la forma mutante D51E para los inhibidores MSX y PPT en las actividades biosintética y transferasa.	85
TABLA 18.	Parámetros cinéticos de la GS purificada de diferentes organismos procarióticos.	116
TABLA 19.	Valores de las K_i de la GS de varios organismos para los inhibidores MSX y PPT.	119

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
Ap	Ampicilina
Ap ^r	Resistencia a la ampicilina
ATP	Trifosfato de adenosina
CoA	Coenzima A
dCTP	Trifosfato de desoxicitosina
DEAE	Dietilaminoetil
DEPC	dietil pirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
dUTP	Trifosfato de desoxiuridina
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
etidio	3, 8-diamino-6-etil-5-fenilfenantridio
g	Aceleración de la gravedad terrestre
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
GTP	Trifosfato de guanosina
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kb	Miles de pares de bases
K _m	Constante de Michaelis-Menten
K _m	Kanamicina
K _m ^r	Resistencia a la kanamicina
min	Minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MSX	L-Metionina-D, L-sulfoximina
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
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
PPT	Fosfinotricina
prot.	Proteína
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Laurilsulfato sódico
Sm	Estreptomicina
Sm ^r	Resistencia a la estreptomicina
Tc	Tetraciclina
Tc ^r	Resistencia a la tetraciclina
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletildiamina
TES	Ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico

Tricina	N-tris(hidroximetil)metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
U	Unidad de actividad enzimática
UTEX	Colección de cultivos de la Universidad de Texas.
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.

La fotosíntesis es un proceso metabólico fundamental para la mayoría, si no todos, los organismos vivos. Un amplio espectro de organismos posee la capacidad de llevar a cabo dicho proceso, incluyendo tanto a eucariotas como a procariotas. Los eucariotas fotosintéticos comprenden no solamente a las plantas superiores, sino también a las algas verdes, pardas y rojas, así como a las euglenales, las dinoflageladas y las diatomeas. Los procariotas incluyen tres grupos bien diferenciados de eubacterias fotosintéticas: las bacterias rojas y las bacterias verdes, que realizan fotosíntesis anoxigénica, y las cianobacterias, cuya principal característica es la de poseer un sistema de pigmentos similar al de los eucariotas fotosintéticos, que le permite llevar a cabo una fotosíntesis oxigénica (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). También existen algunos grupos de cianobacterias que son capaces de realizar fotosíntesis anoxigénica, utilizando H_2S como donador de electrones (Schmidt, 1988).

El origen de las cianobacterias data de hace aproximadamente 3.500 millones de años (Schopf, 1993), y su aparición fue fundamental para la evolución del resto de los seres vivos al crear una atmósfera oxigénica que permitió la aparición de la capa de ozono, que protegería de la radiación UV. Las cianobacterias también parecen haber desempeñado un papel esencial en la evolución de las plantas superiores, ya que según la teoría endosimbionte (Gray *et al.*, 1989), éstas podrían haber dado origen al cloroplasto mediante un proceso de endosimbiosis.

Las cianobacterias se dividen en cinco grupos atendiendo a sus características morfológicas (Rippka *et al.*, 1979). Las secciones I y II engloban cianobacterias unicelulares que se dividen por fusión binaria o múltiple, respectivamente. La sección III agrupa las cianobacterias filamentosas no formadoras de heterocistos, que son células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico y que proporcionan un ambiente anoxigénico, necesario para la estabilidad y funcionalidad de la enzima que cataliza la reacción de fijación de N_2 , la nitrogenasa. En las secciones IV y V se encuadran todas las especies filamentosas que sí desarrollan heterocistos.

Sin embargo, en lo que se refiere a las propiedades metabólicas, las cianobacterias constituyen un grupo relativamente uniforme. La asimilación de CO_2 tiene lugar mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), si bien existe una vía cuantitativamente minoritaria a través de la fosfoenol-piruvato carboxilasa (Weathers y Allen, 1978). Además presentan un ciclo incompleto de los ácidos tricarbónicos, debido a la carencia de una de las proteínas del complejo, la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (Pearce *et al.*, 1969; Stanier y Cohen-Bazire, 1977), peculiaridad metabólica que comparten con multitud de quimioheterotrofos

anaeróbicos estrictos y quimioautotrofos aeróbicos. Por tanto, el ciclo de Krebs opera en estos organismos con funciones biosintéticas más que catabólicas.

Muchas cianobacterias son fotoautotrofas estrictas, totalmente incapaces de crecer en la oscuridad a expensas de fuentes orgánicas de carbono y energía. Sin embargo, algunas especies son capaces de utilizar algunos azúcares como fuentes de carbono y energía en mixotrofia (utilización de sustratos orgánicos a la vez que se realiza fotosíntesis), en fotoheterotrofia (utilización de sustratos orgánicos manteniendo inhibido el flujo no cíclico fotosintético) o en absoluta heterotrofia (utilización de sustratos orgánicos en oscuridad) (Rippka *et al.*, 1979; Smith, 1982). El metabolismo respiratorio se produce a través del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

Las cianobacterias están también presentes en asociaciones simbióticas con organismos eucarióticos, especialmente en el reino de las plantas, aunque esta capacidad parece estar restringida a las especies formadoras de heterocistos (Bergman *et al.*, 1996). Dentro de las plantas, las cianobacterias pueden establecer simbiosis con una amplia variedad de especies: están presentes en las angiospermas, concretamente en el género *Gunnera*, único caso conocido en el que la cianobacteria se localiza intracelularmente en la simbiosis; en las Cicadaceas, que son las únicas gimnospermas conocidas que forman simbiosis con estos organismos, y también están presentes en Hepáticas y Anthoceros (Bergman *et al.*, 1996). Una simbiosis importante desde el punto de vista agrícola es la que se da entre el pequeño helecho acuático *Azolla* y su huésped *Anabaena azollae* (Figura 1), inicialmente descrita por Strasburger en el año 1873 (revisado por Peters y Meeks, 1989). El helecho crece en la superficie de aguas mansas de zonas tropicales y de clima moderado. En la parte inferior de sus frondes se encuentran unas pequeñas cavidades que albergan los filamentos de *A. azollae*. Es posible el crecimiento del hospedador libre de su simbiote, aunque bajo tales condiciones *Azolla* se vuelve dependiente de una fuente exógena de nitrógeno fijado. Esta simbiosis proporciona una fuente de nitrógeno en la práctica tradicional del cultivo de arroz en el Sudeste Asiático y África. *Azolla* se hace crecer en la superficie del arrozal, entre las plantas de arroz, donde su potente desarrollo da como resultado una cantidad de nitrógeno fijado por hectarea y año de 1.100 Kg, superior al valor de 400 Kg de nitrógeno fijado por hectarea y año en la relación simbiótica de las leguminosas con *Rhizobium* (Swaminathan, 1984). En esta simbiosis se produce más amonio del que puede ser utilizado y como consecuencia, el exceso se excreta al medio, por lo que puede ser asimilado por las plantas de arroz.

1.1.2. Metabolismo del nitrógeno en cianobacterias.

Las cianobacterias emplean principalmente los compuestos inorgánicos nitrato y amonio como fuente de nitrógeno, aunque algunas especies también pueden asimilar urea y aminoácidos como la arginina (revisado por Guerrero y Lara, 1987; Flores y

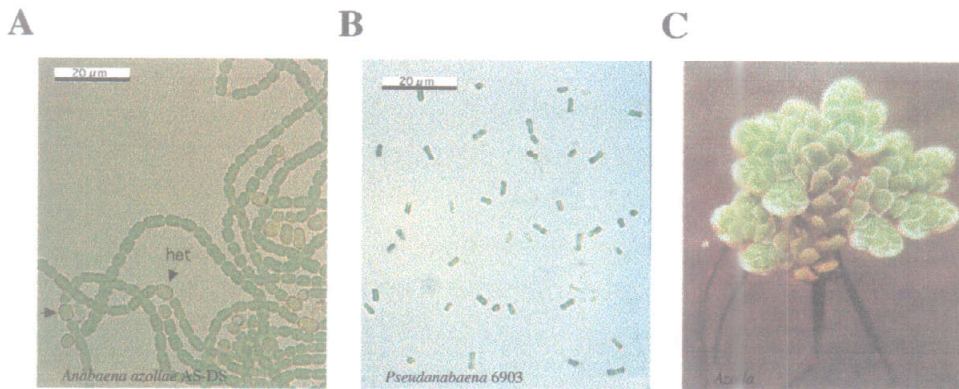


Figura 1. Imágenes de las cianobacterias empleadas en este trabajo al microscopio óptico y del helecho acuático *Azolla*.

A) Filamentos de *Anabaena azollae* AS-DS; los heterocistos (het) aparecen señalados con una flecha. B) *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. C) Helecho acuático *Azolla*, hospedador de la cianobacteria *A. azollae*.

Herrero, 1994). Además, muchas cianobacterias son capaces de crecer a expensas únicamente de N_2 atmosférico fijado como única fuente de nitrógeno, proceso que llevan a cabo mediante la enzima nitrogenasa y que será abordado con profundidad más adelante. Una característica que parece ser común en todas las cianobacterias es la preferencia a emplear amonio como fuente de nitrógeno frente a otros compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos.

El transporte de los compuestos nitrogenados al interior celular supone el primer paso necesario para su asimilación. El nitrato y el nitrito son transportados en *Synechococcus* 7942 de forma activa (Flores *et al.*, 1983; Lara *et al.*, 1987; Rodríguez *et al.*, 1992), mientras que el amonio entra de forma pasiva por la membrana bacteriana (Kleiner, 1981). Sin embargo, la existencia de un sistema de transporte de amonio de alta afinidad ha sido descrito en cianobacterias fijadoras y no fijadoras (Flores *et al.*, 1980; Ohmori *et al.*, 1977; Boussiba *et al.*, 1984). La urea, que puede constituir una importante fuente de nitrógeno para las cianobacterias dada su alta concentración en medios naturales, es incorporada al interior celular de forma activa (Healey, 1977).

Aunque los aminoácidos no son tan buenas fuentes de nitrógeno como el nitrato, el amonio o la urea, también pueden ser incorporados en algunas especies de cianobacterias. Por ejemplo, el transporte de arginina se lleva a cabo en *Anabaena* 7120 por medio de un sistema específico para aminoácidos básicos (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990; Herrero y Flores, 1990). La glutamina es transportada en esta misma cianobacteria por un sistema de alta afinidad capaz de transportar también aminoácidos neutros y glutamato (Rowell *et al.*, 1977; Chapman y Meeks, 1983; Flores y Muro-Pastor, 1988).

La reducción del nitrato hasta amonio se lleva a cabo mediante la acción secuencial de la nitrato reductasa y la nitrito reductasa (Manzano *et al.*, 1976; Candau, 1979; Guerrero *et al.*, 1981). En la cianobacteria unicelular *Synechococcus* 7942 (Luque *et al.*, 1992; Omata *et al.*, 1993), así como en la filamentosa *Anabaena* 7120 (Frías *et al.*, 1997), los genes estructurales implicados tanto en la reducción del nitrato a amonio como en el transporte del nitrato, se encuentran formando una misma unidad transcripcional, el operón *nirAnrtABCDnarB*.

En las cianobacterias fijadoras de dinitrógeno, éste es reducido hasta amonio mediante el complejo enzimático nitrogenasa. Dicho complejo es irreversiblemente inactivado por el O₂, por lo que estos organismos han desarrollado diversas estrategias para proteger la maquinaria de fijación de nitrógeno molecular. Una de ellas es el desarrollo de células especializadas, denominadas heterocistos, que poseen una serie de modificaciones que permiten crear un ambiente anaeróbico. En otros casos, la fijación de dinitrógeno es temporalmente separada de la producción fotosintética de O₂, por lo que la actividad nitrogenasa se da en oscuridad (Mullineaux *et al.*, 1981). El complejo enzimático nitrogenasa consta de dos componentes proteicos distintos: la dinitrogenasa (proteína Mo-Fe) y la dinitrogenasa-reductasa (proteína Fe). A su vez, la proteína Mo-Fe es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ que une 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 proteína Fe está formada por un dímero de idénticas subunidades, codificadas por el gen *nifH*, y que une un centro [4Fe-4S] (Wolk *et al.*, 1994). La reducción de N₂ a amonio catalizada por la nitrogenasa es reacción altamente endergónica que requiere electrones y energía metabólica en forma de ATP. Este ATP puede ser producido por fotofosforilación cíclica o por fosforilación oxidativa (Böhme, 1998). Es posible que el NADPH pueda funcionar como donador de electrones a 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 a la nitrogenasa (Böhme y Haselkorn, 1988; Schrautemeier y Böhme, 1985 y 1992).

El amonio es incorporado a los esqueletos carbonados principalmente por la acción secuencial de dos enzimas: la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT), en el denominado ciclo GS-GOGAT (Figura 2) (Wolk *et al.*, 1976; Thomas *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1977; Meeks *et al.*, 1978). En algunas cianobacterias existe una ruta alternativa de asimilación de amonio mediante la glutamato deshidrogenasa (GDH), enzima dependiente de NADH o NADPH y que lleva a cabo la síntesis de glutamato a partir de amonio y 2-oxoglutarato (Neilson y Doudoroff, 1973; Reitzer y Magasanik, 1987). Existen cianobacterias con una o dos GDH (Neilson y Doudoroff, 1973) y en *Synechocystis* 6803 han sido caracterizadas una NAD-GDH y una NADP-GDH (Florencio *et al.*, 1987; Chavez y Candau, 1991). Dada la baja afinidad que presenta esta

enzima por el amonio, sólo se le ha atribuido una función de síntesis de glutamato en altas concentraciones de amonio (Reitzer y Magasanik, 1987), aunque en *Synechocystis* 6803 también podría conferir alguna ventaja selectiva cuando las células se encuentran en condiciones estacionarias de crecimiento (Chavez *et al.*, 1999).

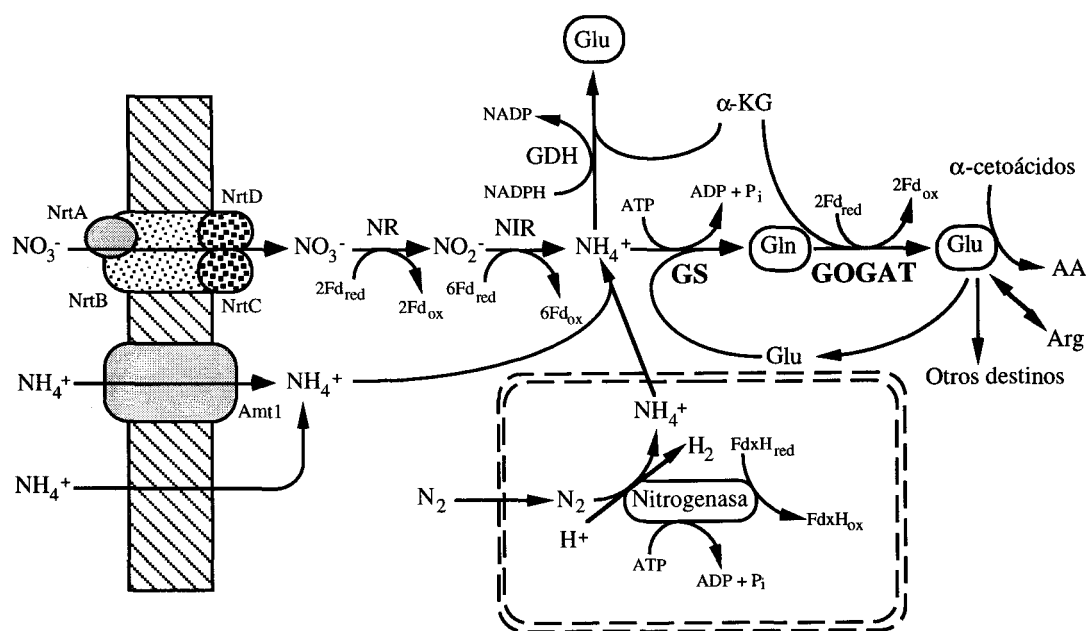


Figura 2. Ruta de asimilación del nitrato y del amonio en cianobacterias.

La glutamato sintasa de cianobacterias utiliza como donador de electrones ferredoxina reducida en lugar de piridín nucleótidos, característica que la hace más similar a la GOGAT de plantas que a la de otras bacterias (Lea y Miñán, 1975). En cianobacterias, la GOGAT ha sido purificada y caracterizada en *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992) y en *Synechocystis* 6803, donde además de la GOGAT dependiente de ferredoxina se ha encontrado otra que utiliza NADH (Navarro *et al.*, 1995; Martín-Figueroa *et al.*, sin publicar).

La GS de cianobacterias es una típica GSI procariótica, que presenta una estructura dodecamérica y un requerimiento de cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) para su actividad. La GSI ha sido purificada y caracterizada en numerosas cianobacterias (Sampaio *et al.*, 1979; Stacey *et al.*, 1977; Stacey *et al.*, 1979; Blanco *et al.*, 1989; Orr *et al.*, 1981; Florencio y Ramos, 1985; Mérida *et al.*, 1990). Sin embargo, en algunas cianobacterias también ha sido descrita la presencia de una GS tipo III (Reyes y Florencio, 1994), con características estructurales diferentes y que serán discutidas en el siguiente apartado. En *Synechocystis* 6803 existen ambos tipos de GS, la GSI, que aporta más del 90 % de

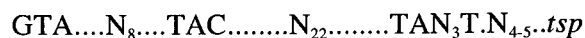
actividad GS de la célula, y la GSIII, que se expresa principalmente en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Reyes y Florencio, 1994).

La adición de amonio a cultivos de diversas cianobacterias que utilizan nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, provoca un lento descenso de la actividad GS, que puede llegar a ser del 50 % a las 10-20 h de la adición, probablemente debido a la represión que provoca el amonio en la síntesis de la enzima (Rowell *et al.*, 1979; Thuli y Thomas, 1981; Orr y Haselkorn, 1982). Sin embargo, en la cianobacteria *Synechocystis* 6803, esta disminución de la actividad GS debida a la adición de amonio es mucho más rápida y fuerte, alcanzándose un 10 % de la actividad inicial a los 20-30 min de la adición (Mérida *et al.*, 1991). La eliminación del amonio en el medio de cultivo provoca una rápida reactivación de la GS. En *Synechococcus* 6301 (Marqués *et al.*, 1992) y en *Synechocystis* 6803 (Reyes *et al.*, 1995) también ha sido descrita una inactivación de la GS mediada por oscuridad. La GS de *Synechocystis* 6803 inactivada tanto por amonio como por oscuridad puede ser reactivada *in vitro* por distintos tratamientos, como el aumento de la fuerza iónica o del pH del tampón, o también por incubación con fosfatasa alcalina pero no con fosfodiesterasa (Mérida *et al.*, 1991; Reyes *et al.*, 1995). Estos resultados sugieren una modificación no covalente de la enzima y descartan modificaciones del tipo de la adenilación como la que se da en la GS de *Escherichia coli*. Por otra parte, no se ha descrito regulación por adenilación para ninguna GS cianobacteriana (Rowell *et al.*, 1977; Stacey *et al.*, 1979; Fisher *et al.*, 1981).

El gen estructural de la GSI, *glnA*, ha sido clonado en numerosas cianobacterias, tanto filamentosas como unicelulares (Fisher *et al.*, 1981; Elmorjani *et al.*, 1992; Ricardi *et al.*, 1985; Wagner *et al.*, 1993; Mérida *et al.*, 1992), mientras que el de la GSIII tan sólo ha sido clonado en *Synechocystis* 6803 (Reyes y Florencio, 1994). La regulación de la expresión del gen *glnA* ha sido también estudiada en algunas especies. En *Anabaena* 7120, *Calothrix* 7601 y *Synechococcus* 7002, la transcripción del gen *glnA* puede darse a partir de diferentes promotores dependiendo de la fuente de nitrógeno, siendo la expresión máxima en condiciones de estrés de nitrógeno (Tumer *et al.*, 1983; Elmorjani *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1993; Cohen-Kupiec *et al.*, 1993; Luque *et al.*, 1994). En *Synechocystis* 6803, un único promotor controla la transcripción del gen *glnA*, que también se induce en ausencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo (Reyes *et al.*, 1997). En esta misma cianobacteria, la expresión del gen *glnN* sufre un aumento de 100 veces cuando se somete a deficiencia de nitrógeno (Reyes *et al.*, 1997).

La obtención de mutantes pleiotrópicos de *Synechococcus* 7942, afectados en la inducción de varias de las proteínas implicadas en la asimilación del nitrato, como la nitrato reductasa, la nitrito reductasa y los sistemas de transporte de nitrato y de amonio, además de en los niveles de proteína GS, sugirió la existencia de un activador transcripcional requerido para la completa expresión de las proteínas sujetas a regulación por amonio (Vega-Palas *et al.*, 1990). La clonación del gen que codifica este activador transcripcional, *ntcA*, fue llevada a cabo por complementación de dichos mutantes y, su

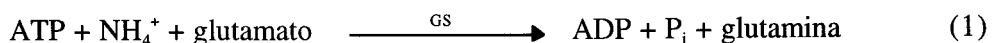
producto, NtcA, resultó ser una proteína perteneciente a la familia de los activadores transcripcionales CRP y FNR de *E. coli* (Vega-Palas *et al.*, 1992). NtcA ha sido identificada también en otras cianobacterias, como *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 (Frías *et al.*, 1993). La interacción de NtcA con el DNA ha sido demostrada en los promotores de los genes *nirA*, *glnA* y del propio *ntcA* de *Synechococcus* (Luque *et al.*, 1994) y de los genes *glnA*, *icd* y *glnB* de *Synechocystis* 6803 (Reyes *et al.*, 1997; García-Domínguez y Florencio, 1997; Muro-Pastor *et al.*, 1996). La estructura consenso para los promotores que requieren NtcA consiste en una caja -10 similar a la de *E. coli*, pero en lugar de la caja -35 aparece una secuencia palindrómica, a la cual se une NtcA:



En cianobacterias se ha identificado una proteína homóloga a la P_{II} de otras bacterias Gram (-), codificada por el gen *glnB* (Tsironemas *et al.*, 1991; García-Domínguez y Florencio, 1997), que en *Synechococcus* 7942 es fosforilada en respuesta a cambios en la fuente de nitrógeno y también a las condiciones de iluminación (Forchhammer y Tandeau de Marsac, 1994).

1.2. LA GLUTAMINA SINTETASA.

La glutamina sintetasa (glutamato:amonio ligasa, EC 6.3.1.2) es una enzima ampliamente distribuida en microorganismos, animales y plantas superiores, que cataliza la formación de glutamina a partir de glutamato y amonio, requiriendo ATP y la presencia de cationes divalentes (Mg^{2+} y Mn^{2+}) en la denominada reacción biosintética (reacción 1; Stadtman y Ginsburg, 1974). Esta enzima desempeña un papel de suma importancia en el metabolismo intermediario de los aminoácidos, ya que la glutamina funciona como donador de grupos amino en muchas reacciones biosintéticas, además de ser la fuente de nitrógeno preferida en las reacciones de biosíntesis de purinas, pirimidinas, azúcares aminados y NAD (Prusiner y Stadtman, 1973).



1.2.1. Características generales de la enzima.

La glutamina sintetasa es una enzima estructuralmente compleja, que posee un peso molecular de 350.000 a 600.000 Da, según las especies. La glutamina sintetasa de procariotas, GSI, está compuesta por 12 subunidades idénticas de aproximadamente 50 kDa, dispuestas en dos anillos hexaméricos superpuestos (Stadtman y Ginsburg, 1974), mientras que la GS eucariótica, GSII, consta de 8 subunidades de aproximadamente 40 kDa, dispuestas en los vértices de un tetraedro (Meister, 1974). En algunas especies de los

géneros bacterianos *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Frankia*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* y *Streptomyces*, ha sido también descrita la presencia de la GSII (Carlson y Chelm, 1986; De Bruijn *et al.*, 1989; Edmans *et al.*, 1987; Espin *et al.*, 1990; Rossbach *et al.*, 1988; Behrmann *et al.*, 1990; Chiurazzi *et al.*, 1992; Shatters *et al.*, 1993), aunque en ningún caso se ha detectado GSI en eucariotas.

Además de estos dos tipos de GS, ha sido descrita en un miembro de la familia *Bacteroidaceae* (*Bacteroides fragilis*), en dos miembros de la familia *Clostridiaceae* (*Butyrivibrio fibrisolvens* y *Ruminococcus flavefaciens*) y en algunas especies de cianobacterias, la existencia de un tercer tipo de GS, la GSIII, que difiere de las anteriores en el número y tamaño de las subunidades (Southern *et al.*, 1986; Hill *et al.*, 1989; Southern *et al.*, 1987; Goodman y Woods, 1993; Reyes y Florencio, 1994; García-Domínguez *et al.*, 1997). La estructura de la GS tipo III es hexamérica, con un tamaño de cada subunidad de aproximadamente 75 kDa (Southern *et al.*, 1986; Southern *et al.*, 1987; García-Domínguez *et al.*, 1997).

La GSI de enterobacterias es, con diferencia, la que ha sido más exhaustivamente estudiada, en especial la de *E. coli* y *S. typhimurium*. La estructura cristalográfica de la GS de *S. typhimurium* a 3,5 Å de resolución fue determinada inicialmente por Almasy *et al.* (1986) y refinada posteriormente hasta una resolución de 2,8 Å, tanto para la GS de *S. typhimurium* como para la de *E. coli* (Yamashita *et al.*, 1989; Liaw *et al.*, 1993). Estos estudios cristalográficos han permitido determinar que los sitios activos de la enzima se encuentran situados en la interfase entre cada dos subunidades dentro de un mismo anillo hexamérico. Asociado al sitio activo aparecen dos cationes de Mg^{2+} o de Mn^{2+} por subunidad, que son necesarios para la actividad y estabilidad estructural de la enzima (Ginsburg y Stadtman, 1973; Liaw *et al.*, 1993c).

El mecanismo de reacción catalizado por la GSI bacteriana y la GSII eucariótica es básicamente similar (Stadtman y Ginsburg, 1974; Meek y Villafranca, 1980; Meister, 1980). El proceso de biosíntesis de glutamina conlleva la unión de los sustratos a la enzima en un orden determinado, comenzando en primer lugar el ATP, después el glutámico y por último el amonio. El papel que juegan los cationes divalentes es esencial, ya que polarizan el átomo de fósforo en la posición γ del ATP, haciéndolo más positivo y promoviendo el ataque del glutámico al ATP. Como consecuencia de este ataque se forma el intermediario γ -glutamil-fosfato, y sólo entonces se produce la unión del amonio a la GS (Figura 3) (Liaw y Eisenberg, 1994).

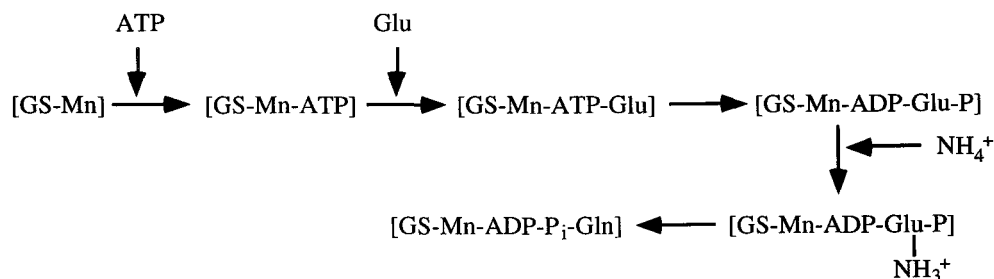
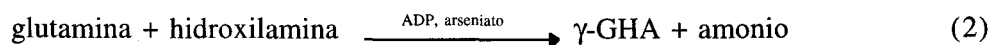


Figura 3. Esquema del proceso catalítico de la glutamina sintetasa.
Tomado de Liaw y Eisenberg (1994).

La GS es altamente selectiva para el amonio y cataliza exclusivamente la formación de glutamina en lugar de una hidrólisis aberrante del γ -glutamil-fosfato formado como intermediario durante la reacción (Clark y Villafranca, 1985). Para la formación de glutamina es necesaria la desprotonación del amonio para que la forma NH_3 pueda atacar el γ -glutamil-fosfato. Mediante el análisis de la estructura cristalográfica de la GS de *E. coli* y el empleo de la mutagénesis dirigida, se ha podido determinar que en la reacción de desprotonación del amonio son esenciales el ADP producido en la hidrólisis del ATP y el residuo altamente conservado en todas las GSs, Asp-50. Este residuo, junto con el Glu-327, ambos situados en el sitio activo, forman un “bolsillo” con carga negativa (Liaw y Eisenberg, 1994). La unión del ADP induce el movimiento del Asp-50 hacia el sitio de unión del amonio, promoviendo su unión y posterior desprotonación (Figura 4) (Alibhai y Villafranca, 1994; Liaw *et al.*, 1995). La sustitución del residuo Asp-50 de la GS de *E. coli* por alanina o glutámico provoca un aumento drástico en el valor de la K_m para el amonio, que demuestra el papel crítico que juega este residuo en la unión del amonio y posiblemente en su desprotonación (Alibhai y Villafranca, 1994). El ataque del NH_3 al γ -glutamil-fosfato origina un intermediario tetramérico para rendir finalmente glutamina y P_i .

Además de la reacción biosintética, la GS también cataliza la transferencia de un grupo γ -glutamilo de la glutamina a la hidroxilamina para formar γ -glutamilhdroxamato (γ -GHA), en la denominada reacción transferasa (reacción 2).



La reacción requiere la presencia de ATP o ADP, cationes divalentes y arseniato, que acelera la hidrólisis de glutamina (arsenolisis). Debido a la sencillez de su ensayo, la reacción transferasa de la GS es muy útil para seguir el proceso de purificación de la enzima, así como para las determinaciones rutinarias de actividad.

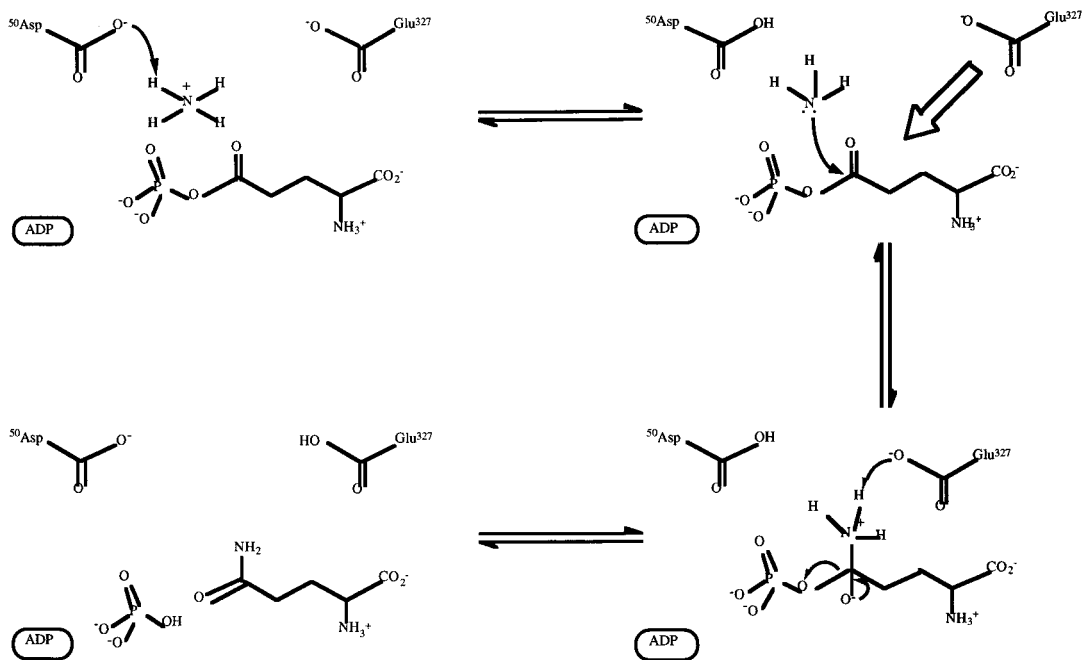


Figura 4. Mecanismo de acción de la GS después de la formación del γ -glutamyl-fosfato y de la unión del amonio.

En la figura se muestra el papel que desempeñan los residuos Asp-50 y Glu-327 de la GS de *E. coli* en el proceso de desprotonación del amonio y en la posterior formación del intermediario tetraédrico (parte inferior derecha) que se genera durante la reacción catalítica de la GS. La flecha ancha en la parte superior derecha de la figura representa el movimiento del Glu-327 hacia el γ -glutamyl-fosfato. Tomado de Alibhai y Villafranca (1994).

1.2.2. Inhibidores de la GS.

El primer compuesto que fue identificado como inhibidor de la GS fue la L-metionina sulfoximina (MSX) (Manning *et al.*, 1969; Gass y Meister, 1970), aunque su efecto como inhibidor del proceso de síntesis de glutamina fue demostrado con anterioridad (Pace y McDermott, 1952). El MSX es un compuesto análogo del glutamato que inhibe irreversiblemente la GS. Muchas de las evidencias de que el γ -glutamyl-fosfato es un intermediario en la reacción catalizada por la GS, provinieron de la investigación del mecanismo por el cual la enzima es inhibida irreversiblemente por MSX (Ronzio y Meister, 1968; Ronzio *et al.*, 1969; Rowe *et al.*, 1969; Manning *et al.*, 1969; Rowe y Meister, 1973). Tal inhibición requiere la presencia de ATP y cationes divalentes, ya que para actuar como inhibidor, el MSX debe ser fosforilado de igual forma que lo es el glutamato en la reacción biosintética de la enzima. Cuando el MSX se une a la GS, el átomo de nitrógeno del grupo sulfoximina ocupa el mismo sitio que el átomo de oxígeno del glutamato que va ser fosforilado en la reacción, ya que éste es el punto de fosforilación del MSX (Figura 5) (Rowe *et al.*, 1969). Recientemente, mediante el análisis de la estructura cristalográfica del complejo GS-MSX de *E. coli*, se ha podido determinar

con precisión la orientación de cada átomo del MSX en el sitio activo de la enzima (Liaw y Eisenberg, 1994).

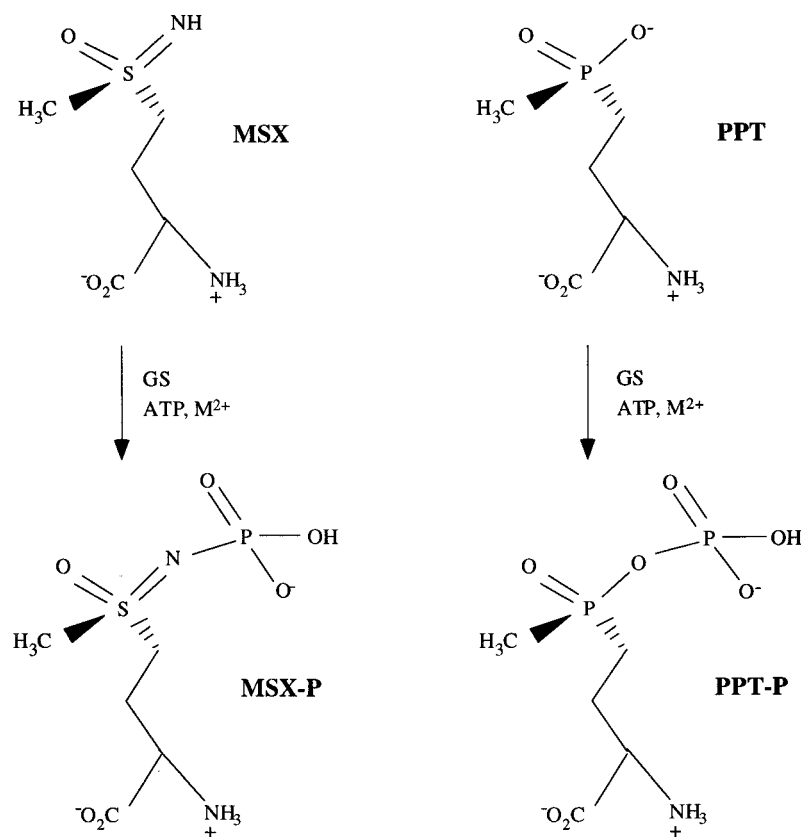


Figura 5. Reacción de fosforilación del MSX y de la PPT.

Aunque el MSX es el inhibidor de la GS más ampliamente estudiado, también se han identificado otros compuestos que pueden actuar como potentes inhibidores de la enzima. Entre ellos destaca la fosfinotricina (PPT), también análoga del glutamato y que al igual que el MSX, también es capaz de inhibir la GS tanto de procariotas como de eucariotas (Leason *et al.*, 1982; Lea *et al.*, 1984; Abell y Villafranca, 1991; Logusch *et al.*, 1989; Logusch *et al.*, 1990). Para inhibir irreversiblemente la GS, la PPT también debe ser fosforilada, por lo que es necesaria la presencia de ATP y cationes divalentes. Esta fosforilación ocurre en el grupo hidroxilo libre del fosfato (Figura 5) (Abell y Villafranca, 1991).

Algunos de los inhibidores de la GS, como el bialafos, que es un tripéptido natural producido por *Streptomyces viridochromogenes* y *S. hygroscopicus* (Bayer *et al.*, 1972) y que es metabolizado en plantas y microorganismos hasta PPT (Bayer *et al.*, 1972; Leason *et al.*, 1982), o el glufosinato, que es la forma sintetizada químicamente y

comercial de la PPT, son utilizados en la actualidad como potentes herbicidas al producir la inhibición irreversible de la GS de las plantas.

1.2.3. Regulación de la GS en procariotas.

Debido al papel central que desempeña la GS en el metabolismo del nitrógeno, dicha enzima está sometida a complejos mecanismos de regulación, tanto a nivel de actividad como de síntesis de la proteína. Sin duda, el sistema de regulación más ampliamente estudiado es el de la GS de *E. coli*. En enterobacterias, la actividad de la GS presenta un mecanismo de regulación por adenililación (Magasanik y Neidhart, 1987; Rhee *et al.*, 1989), que consiste en la adición covalente de un grupo AMP al residuo Tyr-397 de cada subunidad. Este proceso tiene lugar en condiciones de crecimiento con una fuente nitrogenada rica, como es el amonio. La adenililación de una subunidad de la GSI inactiva únicamente esa subunidad, por lo que la enzima puede existir en la célula en diferentes estados de actividad. El proceso de adenililación, así como el de deadenililación, es catalizado por la enzima adenilil transferasa (AT), producto del gen *glnE*, que presenta un dominio estructural independiente para cada una de las dos actividades (Jaggi, 1997).

La actividad de la AT está regulada por la proteína P_{II} (producto del gen *glnB*), que consiste en un trímero de 12 kDa por subunidad (Vasudevan *et al.*, 1994). La proteína P_{II} puede ser también modificada covalentemente por la adición de un grupo UMP a la Tyr-51 de cada subunidad (uridililación), y en este estado promueve la actividad deadenililante de la AT, por lo que se activa la GS (Figura 6). Esta modificación ocurre cuando los niveles de nitrógeno son bajos, mientras que si la fuente de nitrógeno en el medio es rica, la proteína P_{II} es deuridililada y esto promueve la inactivación de la GS por adenililación.

El proceso de modificación de la proteína P_{II} lo lleva a cabo la enzima uridilil transferasa (UT; producto del gen *glnD*), que está a su vez regulada alostéricamente por varios metabolitos, entre ellos la glutamina y el 2-oxoglutarato. La razón de los niveles de estos dos metabolitos depende de la disponibilidad de nitrógeno en la célula y es la que finalmente regula el proceso de activación/inactivación de la GS. De esta forma, en condiciones de exceso de amonio el nivel de glutamina aumenta y disminuye el de 2-oxoglutarato, lo cual promueve la deuridililación de la proteína P_{II} y, en consecuencia, la inactivación de la GS por adenililación. Por el contrario, cuando el amonio es limitante, el alto nivel de 2-oxoglutarato respecto al de glutamina estimula la activación de la GS. Por tanto, es la enzima UT la que sensa finalmente el estado metabólico de la célula respecto al nitrógeno y la que desencadena la modificación covalente de la GS.

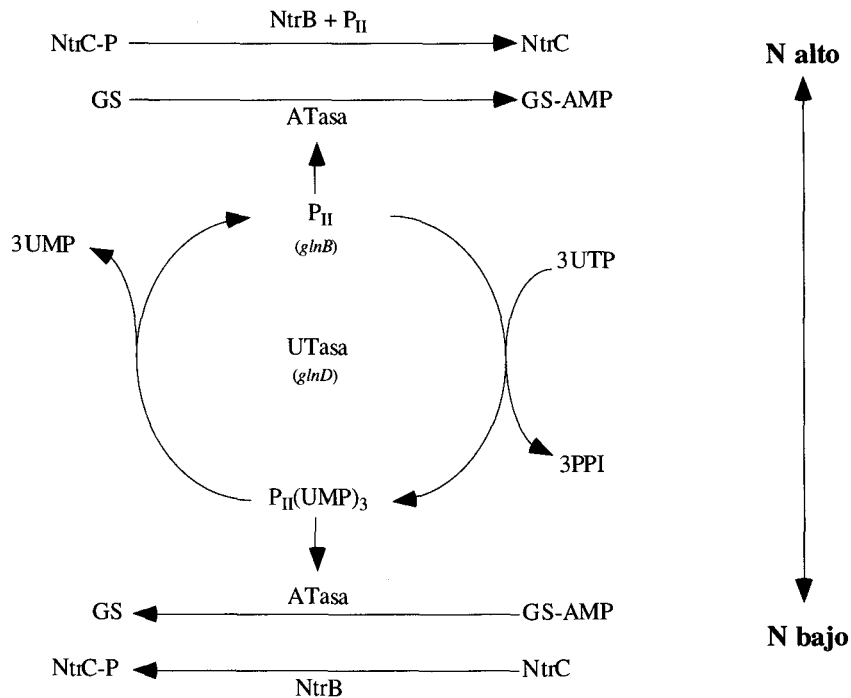


Figura 6. Modelo esquemático de la regulación de la actividad GS y NtrC en respuesta al estado nitrogenado de la célula.

Además de este complejo sistema que regula la actividad de la GS, existe un mecanismo de regulación de la transcripción del gen estructural de la GS, *glnA*, en el cual la proteína P_{II} está también implicada. El gen *glnA* se transcribe en una misma unidad transcripcional con los genes *ntrB* y *ntrC*. Los productos de estos dos genes forman un sistema de dos componentes en el que *NtrB* es el componente sensor, con actividad proteína quinasa/fosfatasa, y *NtrC* es el componente efector, susceptible de fosforilación por *NtrB*. La forma fosforilada de *NtrC* promueve la transcripción de promotores especializados, entre los cuales se incluye uno de los tres promotores que existen en el operón *glnAntrBC* y que es dependiente del factor σ^{54} . En condiciones limitantes de nitrógeno, la proteína P_{II} uridilada estimula la actividad quinasa de *NtrB*, generándose proteína *NtrC* fosforilada que promueve la transcripción del gen *glnA*.

Por tanto, en *E. coli* existen dos mecanismos que regulan tanto la actividad como la síntesis de la GS y que mantienen equilibrados los niveles de nitrógeno y carbono en la célula. Este sistema de regulación difiere bastante del que se da en cianobacterias, ya que, aunque en estos organismos no ha sido tan ampliamente estudiado, hasta el momento no se ha descrito ninguna modificación covalente de la GS del tipo de la adenilación, ni tampoco se ha conseguido demostrar con claridad un papel regulador de la proteína P_{II} de cianobacterias, aunque en *Synechococcus* 7942 se ha relacionado esta proteína con el transporte de nitrato y nitrito (Lee et al., 1998).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

2.1.1. Cianobacterias.

2.1.1.1. Estirpes de cianobacterias empleadas.

El presente trabajo se ha centrado en dos especies distintas de cianobacterias filamentosas, *Anabaena azollae* AS-DS, organismo fijador de dinitrógeno perteneciente a la sección IV de la clasificación taxonómica de las cianobacterias propuesta por Rippka *et al.* (1979), y *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, cianobacteria no formadora de heterocistos encuadrada en la sección III de la citada clasificación.

2.1.1.2. Medios y condiciones de cultivo de cianobacterias.

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento tanto de *A. azollae* como de *Pseudanabaena* 6903 están basados en el denominado BG11 (Rippka *et al.*, 1979), que consta de los siguientes componentes:

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

Para el cultivo de *Pseudanabena* 6903 se suplementó este medio con NaHCO₃ 12 mM (BG11_c). La denominación BG11_{oc} hace referencia al medio BG11_c carente de NaNO₃.

Cuando la fuente de nitrógeno era el amonio se sustituyó el NaNO_3 por NH_4Cl a una concentración de 10 mM, añadiendo entonces tampón TES-NaOH (pH 7,5) a una concentración final de 20 mM.

Cuando las células se sometieron a tratamientos de ausencia de fuente nitrogenada, tras ser cultivados en medio BG11_c se recogieron por centrifugación como se describe en el apartado 2.1.2.3, se lavaron con medio BG11_{oc} y finalmente se resuspendieron en este mismo medio.

Los medios conteniendo todos sus componentes a excepción de los antibióticos o el tampón TES-NaOH, se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 1 atm de sobrepresión y 121 °C de temperatura (Labo Autoclave, Sanyo). La adición de compuestos como aminoácidos, antibióticos o tampón TES-NaOH se realizó previa esterilización de los mismos por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con poros de 0.22 μm de diámetro (Millipore, Puerto Rico) o filtros Acrodisc (Gelman, 0.2 μm de diámetro de poro).

El crecimiento de los cultivos en medio líquido se llevó a cabo bien en condiciones de burbujeo con una mezcla aire- CO_2 en la proporción 98,5:1,5 (v/v) para la estirpe de *Pseudanabaena* 6903, o tan sólo aire en el caso de *A. azollae*, en cámaras termostatizadas a 30 °C bajo iluminación continua de 50 W.m^2 , suministrada por paneles de tubos fluorescentes de luz blanca (Sylvania daylight F20W/D o similares). Los cultivos también podían ser crecidos en matraces Erlenmeyer incubados a 100 rpm en agitadores orbitales Gallenkamp (Gran Bretaña) modelo INR.401.010W, termostatizados a 30°C y bajo condiciones de iluminación similares a las anteriormente descritas. Para la realización de experimentos fisiológicos (determinación de actividades enzimáticas, curvas de crecimiento y extracciones 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, o para los experimentos de transformación genética, se emplearon cultivos en matraces.

La preparación de medio de cultivo sólido se realizó mediante la adición de agar al 1% (p/v). El agar (Bacto-Agar Difco) se esterilizó por autoclavado, como se describió anteriormente, de forma separada del resto del medio de cultivo. Una vez mezclados todos los componentes el medio se vertió en cajas de Petri a razón de 30-40 ml por caja. El crecimiento de cianobacterias en medio sólido se dió bajo las mismas condiciones de iluminación y temperatura que las descritas para los cultivos líquidos.

2.1.2. *Escherichia coli*.

2.1.2.1. Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas.

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y sus genotipos se recogen en la Tabla 1:

TABLA 1. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Características	Referencia
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> <i>DlacU169</i> (f80d- <i>lacZDM15</i>)	Hanahan, 1983
MC1061	<i>hsdR</i> , <i>mcrB</i> , <i>araD139</i> , D(<i>araABC-leu</i>)7679, <i>DlacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> <i>rpsL</i> , <i>thi</i>	Meissner <i>et al.</i> , 1987
ET6017	<i>araD139</i> , Δ (<i>argF-lac</i>)205, <i>flbB5301</i> , <i>pstF25</i> , <i>relA1</i> , <i>rspL150</i> , Δ (<i>glnG-A</i> or, <i>glnL-A</i>)229, <i>rha-10</i> , <i>deoC1</i>	Genetic Stock Center, Yale University
HB101	<i>supE44</i> , <i>hsdS20</i> , (r ⁻ m ⁻) <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>mcrB</i>	Boller y Roulland-Dussoix, 1969
BMH71-18 <i>mutS</i>	<i>thi</i> , <i>supE</i> , Δ (<i>hsdMS-mcrB</i>), Δ (<i>lac-proAB</i>) [<i>mutS</i> ::Tn10] F' [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15]	"U.S.E. mutagenesis kit", Pharmacia (Suecia)
ED8654	<i>lac-3</i> o <i>lacY1</i> , <i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>hsdR514</i> , (rk ⁻ mk ⁻) <i>recA56</i> , <i>mcrA1</i> , <i>metB1</i> , <i>lacY</i> , <i>galK12</i> , <i>galT22</i> , <i>trpR55</i>	Murray <i>et al.</i> , 1977

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

Como medio habitual de crecimiento para los cultivos líquidos o en medio sólido de *E. coli* se utilizó 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 añadió agar a una concentración final del 1,5% (p/v). El medio completo se esterilizó en autoclave como ya se ha descrito.

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

Bactotripton	20 g/l
Extracto de levadura	5 g/l

NaCl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
KCl	2,5 mM

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

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

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	13 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
NaCl	0,5 g/l
NH ₄ Cl	1 g/l
CaCl ₂	0,1 mM
MgSO ₄	1 mM
vitamina B ₁	1 mg/l

Como fuente de carbono se utilizó glucosa a una concentración final de 0,02 % (p/v). Tanto la glucosa, el MgSO₄, el CaCl₂ como la vitamina B₁ se añadían al resto de los componentes de forma separada previa esterilización de los mismos en autoclave, a excepción de la vitamina B₁ que se esterilizaba por filtración. El medio mínimo M9 en forma sólida se preparó añadiendo agar a una concentración final del 1,5% y era esterilizado termobáricamente de forma separada del resto de los componentes.

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

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

Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo a 37 °C en tubos o matraces Erlenmeyer de volumen quintuple al del cultivo y con agitación orbital continua a 200 rpm en aparatos Sorvall RC5C (Du Pont, EE.UU.). Los cultivos en medio sólido se crecieron en placas de Petri a 37 °C.

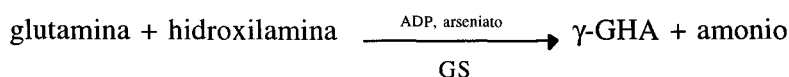
2.1.2.3. Métodos de recogida de células.

Los cultivos líquidos se recogían por centrifugación tanto en microcentrífugas Eppendorf (12000 x g, 5 min), en centrífuga de mesa Heraeus (2500 x g, 5 min), como en centrífuga refrigerada Sorvall (EE.UU.) modelos RC2-B y RC5-C (7000 x g, 10 min) en función del volumen del cultivo.

2.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA.

2.2.1. Ensayo transferasa de la actividad glutamina sintetasa.

La actividad transferasa de la GS se midió según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970). Además de la síntesis de glutamina, la GS es capaz de catalizar la siguiente reacción con la producción de γ -glutamilhidroxamato (γ -GHA):



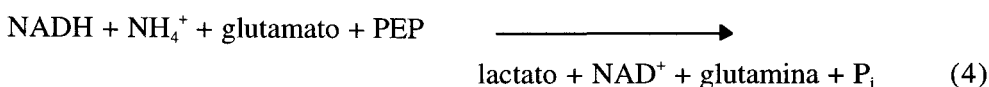
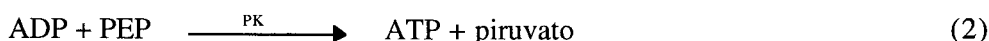
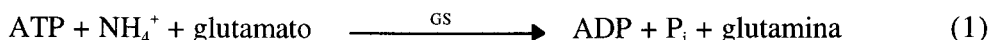
Para el ensayo *in situ*, un volumen adecuado de células (el equivalente a 5-10 μg de clorofila en el caso de cianobacterias o, para *E. coli*, volúmenes menores de 1 ml de cultivo en fase estacionaria) se centrifugó a 12000 x g durante 1 min en centrífuga Eppendorf a temperatura ambiente. El precipitado de células se resuspendió en 0,8 ml de una mezcla de ensayo que contenía tampón HEPES-NaOH 66,7 mM (pH 7,0), L-glutamina 40 mM, MnCl_2 4 mM y ADP 0,5 mM. A esta suspensión se le añadieron 100 μl de una mezcla recién preparada de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M en proporción 1:1 (v/v) y 20 ml de una solución de MTA al 1,25 % (p/v) en agua, para permeabilizar las células. Después de agitar vigorosamente durante 10 s, la reacción se inició por adición de 50 μl de una solución 0,4 M de Na_2HAsO_4 . Como blanco de la reacción se empleaba un ensayo en paralelo que contenía todos los componentes a excepción del arseniato. La mezcla de reacción se incubó durante 5-10 min a 30 °C. La reacción se paró por adición de 2 ml de una disolución de FeCl_3 en medio ácido (ver apartado 2.7.3), que revelaba el γ -GHA producido durante la reacción de la GS. En el caso de los ensayos *in vitro*, el procedimiento que se siguió era el mismo salvo que no era necesaria la adición de MTA.

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

2.2.2. Ensayo acoplado de la actividad glutamina sintetasa.

El ensayo acoplado de la GS se llevó a cabo según se describe en Shapiro y Stadtman (1970). En dicho ensayo, el ADP producido durante la síntesis de glutamina (reacción 1) es convertido en ATP a partir de PEP mediante la acción de la piruvato

quinasa (PK), con la producción de piruvato (reacción 2). Posteriormente, la lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la reducción de piruvato a lactato con la oxidación consiguiente de NADH (reacción 3). La reacción global (4) puede ser seguida mediante el cambio de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADH.



El ensayo se realizó en cubetas de espectrofotómetro de 1,5 ml en un volumen final de reacción de 1 ml. La mezcla de ensayo estandar contenía los siguientes componentes: tampón HEPES-NaOH 50 mM, MgCl₂ 50 mM, KCl 10 mM, NH₄Cl 40 mM, L-glutamato 50 mM, NADH 0,35 mM, PEP 1 mM y ATP 7,6 mM. A continuación se añadía PK y LDH en exceso (10 y 25 µg, respectivamente), se homogeneizaba la reacción y se equilibraba a 30 °C durante 1-5 min. En este tiempo se consumían las trazas de ADP y piruvato que pudieran existir en la mezcla, registrándose un cambio mínimo en los valores de absorbancia. Una vez estabilizada la reacción se añadía GS en un pequeño volumen (5-25 µl) y se seguía el cambio de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-40 modelo UV-160A, que permitía calcular la velocidad de la reacción. Como se muestra en la reacción (4), existe una relación estequiométrica entre la síntesis de glutamina y la oxidación de NADH, por lo que se puede calcular la actividad GS mediante el uso del coeficiente de extinción molar del NADH (6,2 10³ l mol⁻¹ cm⁻¹).

2.2.3. Inactivación *in vitro* de la GS de *A. azollae* con MSX y PPT. Cálculo de las constantes de inhibición (K_i).

La inactivación *in vitro* de la GS con los inhibidores competitivos MSX y PPT se llevó a cabo con muestras purificadas de la proteína silvestre y con los distintos mutantes dirigidos incubando alícuotas del enzima en tampón HEPES 50 mM (pH 7,5) conteniendo MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM y MSX o PPT a concentraciones adecuadas en cada caso. Tras incubar 30 min a temperatura ambiente, se ensayó la actividad biosintética o transferasa de las muestras según fuese necesaria una u otra, según se describe en 2.2.1 y 2.2.2.

La determinación de las K_i , tanto de la GS silvestre como de los mutantes dirigidos para el MSX y la PPT, se realizó según se describe en Logusch *et al.* (1990) mediante el método de Dixon, en el cual se representa la velocidad de la reacción de la GS frente a un rango de concentración de inhibidor en presencia de diferentes concentraciones fijas de sustrato. Los valores de K_i se obtuvieron calculando el punto de intersección de las rectas obtenidas en las representaciones gráficas.

2.3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.3.1. Preparación de extractos celulares

Los extractos crudos de células tanto de *E. coli* como de cianobacterias se llevaron a cabo siguiendo dos procedimientos, en función de la cantidad de extracto necesario y del volumen del cultivo.

2.3.1.1. Rotura por ultrasonidos.

Este método se utilizó para la preparación de extractos de volumen superior a 1 ml y en el caso de las purificaciones. Una vez recogidas las células por centrifugación, se resuspendieron en el tampón correspondiente a cada caso a razón de 5 ml/g de células, suplementado con PMSF a una concentración final de 1 mM (a partir de una solución concentrada 100 mM en isopropanol) y a continuación se sometían a un tratamiento con ultrasonidos durante 4 períodos de 30 s alternados con ciclos de 1 min, en los que cesó el tratamiento con objeto de evitar un excesivo calentamiento. 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 centrifugó durante 15 min a 18.000 x g. El sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo libre de células.

2.3.1.2. Rotura con perlas de vidrio.

Este procedimiento se utilizó cuando se requerían pequeñas cantidades de extracto con objeto de someter las muestras a electroforesis o para determinar actividades enzimáticas. Para ello, volúmenes de 1 ó 2 ml de cultivo se centrifugaron en tubos eppendorf y el precipitado celular se lavó con 200 μ l del tampón deseado en cada caso. Tras volver a centrifugar se resuspendió entre 100 y 500 μ l del mismo tampón suplementado con 1 mM de PMSF, según la cantidad de células. A esta suspensión se le añadió una cantidad equivalente a 50 μ l de perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro) Sigma (EE.UU.) por cada 100 μ l de tampón.

A continuación las células se rompían mediante agitación vigorosa en agitador automático durante un período de tiempo que variaba en función del organismo. En el caso de *E. coli*, para la lisis celular tan sólo eran necesarios dos períodos consecutivos de 15 s de agitación, alternados con períodos de 30 s en hielo. Sin embargo, para obtener extractos crudos de cianobacterias, la suspensión celular se sometía a 4 períodos de 30 s, alternados con otros tantos de 1 min en hielo. Una vez concluido el tratamiento de rotura, los restos celulares se eliminaban por centrifugación durante 10 min a 12.000 x g y 4 °C, constituyendo el sobrenadante el extracto crudo de células.

2.3.2. Técnicas cromatográficas

2.3.2.1. Cromatografía de intercambio iónico.

Se empleó DEAE-celulosa microgranular (Sigma, EE.UU.) equilibrada inicialmente en tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 7,5) y reequilibrada posteriormente en la columna con el tampón adecuado. La columna utilizada fue de vidrio, BioRad (EE.UU.) modelo Econo-Column, conteniendo un lecho de 1,5 cm de diámetro y empaquetada hasta los 15 cm de altura. Antes del montaje de la columna, los gases disueltos en la suspensión de DEAE-celulosa se eliminaron mediante vacío. El flujo de aplicación de las muestras y el de los solventes de lavado y elución se reguló por medio de bombas peristálticas LKB tipo Perpex 10.200. Las fracciones del eluato se recogieron automáticamente con un colector Pharmacia modelo Frac-100 (Suecia).

2.3.2.2. Cromatografía de afinidad en Blue-Sefarosa.

La cromatografía en Blue-Sefarosa se llevó a cabo en el mismo tipo de columna que se describe en el apartado anterior. La matriz fue preparada según las instrucciones del fabricante (Sigma, EE.UU.) y se equilibró en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5). Las condiciones generales de cromatografía fueron igualmente las descritas para la cromatografía de intercambio iónico.

2.3.3. Precipitación mediante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

La precipitación de proteínas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se empleó como un paso de purificación de la GS (apartado 3.4.1.1) y también para eliminar ADP de las muestras en el transcurso de la purificación (apartado 3.4.2). Para ello se añadía $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al porcentaje adecuado en cada caso con agitación suave. Una vez disuelto, la muestra se dejaba en reposo 15 min y posteriormente se centrifugaba a 12.000 x g otros 15 min.

2.3.4. Electroforesis de proteínas

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

Las separaciones analíticas mediante electroforesis en placa se realizaron en geles de poliacrilamida al 12 % (p/v) de acrilamida basados en el sistema de Laemmli (1970) en geles discontinuos (Jovin *et al.*, 1964), en aparatos Mini-Protean II de BioRad (EE.UU.) o Vertical Slab Gel Electrophoresis Units modelos SE250 y SE600 de Hoeffler Scientific Instruments (EE.UU.). El gel de separación, el de concentración y el tampón de electroforesis contenían dodecil sulfato sódico al 0,1 %. 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 % (p/v), 2-mercaptoetanol al 10 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,0025 % (p/v), 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.

2.3.4.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizante.

La electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturalizantes se realizó en geles de poliacrilamida al 6,25 % (p/v) de acrilamida utilizando un aparato Vertical Slab Gel Electrophoresis Units modelo SE250. Los geles contenían tampón Tris-HCl 0,375 M, (pH 8,8), acrilamida/bisacrilamida (29:0,8) al 6,25 % (p/v), persulfato de amonio al 0,05 % (p/v) y TEMED al 0,001 % (v/v). Una vez polimerizados, los geles se recubren con una pequeña capa de 1-2 cm de altura de gel de empaquetamiento conteniendo 4 % (p/v) de acrilamida en Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8) y polimerizado con persulfato de amonio y TEMED a las mismas concentraciones que las empleadas en el gel de separación. Para la aplicación de las muestras se empleaba glicerol a una concentración final del 10 % (v/v) y como marcador del frente de electroforesis, azul de bromofenol al 0,001 % (p/v). A continuación se sometían a una diferencia de potencial eléctrico de 200 V hasta que el colorante alcanzó el extremo inferior de la placa. El tampón de electrodo usado fue Tris 25 mM/glicina 192 mM (pH 8,3) y la electroforesis se desarrolló en una cámara refrigerada a 4 °C.

2.3.4.3. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

La visualización de las proteínas se conseguía sumergiendo los geles de poliacrilamida durante 15 min en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,1 % (p/v), ácido acético al 10 % (v/v) y metanol al 40 % (v/v) en agua. Posteriormente, los geles se lavaban 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 se visualizaban

como bandas de color azul. Los geles se conservaban en ácido acético al 10 % (v/v) en agua.

2.3.4.4. Detección de la actividad transferasa de la GS en geles de poliacrilamida.

La actividad transferasa de la GS se detectó en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes sumergiendo el gel en 8 ml de la mezcla de ensayo descrita en el apartado 2.2.1, 1 ml de la solución de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M en proporción 1:1 y 500 μ l de solución 0,4 M de Na₂HAsO₄. El gel se incubaba 20 min a 30 °C y transcurrido este tiempo se retiraba la solución y se revelaba el γ -GHA al añadir FeCl₃ en medio ácido (ver apartado 2.7.3.). La señal que se observaba era sumamente inestable por lo que había que registrar la imagen del gel de forma rápida antes de la total desaparición de las bandas.

2.3.4.5. Detección de la actividad biosintética de la GS en geles de poliacrilamida.

Tras someter muestras purificadas de la GS silvestre y mutantes a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, la actividad biosintética se detectó *in situ* sumergiendo el gel en una solución de tampón HEPES 50 mM (pH 7,5) que contenía: MgCl₂ 50 mM, NH₄Cl 40 mM y L-glutámico 50 mM. La reacción biosintética se disparó al añadir ATP a una concentración final de 7,6 mM y se incubó 20-30 min a 30 °C. La detección de la actividad se realizó visualizando el P_i producido como consecuencia de la hidrólisis del ATP durante la reacción biosintética de la GS. Una vez transcurrido el ensayo biosintético, la detección del P_i se llevó a cabo incubando el gel en una solución con tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 2 ml de molibdato amónico al 0,43 % en sulfúrico (Sigma, EE.UU.) y 0,5 ml de reactivo de Fiske y SubbaRow (Sigma, EE.UU.) en un volumen final de 10 ml. Al cabo de 5-10 min se observaba una banda de color azul en torno a la proteína GS debida al P_i producido y que era tanto más azul cuanto mayor era la actividad de la enzima. Al contrario de lo que sucedía con el ensayo *in situ* de la actividad transferasa, la señal producida por el P_i era estable, lo cual permitía un mejor registro de la imagen.

2.3.5. Técnicas inmunológicas: Detección de GS en geles de acrilamida mediante Western blot.

La GS tipo I o tipo III de muestras sometidas a electroforesis se detectaron mediante inmunorreacción con anticuerpos policlonales mono-específicos anti-GS tipo I de la cianobacteria *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Marqués *et al.*, 1991) o con suero anti-GS tipo III de la cianobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (García-Domínguez *et al.*, 1997). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transferían a membranas de

nitrocelulosa BioRad (EE.UU.) de 0,45 μm de poro en un aparato Nova Blot de Pharmacia (Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora a una intensidad constante (0,8 mA/cm^2 de superficie a transferir) y utilizando como tampón de electroforesis una solución de Tris (5,89 g/l), glicina (2,93 g/l), SDS (0,375 g/l) y metanol al 20 % (v/v). A continuación la membrana se incubó durante 1 hora en una solución bloqueante preparada con leche en polvo desnatada Molico-Sveltesse de Nestlé (España) al 5 % (p/v) en tampón TBS (Tris-HCl 15 mM (pH 7,4) y NaCl 0,2 M). Posteriormente la membrana se incubó con el antisuero anti-GS (tipo I o tipo III) diluido (1:5000) en solución de bloqueo durante al menos 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Tras lavar la membrana 4 veces, con 15 min en cada lavado, en tampón TBS suplementado con Tween 20 (Sigma, EE.UU.) al 0,05 % (v/v), se incubó la misma con una solución de anticuerpos (inmunoglobulina G) de oveja anti-inmunoglobulina G de conejo, conjugados con peroxidasa de rábano (Sigma, EE.UU.), diluidos (1:2000) en solución de lavado, durante 45 min a temperatura ambiente y agitación constante. Tras repetir el proceso de lavado descrito anteriormente, se reveló la actividad peroxidasa mediante el sistema de detección ECL de Amersham Life Science, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.3.6. Concentración de proteínas por ultrafiltración.

La concentración de proteínas se realizó por ultrafiltración, centrifugando a 4500 x g y 4 °C con microconcentradores Microsep 30 K suministrados por Filtrón (EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó un rotor SS34 en una centrifuga refrigerada RC5C Sorvall (EE.UU.).

2.3.7. Cambio de tampón y eliminación de sales y moléculas pequeñas de preparaciones de proteínas y DNA.

En los casos en los que se requería cambiar el tampón o bien eliminar las sales contenidas en un volumen pequeño de muestra (100-500 μl), se empleó una filtración forzada a través de Sephadex G-25 o G-50, siguiendo el método de Orly y Selinger descrito por Penefsky (1977). Para ello, jeringas de plástico de 1 ó 2 ml, o bien pequeñas columnitas de plástico, se llenaron con Sephadex G-25 o G-50 hinchado y se equilibraron con dos volúmenes del tampón en el que se deseaba dejar la muestra. Las columnas se centrifugaron 2 min a 1100 x g para eliminar el exceso de tampón, tras lo cual se aplicó la muestra (inferior a un décimo del volumen de lecho) y se centrifugó durante 4 min a 1100 x g, recogándose en un tubo de centrífuga.

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

2.4.1. Plásmidos utilizados.

En la Tabla 2 se relacionan los plásmidos utilizados no construidos en este trabajo, así como sus características mas notables. El plásmido pRL161 se utilizó como soporte génico del fragmento C.K.1 (según nomenclatura de Elhai y Wolk, 1988). El fragmento C.K.1, de 1,3 kb contiene el gen *npt* (Km^R) de Tn5 (Fragmento *HindIII-AvaI* de Tn5). El plásmido pBluescript II SK(+) (en adelante denominado pBS) fue el vector utilizado en todas las clonaciones estándar, salvo cuando se indica. En la Tabla 3 se relacionan los plásmidos construidos en este trabajo.

TABLA 2. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo.

Plásmido	Características	Referencias
pBluescript II SK (+)	Ap ^r , <i>oriF1 colE1ori</i> , <i>lacZ</i>	Stratagene
pUC19	Ap ^r , <i>oriF1 colE1ori</i> , <i>lacZ</i>	Stratagene
pRL161	Ap ^r , Km ^r , C.K1 (<i>npt</i> de Tn5), derivado de pBR322	Elhai y Wolk, 1988
pRL277	Sm ^r , Sp ^r , vector para la selección positiva de dobles recombinantes en <i>Anabaena</i> , <i>sacB</i> (<i>B. subtilis</i>)	Black <i>et al.</i> , 1993
pRL443	Ap ^r , Tc ^r , mutante espontáneo de RP4, plásmido conjugativo de amplio espectro capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1.	Datta <i>et al.</i> , 1971
pRL528	Cm ^r , derivado de ColK portador de <i>mob</i> y genes de metilasas de sitios <i>AvaI</i> y <i>Eco47II</i> (isoesquizómero de <i>AvaII</i>)	Elhai y Wolk, 1988b

2.4.2. Aislamiento y análisis de DNA.

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

El aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se realizó mediante el método de la lisis alcalina, descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979). Dicho método consiste en la lisis de las células en presencia de SDS y NaOH, seguida de la eliminación del DNA cromosómico y proteínas mediante precipitación con acetato potásico y centrifugación. Este procedimiento se llevó a cabo según se describe en Sambrook *et al.*

(1989). Las preparaciones se sometían a extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) para reducir el contenido proteico de las mismas.

TABLA 3. Plásmidos construidos en este trabajo.

Plásmido	Características
pJL1	Fragmento <i>Sau3AI</i> (2,1 Kb) de DNA genómico de <i>A. azollae</i> , conteniendo el gen <i>glnA</i> , en pBS <i>BamHI</i>
pJL2	Fragmento <i>XbaI-SmaI</i> (2,1 kb) de pJL1, conteniendo el gen <i>glnA</i> de <i>A. azollae</i> , en pUC19 <i>XbaI-KpnI</i>
pD51E	pJL2 conteniendo la mutación D51E de la GS de <i>A. azollae</i>
pD51S	pJL2 conteniendo la mutación D51S de la GS de <i>A. azollae</i>
pD51A	pJL2 conteniendo la mutación D51A de la GS de <i>A. azollae</i>
pD51N	pJL2 conteniendo la mutación D51N de la GS de <i>A. azollae</i>
pD51R	pJL2 conteniendo la mutación D51R de la GS de <i>A. azollae</i>
pAzE	Plásmido utilizado para introducir la mutación D51E de la GS de <i>A. azollae</i> en <i>Anabaena</i> por conjugación (Fig. XX)
pAzS	Plásmido utilizado para introducir la mutación D51S de la GS de <i>A. azollae</i> en <i>Anabaena</i> por conjugación (Fig. XX)
pAzA	Plásmido utilizado para introducir la mutación D51A de la GS de <i>A. azollae</i> en <i>Anabaena</i> por conjugación (Fig. XX)
pJL10	Fragmento <i>Sau3AI</i> (5,5 Kb) de DNA genómico de <i>Pseudanabaena</i> 6903, conteniendo el gen <i>glnN</i> , en pBS <i>BamHI</i>
pJL20	Fragmento <i>SacI</i> (2,8 Kb) de pJL10, conteniendo el gen <i>glnN</i> de <i>Pseudanabaena</i> 6903, en pUC19 <i>SacI</i>
pD130A	pJL20 conteniendo la mutación D130A de la GSIII de <i>Pseudanabaena</i> 6903
pD130E	pJL20 conteniendo la mutación D130E de la GSIII de <i>Pseudanabaena</i> 6903

Para la obtención de DNA que iba a ser sometido a digestión con exonucleasa III de *E. coli* (apartado 2.4.4.7) se empleaba el procedimiento de la lisis alcalina seguido de tratamiento con RNasa A de páncreas bovino (Boehringer Mannheim, Alemania) a una concentración final de 20 µg/ml y precipitación con polietilenglicol (Ausubel *et al.*, 1989).

2.4.2.2. Aislamiento de 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 (10 min, 6.000 x g) y se resuspendieron en 400 µl de tampón T.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 estériles (0,25-0,30 mm de diámetro; Sigma, Alemania), 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 ciclos sucesivos de 1 min de agitación vigorosa y 1 min de incubación en hielo. Este proceso se repitió diez veces, terminado el cual se centrifugó (15 min, 12.000 x g, 4 °C) y se sometió el sobrenadante a sucesivas extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y cloroformo. El DNA se precipitó a continuación con 2 volúmenes de etanol absoluto en presencia de acetato sódico a una concentración final de 0,3 M (pH 5,2). El precipitado se secó al vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón T.1E. Cuando se quiso eliminar el contenido de RNA se realizó un tratamiento con RNasa A de páncreas bovino Boehringer Mannheim (Alemania), a una concentración final de 20 µg/ml seguido de extracción con fenol:cloroformo.

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

2.4.2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 0,7-1% preparados en tampón TBE 0,5x (TBE 1x es 45 mM de Tris-borato y 1 mM de EDTA, pH 8,0). Las electroforesis se realizaron en aparatos GNA-100 o GNA-200 suministrados por Pharmacia (Suecia). A cada muestra se añadió 1/10 del volumen de tampón de carga (0,25% (p/v) de azul de bromofenol, 0,25% (p/v) de xileno-cianol FF y 30% (v/v) de glicerol en agua). Cuando se deseaba eliminar el 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 provenientes de la digestión del fago λ con *HindIII* y *EcoRI* o el marcador comercial "1-Kb DNA ladder" de Gibco BRL.

Tras la electroforesis los geles, que incluían bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml, se sometieron a iluminación con luz ultravioleta de 302 nm, utilizándose para ello un transiluminador LKB (Suecia) modelo Macro Vue y se fotografiaron con un equipo UVP Imagestore GDS-5000 (Inglaterra).

2.4.2.4. Electroforesis de DNA en geles de poliacrilamida

La separación de fragmentos de DNA en geles de poliacrilamida se realizó para visualizar bandas de bajo peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 6 % (acrilamida/bisacrilamida: 30/0,36) que contenían glicerol al 10%, TBE 0,25 X, persulfato de amonio al 0,0625 % (v/v) y TEMED al 0,001 % (v/v). A continuación el gel se sometía a una diferencia de potencial eléctrico de 150 V en tampón TBE 0,25 X utilizando un aparato Vertical Slab Gel Electrophoresis Unit modelo SE250 de Hoeffer Scientific Instruments (EE.UU.). Todo el proceso se realizó en una cámara refrigerada, a 4 °C. Tras la electroforesis se sumergió el gel en una solución acuosa con bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml durante 15 min. Las bandas se visualizaron al iluminar con luz ultravioleta.

2.4.2.5. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa.

Se siguió el método descrito por Sambrook *et al.* (1989) basado en el uso de membranas de DEAE-celulosa (Schleicher & Schuell, Alemania). Dichas membranas se introducían en el gel de agarosa mediante una escisión con un bisturí delante de la banda de DNA a aislar, y a continuación se proseguía con la electroforesis de forma que el DNA quedaba retenido en la membrana. Posteriormente, el DNA se eluía sumergiendo la membrana durante 30 min a 68 °C en 400 µl de una solución que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM y NaCl 1 M. Finalmente, el DNA se precipitaba con acetato sódico y etanol.

2.4.2.6. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación con sondas radiactivas (Southern blot).

La hibridación del DNA fijado a filtros de nylon con sondas marcadas radiactivamente se llevó a cabo según Ausubel *et al.* (1989). Para ello, una vez realizada la electroforesis de DNA en gel de agarosa al 0,7%, éste se sumergió durante 15 min con agitación suave en una solución 0,25 N de HCl para depurinizar parcialmente el DNA, tras lo cual se lavó con agua destilada y se incubó durante una hora en una solución desnaturalizante de 0,5 N de NaOH y 1,5 M de NaCl, manteniéndose en agitación suave. Se procedió a continuación a la transferencia 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 horneó el filtro durante dos horas a 80 °C.

Los filtros se prehibridaron durante 4-6 horas con una solución compuesta por: tampón fosfato potásico 25 mM (pH 7,0), SSC 5x (el tampón SSC 1x contiene 0,15 M de NaCl y 15 mM de citrato sódico, pH 7,0), disolución de Denhardt 5x (Denhardt 1x contiene 0,2 g/l de ficol tipo 400, 0,2 g/l de polivinilpirrolidona y 0,2 g/l de seroalbúmina bovina), DNA de esperma de salmón 50 µg/ml y SDS al 1% (p/v). Transcurrido el tiempo

de prehibridación se añadió la sonda de DNA marcado radiactivamente y se llevó a cabo la hibridación durante 15 h. La temperatura de prehibridación e hibridación fue de 55 °C ó 65 °C dependiendo del grado de homología existente entre la sonda y el DNA a hibridar.

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

2.4.2.7. Manipulaciones enzimáticas del DNA.

Las endonucleasas de restricción, así como la ligasa, la fosfatasa alcalina o la T4 DNA polimerasa empleadas fueron suministradas por Boehringer Mannheim (Alemania), Pharmacia (Suecia) o Amersham-Life Science (Inglaterra) y se utilizaron siguiendo las instrucciones indicadas por los fabricantes.

Los fragmentos de DNA que se iban a utilizar como sondas en las hibridaciones se obtuvieron mediante restricción de los plásmidos adecuados y se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción de las bandas correspondientes como se describe en el apartado 2.4.2.5. Aproximadamente 100 ng de dichos fragmentos se marcaban radiactivamente utilizando 20-30 mCi de 5' [α -³²P]dCTP (3000 mCi/mmol) suministrado por New England Nuclear (Gran Bretaña). Se empleó alternativamente el equipo de marcaje suministrado por Pharmacia Biotech (Suecia) "Ready To Go" de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El exceso de nucleótidos no incorporados se eliminaba mediante filtración de las muestras a través de columnas de Sephadex G-50 (apartado 2.3.7).

2.4.3. Aislamiento y análisis de RNA total de cianobacterias.

2.4.3.1. Extracción de RNA con perlas de vidrio.

Las células correspondientes a 50 ml de cultivo en medio BG11 o derivados se recogieron por centrifugación (12.000 x g, 5 min y 4 °C) y se resuspendieron en 400 μ l de tampón T.1E. A la suspensión celular se le añadieron 150 μ l de perlas de vidrio estériles (0,25-0,30 mm de diámetro; Sigma, Alemania), 20 μ l de una solución de SDS al

10 %, 450 µl de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y 80 µl de macaloide al 3 % (p/v). Tras 10 ciclos de 1 min de agitación vigorosa alternados con ciclos de 1 min en hielo, se centrifugó la suspensión (12.000 x g, 10 min y 4 °C). El sobrenadante se sometió a dos extracciones con fenol:cloroformo 1:1 y se precipitó el RNA con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/5 de volumen de LiCl 10 M. Tras posterior centrifugación en iguales condiciones, se resuspendió el sedimento en T.1E una vez seco. Para la eliminación del DNA se añadieron a la preparación 40 U de DNAsa I suministrada por Boehringer Mannheim (Alemania) y 10 mM de MgSO₄, incubándose durante 30 min a 30 °C. Posteriormente se sometió la preparación a extracción con fenol cloroformo 1:1 y se precipitó el RNA con 2,5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 de acetato sódico 3 M (pH 4,5). Finalmente, el RNA se secó y resuspendió en 40 µl de H₂O. Para determinar la concentración y la calidad del RNA obtenido, se cuantificó espectrofotométricamente como se describe en el apartado 2.7.5 y se sometió a electroforesis en geles de agarosa (apartado 2.4.2.3).

2.4.3.2. Detección de RNAm mediante hibridación con sondas de DNA radiactivas (Northern blot).

El RNA total se sometió a electroforesis según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído al 1,9 % y preparados en tampón MOPS (MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM y EDTA 0,5 mM). Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos GNA-100 o GNA-200 suministrados por Pharmacia (Suecia). Las muestras con un volumen final de 20,5 µl contenían: 5 µl (15 µg) de RNA, 1 µl de tampón MOPS 10X, 3,5 µl de formaldehído, 10 µl de formamida desionizada y 1 µl de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Tras la electroforesis, los geles, que incluían bromuro de etidio en las muestras, se fotografiaron como se describe en el apartado 2.4.2.3, y se sometían a dos 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 y EDTA 2 mM, pH 7,7). A continuación el RNA se transfirió a filtros de nylon HybondTM-N+ (Amersham) utilizándose para ello un aparato de transferencia por vacío TransVacTE80 de Hoefer Scientific Instruments (EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo durante 1 h utilizando NaOH 50 mM como solución de transferencia.

El proceso de hibridación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante de las membranas HybondTM-N+ (Amersham) empleadas en estos experimentos. Los filtros se prehibridaron 4-6 horas con una solución compuesta de: SSPE 5x, disolución de Denhardt 5x, formamida 50% (v/v), SDS 0,5% (p/v) y DNA de esperma de salmón 50 µg/ml. Transcurrido el tiempo de prehibridación se añadió la sonda de DNA marcado

radiactivamente y se llevó a cabo la hibridación durante 15 h. La temperatura de prehibridación e hibridación fue de 42 °C.

Los filtros una vez hibridados se lavaron con agitación moderada con las siguientes soluciones: 2x SSPE, 0,1% SDS (2 veces a temperatura ambiente durante 10 min), 1x SSPE, 0,1% SDS (1 vez a 65 °C durante 15 min). Tras los lavados los filtros se sometieron a autorradiografía en las mismas condiciones descritas para los filtros de DNA (apartado 2.4.2.6).

2.4.3.3. Determinación del primer nucleótido de un RNAm mediante la técnica de extensión de cebadores (*primer extension*).

La técnica de extensión de cebadores (*primer extension*) se basa en la capacidad de la enzima transcriptasa reversa de llevar a cabo una actividad 5'-3' DNA-polimerasa, utilizando como molde una cadena de RNA. Como cebadores se utilizaron oligonucleótidos marcados en su extremo 5' terminal.

El marcaje radiactivo de los oligonucleótidos se realizó utilizando la polinucleótido quinasa del fago T4, con la siguiente mezcla de reacción: 1µl de solución de oligonucleótidos (200 a 250 ng), 5 µl de [γ -³²P]ATP (10µCi/µl), 2 µl de tampón 10x de polinucleótido quinasa (Tris-HCl 0,5 M (pH 7,6), MgCl₂ 0,1 M, DTT 50 mM, espermidina HCl 1 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0)) (Sambrook *et al.*, 1992), 11 µl de H₂O y 1 µl de T4 polinucleótido quinasa (9 U/µl) (Boehringer Mannheim, Alemania). Tras incubarse 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 (apartado 2.3.7). El eluato de las columnas se llevó a un volumen de 100 µl con H₂O, se sometió a extracción con fenol:cloroformo (1:1), se precipitó con 1/10 de acetato sódico y etanol (2,5 volúmenes) y se centrifugó, secándose a continuación durante algunos minutos. Tras resuspender en 20-30 µl de H₂O tratada con DEPC se cuantificó la radiactividad incorporada, utilizando un contador de centelleo líquido (Beckman modelo 2800).

Una cantidad de oligonucleótido equivalente a 3×10^6 cpm se hibridó con aproximadamente 50 µg de RNA de *A. azollae* o *Pseudanabaena* 6903 en una solución que contenía KCl 0,15 M, tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,3) y 1 mM de EDTA, en un volumen final de 15 µl. La mezcla de hibridación se incubó en tubos eppendorf de 1,5 ml durante 5 min a 85 °C y posteriormente 3 h a 50 °C, tras lo cual se realizó la reacción de extensión. Para ello, se añadieron a cada tubo 30 µl de mezcla de reacción de extensión conteniendo: Tris-HCl 27 mM (pH 8,3), MgCl₂ 13,5 mM, DTT 7,5 mM, Actinomicina D 4,4 µg, dNTP 1,5 mM, 8 U de AMV transcriptasa reversa (Promega) y 20 U de RNasin (Promega). La reacción de extensión se prolongó durante 1 h a 44 °C, tras lo cual las muestras se trataron con RNasa A (libre de DNasas, Boehringer) seguido de extracción con fenol:cloroformo y precipitación para eliminar los nucleótidos no incorporados. Las muestras así obtenidas se resuspendieron en tampón de carga (75 %

(v/v) formamida, 0,25% (p/v) azul de bromofenol, 0,25% (p/v) de xileno-cianol) y previa desnaturalización (3 min, 90 °C) se cargaron en geles de poli(acrilamida) al 6% (p/v) conteniendo 4,68 M de urea, idénticos a los utilizados para la secuenciación de DNA (apartado 2.4.4.2). Contiguas a las muestras se cargaban muestras de reacciones de secuencia realizadas con los mismos cebadores utilizados para la reacción de extensión.

2.4.4. Secuenciación de DNA.

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

La obtención de plásmidos delecionados en forma seriada se llevó a cabo mediante digestión con exonucleasa III de *E. coli*, utilizando el equipo "double-stranded nested deletion kit" suministrado por Pharmacia (Suecia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en las propiedades de dicha enzima, que es específica para DNA de doble cadena y digiere una de ellas comenzando por un extremo 5' protuberante (Henikoff, 1984). El hecho de que la enzima no actúe sobre extremos 3' protuberantes la hace idónea para realizar digestiones unidireccionales de plásmidos tratados con una enzima de restricción que genere extremos 3' protuberantes y con una segunda que genere extremos 5' protuberantes. De esta forma sólo se delecciona a partir del extremo 5' protuberante, evitando así la deleción de zonas funcionalmente esenciales del vector. El DNA plasmídico empleado en este proceso se aisló por el procedimiento de lisis alcalina y se purificó por precipitación con polietilenglicol como se describe en el apartado 2.4.2.1. Los plásmidos pJL1 y pJL10 fueron sometidos a tratamiento con la exonucleasa III, para generar deleciones en ambos sentidos con objeto de secuenciar los genes *glnA* y *glnN*, respectivamente. Se extrajeron muestras alícuotas a diferentes tiempos de tratamiento con la exonucleasa III y los plásmidos obtenidos se trataron con nucleasa S1 generándose así extremos romos. La mitad de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa para comprobar el resultado del proceso y la otra mitad se ligó con ligasa del fago T4 para recircularizar los fragmentos obtenidos. Tras la ligación se transformó *E. coli* y se seleccionaron los clones deseados.

2.4.4.2. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea-poli(acrilamida).

El DNA plasmídico empleado en los experimentos de secuenciación se obtuvo mediante lisis alcalina (apartado 2.4.2.1) y posterior desproteinización con fenol. La secuenciación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sanger *et al.* en 1982, 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 radiativamente las cadenas sintetizadas en dichas reacciones fue 5' [α - 35 S]dATP (1.212 mCi/ μ mol), suministrado por New England Nuclear (Gran Bretaña). Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos comerciales "Reverse primer" y "M13-20 primer", suministrados por Boehringer Mannheim (Alemania), adecuados para secuenciar plásmidos derivados de pBS, o bien oligonucleótidos apropiados. Los reactivos y la DNA-polimerasa empleados en las reacciones fueron los incluidos en el equipo Sequenase versión 2.0, suministrado por United States Biochemical (EE.UU.). Se siguieron las instrucciones del fabricante excepto en la eliminación del hidróxido sódico utilizado para la desnaturalización del DNA molde, que se realizó por filtración a través de columnas de Sephadex G-50 (apartado 2.3.7) previamente equilibradas en tampón T.1E.

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

Terminada la electroforesis, los geles se pasaban a papel Watman 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 el revelado de las películas empleando reactivos reveladores y fijadores suministrados por Valca (España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.5. Construcción de genotecas de DNA genómico de cianobacterias.

Para la clonación de genes estructurales de las cianobacterias *A. azollae* y *Pseudanabaena* 6803 fue necesaria la elaboración de genotecas de DNA genómico de estos organismos.

El DNA genómico de la cianobacteria (obtenido como se describe en el apartado 2.4.2.2) se sometió a restricción parcial con la enzima *Sau3AI*, digiriendo a 37 °C durante 1 hora con diferentes cantidades de enzima, que variaban desde 1 hasta 0,125 U/ μ g de DNA. Las muestras que presentaban un patrón homogéneo de digestión entre fragmentos de tamaño grande (15-20 Kb) y de tamaño pequeño (0,5-1 Kb), se sometían a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Bio Rad, EE.UU.) a 4 °C. Una vez que se habían separado bien los fragmentos de DNA, se extraían del gel aquellos comprendidos en un tamaño de 1 hasta 10 Kb cortando con un bisturí pequeñas porciones del gel que se introducían en tubos eppendorf y se calentaban a 65 °C durante

5 min para fundir la agarosa. Una vez fundida la agarosa, se tomaba una alícuota (10 µl) de cada eppendorf, que se mantenían a 37 °C para evitar que gelificara la agarosa, con el objeto de clonar el DNA presente en cada muestra en el plásmido pBS digerido con el enzima *Bam*HI, tratando con T4 DNA ligasa (Promega, EE.UU.). El producto de ligación se utilizó para transformar la estirpe de *E. coli* MC1061 y el DNA plasmídico de los clones obtenidos (apartado 2.4.2.1) constituyó la genóteca de la cianobacteria.

2.4.6. Ensayos de retardo en geles de poliacrilamida.

Los fragmentos de DNA usados en los experimentos de retardo se marcaban terminalmente con dCTP marcado radiactivamente por relleno de extremos 5' colgantes generados por enzimas de restricción según se describe en el apartado 2.4.2.7.

La proteína NtcA de *Synechocystis* 6803 fusionada traduccionalmente al extremo carboxilo de la proteína glutatión S-transferasa (GST), así como la misma proteína GST, se purificaron según se describe en Muro-Pastor *et al.* (1996). Las preparaciones de GST-NtcA se trataron con trombina, que corta separando las dos proteínas, previamente a los ensayos de retardo y del siguiente modo: 1 µg de GST-NtcA se cortaba a temperatura ambiente durante 1 h con 1 U de trombina (Sigma, EE.UU.) en presencia de CaCl₂ 2,5 mM. Los ensayos de retardo se llevaban a cabo en 20 µl de tampón de retardo (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, KCl 50 mM, espermidina 4 mM, glicerol al 8 % y 2 µg de poli[d(I-C)]) que contenían aproximadamente 1,5 ng de DNA marcado y una cantidad variable de proteína NtcA. Las muestras así preparadas se mantenían a 25 °C durante 20 min y se sometían a electroforesis en gel de poliacrilamida como se describe en el apartado 2.4.2.4. Como controles se realizaron ensayos con proteína GST o ensayos con NtcA usando un fragmento de DNA marcado que no contenía cajas de unión a NtcA. También se realizaron ensayos de competencia en los que además del fragmento de DNA marcado se incluía una cantidad 10 veces superior de dicho fragmento sin marcar.

2.5. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA.

2.5.1. Obtención de células competentes y transformación de *E. coli*.

La preparación de células competentes de *E. coli* de las diferentes estirpes utilizadas se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Hanahan (1985). Las células se cultivaban en 100 ml de medio líquido SOB (apartado 2.1.2.2) con agitación vigorosa, hasta alcanzar una absorbancia a 580 nm de entre 0,45 y 0,65. Tras mantener el cultivo en hielo durante 15 min, las células se recogían por centrifugación (750 x g, 15 min y 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 repitió

el proceso de centrifugación anterior y se resuspendieron las células en 8 ml de solución RF2 fría (tampón MOPS-NaOH 10 mM (pH 7,0), RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 25 mM y glicerol al 15 % (v/v)). Las células así preparadas se conservaron a -70 °C en alícuotas de 200 µl. La competencia de las células se comprobó transformándolas con cantidades conocidas de DNA plasmídico, obteniéndose en torno a 10⁷ transformantes/µg de DNA.

Para transformar las células competentes, el DNA transformante (máximo 20 µl) se mezclaba suavemente con una alícuota de células competentes descongelada en hielo, empleando tubos eppendorf. Tras incubar 30 min en hielo, se sometían a un choque térmico de 2 min a 42 °C y se volvían a incubar en hielo durante 2 min. La suspensión se suplementaba posteriormente con 0,8 ml de medio LB 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 los transformantes. Cuando las mezclas de transformación iban a ser sembradas en medio mínimo para los experimentos de complementación, tras la incubación a 37 °C en medio LB, se lavaban las células con medio mínimo, antes de sembrarlas en las cajas de medio selectivo.

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

2.5.2. Conjugación de *Anabaena azollae* y *Anabaena 7120*.

La obtención de mutantes de *A. azollae* y *A. 7120* mediante la introducción de material genético se llevó a cabo por conjugación, proceso por el cual se produce una transferencia de DNA desde *E. coli* a la cianobacteria (Wolk *et al.*, 1984), siguiendo el protocolo empleado para la conjugación de otras cianobacterias como se describe en Elhai y Wolk (1988). Dicho método se basa en la capacidad que poseen ciertos plásmidos (plásmidos conjugativos) de amplio espectro, como RP4 y sus derivados, para movilizar a otros plásmidos presentes en la misma célula.

En nuestro caso en concreto se empleó el plásmido pRL443 como plásmido conjugativo, además del plásmido pRL528, que contiene los genes que codifican para las metilasas de los sitios de restricción *AvaI* y *AvaII* y que por tanto proporciona protección frente a estas endonucleasas de restricción presentes en la cianobacteria receptora. Por otra parte, como portador del DNA exógeno que debe ser incorporado al genomio de la cianobacteria se empleó el plásmido pRL277, que es incapaz de replicarse en *Anabaena* y es además portador del gen *sacB*, que confiere sensibilidad a sacarosa (Cai y Wolk, 1990). De esta forma se pueden seleccionar estirpes que hubieran incorporado el DNA exógeno mediante doble recombinación con el propio genomio, de aquellas en las que se hubiera producido una integración del plásmido completo mediante un único suceso

de recombinación, dado que estas últimas serían incapaces de crecer en medio con sacarosa.

Se llevó a cabo una conjugación tripartita, en la que participaban dos estirpes de *E. coli* (HB101 conteniendo el plásmido a transferir y el plásmido auxiliar metilador, y ED8654, que portaba el plásmido conjugativo pRL443) junto con la estirpe receptora cianobacteriana. Para ello, alícuotas de 0,25 ml de cultivo de ambas estirpes de *E. coli* se utilizaban para inocular nuevos cultivos de 10 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados. Estos cultivos eran incubados a 37 °C con agitación durante 2,5 h, tras lo cual las células se recogían y se lavaban con 10 y 5 ml de LB en pasos sucesivos, mezclándose finalmente las dos suspensiones celulares. Tras centrifugar las células, el sedimento obtenido se resuspendía en 0,2-0,3 ml de medio LB y se incubaba a temperatura ambiente durante 1,5-2 h. Transcurrido este tiempo, la suspensión celular se mezclaba con una cantidad de células de *Anabaena* (cultivadas en medio BG11 con nitrato como fuente de nitrógeno) correspondiente a 10 µg de clorofila y la mezcla se extendía cuidadosamente sobre filtros de nitrocelulosa (Nucleopore REC-85) en cajas de Petri con medio de cultivo BG11 con nitrato (medio permisivo) suplementado con LB al 5% (v/v). Las cajas se incubaban 4-5 h a baja intensidad de luz y posteriormente se pasaban a condiciones normales de cultivo. Tras 24 h en dichas condiciones, los filtros se pasaban a cajas con medio permisivo sin LB, en las que se incubaban otras 24 h, pasadas las cuales los filtros se cambiaban a cajas con medio selectivo. Tras una incubación de 10-15 días en estas condiciones, el césped de cianobacterias sensibles al antibiótico (neomicina, Nm) se lisó, apreciándose la aparición de colonias resistentes que se sembraron por estrías hasta eliminar las células de *E. coli* contaminantes. Una vez libres de *E. coli*, los exconjugantes resistentes a Nm se inocularon en medio BG11 líquido conteniendo 5 µg/ml de Nm. Los cultivos obtenidos se recogieron por centrifugación y las células se sembraron en medio BG11 sólido conteniendo 25 µg/ml de Nm y sacarosa al 5% (p/v) y se procedió de este modo a la selección de dobles recombinantes. Las colonias resistentes a sacarosa se picaron a medio BG11 conteniendo los antibióticos Sm y Sp (2 µg/ml cada uno), frente a los cuales el vector pRL277 que contiene el gen *sacB* confiere resistencia. Las colonias que eran sensibles a estos antibióticos se consideraban dobles recombinantes.

2.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LOS GENES *glnA* DE *A. azollae* Y *glnN* DE *pseudanabaena* sp. PCC 6903.

Las diferentes mutagénesis de los genes *glnA* de *A. azollae* y *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 se llevaron a cabo con el sistema "U.S.E. Mutagenesis Kit" de Pharmacia (Suecia). Este método está basado en la eliminación de un sitio único de restricción del plásmido empleado, según el procedimiento descrito por Deng y Nickolof (1992). Para ello se emplean dos oligonucleótidos: uno que elimina el sitio único de

restricción en el plásmido y que sirve como base para la selección de los plásmidos mutados, y un segundo que contiene la mutación diseñada, con el fin de introducir ésta en una secuencia conocida del fragmento de DNA clonado en el plásmido. Ambos oligonucleótidos deben hibridar con la misma cadena del DNA plasmídico y en igual dirección, de forma que se pueda sintetizar una nueva cadena de DNA conteniendo las dos mutaciones.

Para las mutagénesis dirigida de los genes *glnA* y *glnN* se emplearon respectivamente los plásmidos pJL2 y pJL20, que se obtuvieron mediante lisis alcalina incluyendo extracción con fenol:cloroformo.

2.6.1. Hibridación de los oligonucleótidos al plásmido y síntesis de la cadena de DNA mutada.

La reacción de hibridación incluía la utilización del oligonucleótido "U.S.E. Selection primer" suministrado por Pharmacia (Suecia), complementario al sitio de restricción *ScaI* del vector pUC19 y conteniendo la mutación que hace cambiar esta diana por *MluI*:

5' CTGTGACTGGTGACGCGTCAACCAAGTC 3'

Una alícuota de 25 pmol del oligonucleótido anterior, 25 pmol del oligonucleótido con la mutación diseñada en cada caso y 0,025 pmol de plásmido se llevaron hasta un volumen final de 20 µl en tampón OPA (Tris-acetato 10 mM, acetato magnésico 10 mM y acetato potásico 50 mM, pH 7,5). Tras incubar a 100 °C durante 5 min y enfriar en hielo otros 5 min, se incubó la preparación durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 7 µl de una solución conteniendo 2,86 mM de cada dNTP, 4,34 mM ATP y 1,43x del tampón OPA, así como 3 µl de la mezcla de reacción que incluía DNA ligasa del fago T4 (0,83-1,17 ku/ml), DNA polimerasa del fago T4 (0,83-1,67 ku/ml) y proteína del gen 32 del fago T4 (0,2-0,28 mg/ml), en tampón acuoso. La mezcla anterior se incubó a 37 °C durante 1 h y se detuvo la reacción calentando a 85 °C durante 15 min.

2.6.2. Primera ronda de selección.

La preparación anterior se sometió a digestión con la enzima de restricción *ScaI* como se indica en el apartado 2.4.2.8, en un volumen final de 50 µl. De esta forma se reduce la capacidad de los plásmido silvestres (que contienen el sitio *ScaI*) para transformar células de *E. coli*.

Se utilizaron 20 µl de la mezcla de plásmidos silvestres y mutados resultado de la digestión anterior, para transformar alícuotas de 200 µl de la estirpe de *E. coli* BMH71-

18 *mutS*, la cual es defectiva en reparación de mutaciones en el DNA y por tanto no revierte las mutaciones introducidas con los oligonucleótidos usados. La transformación de las células de *E. coli* se realizó según se describe en el apartado 2.5.1. Con la mezcla de transformación se inocularon 3 ml de medio LB con ampicilina, a 100 µg/ml de concentración final y se incubaron en agitación a 37 °C durante 12-16 h.

2.6.3. Segunda ronda de selección.

Para conseguir la máxima eficiencia en el proceso de mutagénesis, los plásmidos obtenidos por lisis alcalina a partir de la estirpe de *E. coli* BMH71-18 *mutS*, transformada como se describe en el apartado anterior, se sometieron a digestión con la enzima de restricción *MluI*. De esta forma, se digirieron aquellos plásmidos que portaban la mutación que hacía aparecer el sitio de restricción *MluI*, mientras que los plásmidos silvestres o los que sólo portaban la mutación en el gen *glnA* o *glnN* quedaron recircularizados. El resultado de esta digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % y se extrajo la banda correspondiente al DNA plasmídico linearizado, según se describe en el apartado 2.4.2.5. Posteriormente, se recircularizaron los plásmidos aislados del gel de agarosa usando DNA ligasa del fago T4, según 2.4.2.8.

2.6.4. Obtención e identificación de mutantes.

Las mezclas de ligación, obtenidas como se describe en el apartado anterior, se utilizaron para transformar alícuotas de 200 µl de células de *E. coli* DH5α. Las mezclas de transformación se sembraron en cajas conteniendo medio LB con ampicilina (100 µg/ml) y varios de los clones aparecidos se usaron para extraer DNA plasmídico. Posteriormente, los plásmidos se digirieron con la enzima de restricción *MluI* y se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7 %. Se seleccionaron aquellos clones en los que se obtuvo el plásmido en forma lineal, indicando esto que contenían la mutación que hacía aparecer el sitio único de restricción *MluI*. Algunos de los clones conteniendo este nuevo sitio de restricción se usaron para realizar reacciones de secuenciación (2.4.4.2), con el fin de comprobar la existencia en los genes *glnA* y *glnN* de las mutaciones diseñadas.

2.7. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

2.7.1. 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 Mckinney en 1941. Las células contenidas en 1 ml de suspensión celular se

recogían mediante centrifugación a 12.000 x g en una centrífuga Eppendorf y el sedimento se resuspendía en 1 ml de metanol absoluto. 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 en base a su absorbancia a 665 nm, teniendo en cuenta un coeficiente de extinción de 74,46 ng⁻¹ ml cm⁻¹.

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).

2.7.2. Determinación de proteínas

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

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.

2.7.3. Determinación de γ -glutamihidroxamato.

El γ -glutamihidroxamato formado en el ensayo transferasa de la GS se determinaba por reacción con cloruro férrico en medio ácido (Shapiro y Stadtman, 1970). A 1 ml de disolución conteniendo γ -glutamihidroxamato (mezcla de ensayo de la reacción de la GS tras incubación a 30 °C), se le añadían 2 ml del reactivo de hierro en medio ácido (7,73 ml de HCl al 37 %, 12 g de ácido tricloroacético y 33,3 g de FeCl₃·6H₂O llevados a un volumen final de 1 l con H₂O). La concentración del producto coloreado formado se determinó espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción a 500 nm de 0,89 mM⁻¹·cm⁻¹.

2.7.4. Determinación de amonio

El contenido de amonio se determinó por el método del fenol-hipoclorito descrito por Solorzano (1969). Para ello, a una alícuota del medio de cultivo libre de células se le añadía agua destilada hasta un volumen de 4,1 ml, 0,2 ml de fenol al 10 % (p/v) en etanol absoluto, 0,2 ml de nitroprusiato sódico al 0,5 % (p/v) y 0,5 ml de solución oxidante. La mezcla se agitaba y tras 2 h en la oscuridad se determinaba la formación del complejo

coloreado formado, utilizándose un coeficiente de extinción a 640 nm $E= 20$. La solución oxidante se preparaba inmediatamente antes de usarse y contenía: 16 g de citrato trisódico, 0,8 g de NaOH en 80 ml de agua destilada (solución alcalina, estable durante al menos un mes), 4 ml de hipoclorito sódico comercial y agua destilada hasta 100 ml.

2.7.5. 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.

Alternativamente, el DNA se cuantificaba en base a su absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a 40 mg/ml de DNA bicatenario o a 20 mg/ml de oligonucleótidos. El RNA se cuantificaba espectrofotométricamente considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a 40 mg/ml de RNA.

2.8 TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEINAS

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

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

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

El primer abordaje que se llevó a cabo para la obtención de estirpes mutantes de *A. azollae* excretoras de amonio que pudieran estar afectadas en la actividad GS, fue la búsqueda de estirpes resistentes a los inhibidores de la GS MSX y PPT. La adición de estos compuestos a cultivos de cianobacterias, tanto filamentosas como unicelulares, provoca una rápida inactivación de la GS y como consecuencia una excreción de amonio al medio de cultivo, debido a la imposibilidad de ser asimilado por la enzima inactiva. La toxicidad de estos inhibidores radica en la inactivación irreversible que provocan en la GS y, dado que dicha enzima es esencial para estos organismos, las células son incapaces de crecer en presencia de MSX o PPT. Por tanto, la posible resistencia de algunas estirpes a estos inhibidores podría ser debida a una alteración en la afinidad de la GS a estos compuestos. Además, esta alteración podría tener como consecuencia una menor actividad de la enzima, con lo cual disminuiría la asimilación de amonio en la célula, que sería excretado al medio extracelular.

3.1. EFECTO DE LOS INHIBIDORES MSX Y PPT SOBRE LA ACTIVIDAD GS Y LA EXCRECIÓN DE AMONIO.

3.1.1. Efecto de la adición de los inhibidores MSX y PPT a cultivos de *A. azollae*.

Con el fin de comprobar el efecto que producen la PPT y el MSX sobre la GS de *A. azollae*, se añadió de forma separada cada uno de estos compuestos a una concentración de 10 μM para cada uno de ellos a células en fase exponencial de crecimiento de *A. azollae* cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno. Como se observa en la Figura 7A, después de una hora en presencia de MSX o PPT la actividad GS había disminuido en un 70 % y una hora más tarde era prácticamente nula. Dicha inhibición provocó un aumento paralelo y progresivo de la concentración de amonio presente en el medio de cultivo (Figura 7B).

3.1.2 Búsqueda de mutantes de *A. azollae* resistentes a los compuestos PPT y/o MSX.

3.1.2.1. Búsqueda de mutantes de *A. azollae* resistentes al inhibidor PPT.

Con objeto de obtener estirpes mutantes de la cianobacteria *A. azollae* que pudieran estar afectadas en la actividad de la enzima GS, se inoculó dicha cianobacteria en cajas de Petri con medio BG11 suplementadas con distintas concentraciones del inhibidor PPT, que variaban desde 5 hasta 20 μM . Para ello, se empleó un cultivo de la

cianobacteria en fase exponencial de crecimiento (2-4 $\mu\text{g clf/ml}$) crecida con NO_3^- como fuente de nitrógeno. La PPT, al ser introducida al interior celular, producía la total inhibición de la actividad GS, provocando por tanto una rápida muerte celular a los 3-4 días de ser inoculadas las células y tras 7-10 días de incubación a 30 °C aparecieron un total de 141 colonias capaces de crecer en presencia del inhibidor. La frecuencia de aparición de las colonias mutantes fue aproximadamente la misma en todas las concentraciones de PPT testadas, en torno a $3-4 \cdot 10^{-5}$, por lo que la concentración más baja de PPT (5 μM) provocó el mismo efecto que la mayor concentración (20 μM).

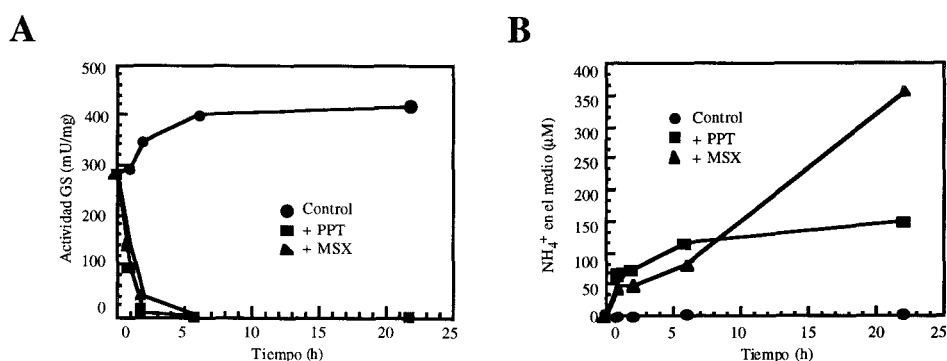


FIGURA 7. Efecto de los inhibidores MSX y PPT sobre la actividad GS y la excreción de amonio en células de *A. azollae*.

Un cultivo de *A. azollae* en fase exponencial de crecimiento empleando nitrato como fuente de nitrógeno, fue dividido en tres cultivos. A uno de ellos se le adicionó PPT a una concentración final de 10 μM , a otro se le adicionó MSX a la misma concentración y el tercero se empleó como control, sin añadirle ninguno de los inhibidores. A los tiempos indicados se tomaron muestras para determinar la actividad GS (A) y la concentración de amonio presente en el medio de cultivo (B), según se describe en el apartado 2.7.4. Se muestra un experimento típico.

3.1.2.2. Análisis de la actividad in vitro e in vivo de la actividad GS en los mutantes de *A. azollae* resistentes a PPT.

Con el fin de comprobar si la actividad GS estaba alterada en alguna de las colonias de *A. azollae* resistentes a PPT, se seleccionaron al azar 10 de estas colonias de cada concentración de PPT, que fueron de nuevo cultivadas en medio BG11 líquido con NO_3^- para medir el nivel de actividad GS presente en estas células. Ninguno de los mutantes seleccionados mostraba una alteración significativa en dicha actividad en comparación con la que presentaba la estirpe silvestre de *A. azollae*, ya que en ninguno de los casos la diferencia fue superior al 10%. Además, la adición de PPT a una concentración final de 10 μM a cultivos de estos mutantes no provocó cambio alguno

en la actividad GS, mientras que en la estirpe silvestre dicha actividad fue totalmente inhibida.

Con el fin de comprobar si la actividad GS de estas estirpes resistentes podía ser inactivada *in vitro* con PPT de igual forma que la GS de la estirpe silvestre, se obtuvieron extractos crudos de los mutantes seleccionados y se procedió a la inactivación *in vitro* de la GS, según se describe en el apartado 2.2.3. El resultado obtenido fue que en todas las colonias mutantes se observó una inactivación de la GS igual que la detectada en el extracto de la estirpe silvestre.

3.1.2.3. Resistencia a MSX de los mutantes resistentes a PPT.

La PPT y el MSX son dos compuestos análogos del glutamato pero que difieren en su estructura molecular (Figura 5). Para comprobar si alguno de los 141 mutantes de *A. azollae* resistentes a PPT lo eran también al MSX, todos ellos fueron sembrados en cajas de medio BG11 que contenía PPT y MSX a concentraciones de 10 y 35 μM , respectivamente. Tras 7 días de incubación a 30 °C todos los mutantes fueron incapaces de crecer en presencia de ambos inhibidores a excepción de cuatro de ellos, que se designaron con los números 9, 13, 18 y 23, que mostraban el mismo crecimiento con y sin MSX.

Los cuatro mutantes doblemente resistentes presentaban una actividad GS *in vivo* de nuevo similar a la de la estirpe silvestre. Se obtuvieron extractos crudos de estos cuatro mutantes para realizar inactivaciones *in vitro* de la GS con PPT y/o MSX. Los resultados de la Tabla 4 muestran que la actividad GS de los mutantes doble resistentes puede ser totalmente inactivada con ambos inhibidores de igual forma que lo era la GS de la estirpe silvestre de *A. azollae*.

TABLA 4. Efecto de la PPT y el MSX *in vitro* sobre la actividad GS de las estirpes mutantes PPT/MSX^R de *A. azollae*^a.

Estirpe	Control	+PPT	+MSX	+PPT/MSX
Silvestre	100 % ^b	0	0	0
PPT/MSX ^R 9	98	0	0	0
PPT/MSX ^R 13	99	0	0	0
PPT/MSX ^R 18	99	0	0	0
PPT/MSX ^R 23	103	0	0	0

^aExtractos crudos de la estirpe silvestre de *A. azollae* y de los cuatro mutantes PPT/MSX^R fueron incubados con PPT, MSX, ambos inhibidores a una concentración final para cada uno de ellos de 50 μM o en ausencia de inhibidor (control), según se describe en el apartado 2.2.3. A los 30 minutos de incubación se determinó la actividad GS transferasa.

^bEl 100 % de actividad GS corresponde a 470 mU/mg de proteína

3.1.2.4. Efecto de la adición de PPT o MSX en la excreción de amonio en los mutantes doble resistentes.

Dado que todos los mutantes resistentes a PPT y los doble resistentes a PPT y MSX tenían una actividad GS similar a la detectada en la estirpe silvestre, se seleccionó uno de cada tipo, designados como PPT^R y PPT/MSX^R, para realizar los estudios posteriores.

Como se muestra en el apartado 3.1.1, la inactivación en *A. azollae* de la GS debido a la adición de PPT o MSX provoca un aumento de la concentración de amonio en el medio de cultivo. Sin embargo, en el caso de los mutantes PPT^R sólo la adición de MSX y no la de PPT provocó una inactivación de la GS y excreción de amonio (Figura 8 A, B). Asimismo, en los mutantes PPT-MSX^R no se observó ningún efecto al añadir PPT o MSX (Figura 8 C, D), como era de suponer dada la capacidad de estos mutantes para crecer en presencia de ambos inhibidores.

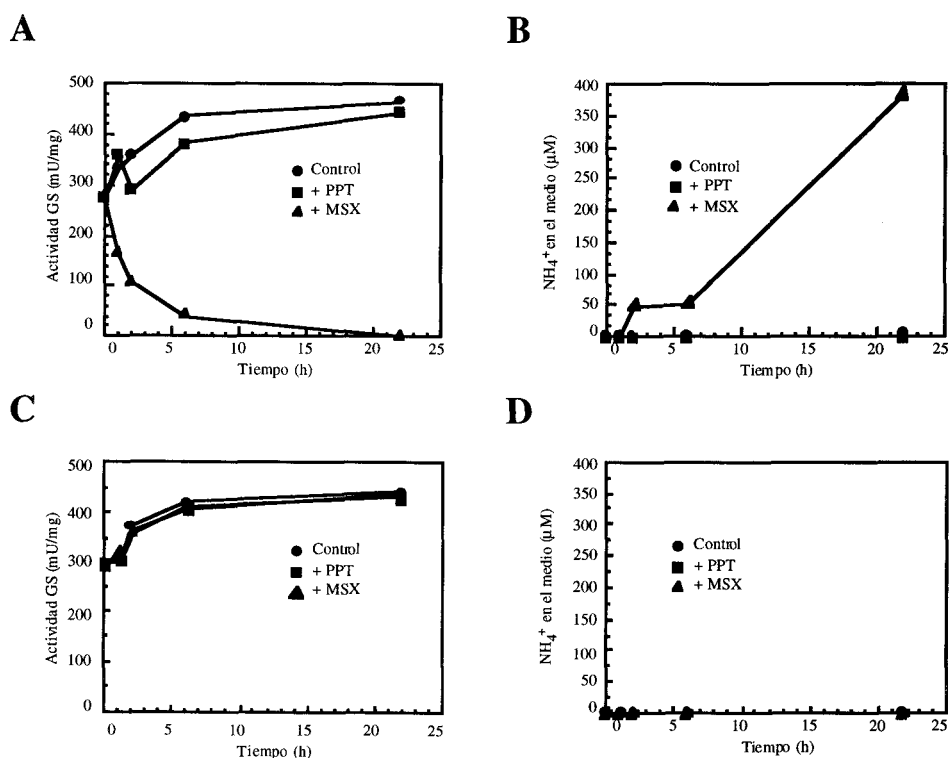


FIGURA 8. Efecto de los inhibidores MSX y PPT sobre la actividad GS y la excreción de amonio en los mutantes de *A. azollae* PPT^R y PPT/MSX^R.

Células en fase exponencial de crecimiento de las estirpes mutantes de *A. azollae* PPT^R y PPT/MSX^R cultivadas en presencia de nitrato, fueron sometidas al mismo procedimiento que se especifica en la Figura 7. A los tiempos indicados se tomaron muestras para determinar la actividad GS (A y C) y la concentración de amonio presente en el medio de cultivo (B y D). Se muestra un experimento típico.

Todos estos resultados sugerían que, en el total de colonias mutantes seleccionadas y analizadas, la resistencia a los inhibidores PPT y/o MSX no fue debida a una alteración de la enzima GS por la afinidad a estos inhibidores, que pudiera afectar a la actividad de la proteína, sino que más bien pudiera deberse a otros motivos, como una mutación en el sistema de transporte al interior celular de ambos compuestos.

Por este motivo, se decidió abordar una estrategia diferente para la obtención de mutantes de *A. azollae* productores de amonio, aplicando técnicas de biología molecular como la mutagénesis dirigida, ya que se ha demostrado que sustituciones en el residuo altamente conservado Asp-50 de la GS de *E. coli* provocan una disminución drástica de la afinidad de la enzima por el amonio (Alibhai y Villafranca, 1994).

Para llevar a cabo este proyecto era necesario en primer lugar clonar el gen estructural que codifica la GS, *glnA*, de *A. azollae* con el fin de obtener los distintos mutantes dirigidos. En segundo lugar, había que realizar una completa caracterización bioquímica de las formas mutantes de la GS, para finalmente introducir en la cianobacteria el alelo mutante del gen *glnA*.

3.2. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *glnA* DE *A. azollae* AS-DS.

3.2.1. Clonación del gen *glnA* de *A. azollae* AS-DS.

La clonación del gen *glnA* de *A. azollae* se realizó siguiendo una estrategia de complementación de un mutante de *E. coli* (ET 6017) carente de GS y por tanto auxótrofo para glutamina. Dicho procedimiento requería en primer lugar la construcción de una genoteca de *A. azollae* ya que no disponíamos de ella en nuestro laboratorio y que se llevó a cabo según se describe en el apartado 2.4.5.

Tras una digestión parcial de DNA genómico de *A. azollae* con la enzima de restricción *Sau3AI*, se seleccionaron fragmentos de DNA en un rango de tamaño de 1 a 8 Kb que fueron clonados en la posición *BamHI* del plásmido pBluescript (pBS). Una vez transformada la estirpe de *E. coli* MC1061 con esta población de plásmidos se obtuvieron aproximadamente $30-32 \times 10^3$ clones. El DNA plasmídico de todos estos clones constituía la genoteca de expresión de *A. azollae*. El mutante ET6017 se transformó con esta genoteca y se seleccionaron en medio mínimo M9 aquellas colonias capaces de complementar la auxotrofia para glutamina.

Se aislaron por este procedimiento tres clones de la estirpe ET6017 capaces de crecer en medio mínimo sin glutamina. Se obtuvo el plásmido de estos clones y en todos los casos contenía un inserto de 2,1 Kb, que tras ser analizado con distintos enzimas de restricción resultó ser el mismo fragmento para los tres clones. Se seleccionó por tanto uno de ellos, al que se denominó pJL1 y con este plásmido se

TCTAGAACTAGTGGATCGCAATTTTCGGTCAAAATACCGACCAGCTA	45
CGTCATAATTCTTAAATTAAGCTTGTACTGCATCGCGCATTCCTTCCTCCCAATCTTTGCTATCTATGGTTTGATAT	124
TAATTTGGTTGCACTACC GACCAGT AAATTTTTGTGCTAT TAAAAA TAGATTTCGGCACAAAAACAATCTATCTGTTACT	203
CAAGGATTTTATGCCAAAGTTGACCCCTATGAGATTAACTTTCCTCTTT TTGTGCAGAT TCGAAAGAAAGGTTAATA T	282
TACCTGTTAAAGACGCTCT GTAA CAAAGAC TAC AAAACCATCTAATGTTTAGGATCT AGGA TATTT CAGG TGTGTCATCAG	361
CTTTGTTTCGCTCAGTAGGGTTTATAGATGCTTTGGCAGATTCTGGTTTGAATTTAAGAAATTCGCAGAGA AGGAGT AAACA	440
ATG ACA ACC TCA CAA GAA GTC TTG AAG AGA ATT CAA GAT GAA AAA ATT CCC CTC ATT CAC	500
M T T S Q E V L K R I Q D E K I P L I H	20
CTC AAG TCC ATC GAC ACT GTA GGT ACT TGG CAA CAC CTC ACC TTG TAC CAA AAC CAA ATC	560
L K S I D T V G T W Q H L T L Y Q N Q I	40
GAT GAA AGC TCC TTC ACC GAT GGC GTA CCT TTT GAC GGT TCC AGC ATC CGG GGT TGG AAA	620
D E S S F T D G V P F D G S S I R G W K	60
GCA ATC AAC GAG TCA GAC ATG ACA ATG GTT CTC GAT CCT AAT ACT GCT TGG ATC GAC CCA	680
A I N E S D M T M V L D P N T A W I D P	80
TTC ATG GAA GTA CCA ACC CTA AGT AIT GTT TGT AGC ATC AAA GAA CCA CGT ACA GGA GAA	740
F M E V P T L S I V C S I K E P R T G E	100
TGG TAC AAC CGT TGT CCA CGG GTT AIT GCT CAA AAA GCA GTT GAT TAT TTG GTT GCC ACT	800
W Y N R C P R V I A Q K A V D Y L V A T	120
GGC AIT GGT GAT ACA GCA TTT TTT GGC CCT GAA GCT GAA TTT TTT ATC TTC GAT AGC GCC	860
G I G D T A F P G P E A E F P I F D S A	140
CGC TTT GCC CAA ACC GCT AAC GAA GGT TAC TAC TTC CTC GAC TCT GTA GAG GGT GCT TGG	920
R F T A Q T A N E G Y Y F L D S V E G A W	160
AAT TCT GGT AAA GAA GGT ACA GCA GAC AAA CCC AAC TTG GCT TAC AAA CCA CGT TTT AAA	980
N S G K E G T A D K P N L A Y K P R F K	180
GAG GGT TAT TTC CCT GTT TCC CCC ACA GAT TCT TTC CAA GAC ATC CGC ACA GAA ATG CTG	1040
E G Y F P V S P T D S F Q D I R T E M L	200
TTG ACG AIT GCG GAA TTA GGA GTC CCC ATC GAA AAA CAT CAC CAC GAA GTT GCT ACT GGT	1100
L T M A K L G V P I E K H H E V A T G	220
GGT GAT TGC GAA CTT GGT TTG CGC TTC GGT AAG TTA ATC GAA GCT GCT GAC TGG CTG ATG	1160
G Q C E L G L R F G K L I E A A D W L M	240
AIT TAC AAA TAT GTC ATC AAG AAC GTT GCC AAA AAA TAT GGC AAA ACC GTC ACC TTC ATG	1220
I Y K Y V I K N V A K K Y G K T V T F M	260
CCA AAA CCA ATT TTT GGC GAT AAC GGT TCT GGT ATG CAC TGT CAC CAA ICT ATC TGG AAG	1280
P K P I F G D N G S G M H C H Q S I W K	280
GAT GGT AAA CCC CTC TTT GCA GGT GAC CAG TAT GCT GGT TTA AGT GAA ATG GGA CTG TAC	1340
D G K P L F A G D Q Y A G L S E M G L Y	300
TAC AIT GGT GGT CTT CTC AAG CAC GCC CCA GCA CTG TTG GCA ATC ACC AAC CCC AGC ACC	1400
Y I G G L L K H A P A L L A I T N P S T	320
AAC TCC TAC AAA CGC CTA GTT CCC GGT TAT GAA GCG CCA GTT AAC TTG GCT TAC TCC CAA	1460
N S Y K R L V P G Y E A P V N L A T G	340
GGT AAC CGT TCT GCT TCC ATC CGG AIT CCT TTG TCT GGC ACT AAC CCC AAA GCC AAG CGT	1520
G N R S A S I R I P L S G T N P K A K R	360
TTA GAG TTC CGT TGT CCA GAT GCT ACC TCT AAC CCT TAT TTG GCA TTT GCT GCC ATG CTG	1580
L E F R C P D A T S N P Y L A F A M L	380
TGC GCT GGT ATC GAT GGT ATC AAG AAC AAA ATT CAT CCT GGT GAG CCA TTA GAT AAA AAT	1640
C A G I D G I K N K I H P G E P L D K N	400
ATC TAT GAA CTT TCT CCA GAA GAA TTG GCA AAG GTT CCT TCC ACA CCC GGT TCT TTA GAG	1700
I Y E L S P E E L A K V P S T P G S L E	420
CTA GCA TTG GAA GCA CTA GAA AAC GAC CAC GCT TTC TTA ACA GAT ACA GGC GTA TTC ACC	1760
L A L E A L E N D H A F L T D T G V F T	440
GAA GAC TTT ATC CAA AAC TGG AIT GAC TAC AAA CTC GCT AAC GAA GTT AAA CAG ATG CAA	1820
E D F I Q N W I D Y K L A N E V K Q M Q	460
CTG CGT CCT CAT CCT TAT GAG TTC TCT ATC TAT TAC GAC GTT TAA TTAACACCTGTTAGCAAIT	1884
L R P H P Y E F S I Y Y D V STOP	474
TATATCTGAGAGTCAAAATATTGCACCCATAAGGGTGGTTTTTTGCTTCTGTAAAAATATGTATAAGTACATTAGGG	1963
AAGTAACTCATCGTTGAAATTACTTCCACTAATAAGAACCATGACTTAAACATGAGTAAAACTTAGCTCATCGAAGCAT	2042

FIGURA 9. Secuencia de nucleótidos del gen *glnA* de *A. azollae* y secuencia de aminoácidos deducida.

Sobre la secuencia de nucleótidos se muestran las posibles cajas -10 y -35 de la región promotora del gen.

volvió a comprobar la capacidad de conferir prototrofia para glutamina al transformar la estirpe ET6017. Además, dicha estirpe transformada con pJL1, así como los otros dos clones seleccionados, presentaban actividad GS transferasa.

glnA de *Anabaena* 7120 y el gen *glnA* de *A. azollae*, tanto en la región codificante como en la zona promotora de ambos genes, variando normalmente los nucleótidos en las terceras posiciones de los codones. Cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas, se observó una identidad del 98 %, como cabría esperar dada la alta homología de las secuencias de DNA de los dos genes. La GS de *A. azollae* y la GS de *A. 7120* sólo difieren en 9 aminoácidos, situados mayoritariamente en el extremo amino de la proteína, donde el grado de conservación que se observa es menor cuando se comparan estas proteínas con la de otros procariontes como *E. coli* (Figura 10).

3.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA GSI DE *A. azollae*.

3.3.1. Elección de las mutaciones específicas.

El hecho de que el residuo Asp-50 de la GS de *E. coli* estuviera implicado en la unión y desprotonización del amonio durante la catálisis de la enzima, nos condujo a realizar distintas mutagénesis dirigidas en el residuo equivalente de la GS de *A. azollae*, Asp-51. Para examinar la esencialidad y funcionalidad tanto del tamaño como de la carga eléctrica de este residuo, se diseñaron cinco cambios en esta posición:

- Ser y Glu, que aunque varía el tamaño del residuo, se mantiene la presencia de un grupo -OH en la cadena lateral.
- Asn, de tamaño similar al aspártico original pero que carece del grupo -OH y es por tanto neutro.
- Ala y Arg, en los que variaba tanto el tamaño como la carga del residuo.

3.3.2. Proceso de mutagénesis.

Para realizar la mutagénesis dirigida del residuo Asp-51 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos, donde las bases que difieren respecto a la secuencia del gen silvestre aparecen subrayadas:

Asp-Ser: 5'-GCTGGAACCGGAAAAAGGTAC-3'

Asp-Ala: 5'-GCTGGAACCGGCAAAAGGTAC-3'

Asp-Glu: 5'-GCTGGAACCTCAAAGGTAC-3'

Asp-Asn: 5'-GCTGGAACGTTAAAAAGGTAC-3'

Asp-Arg: 5'-GCTGGAACCGCGAAAAGGTAC-3'

Con cada uno de estos oligonucleótidos y el suministrado por el fabricante, denominado "U.S.E." (Pharmacia, Suecia), que provoca el cambio del sitio de

restricción *ScaI* del plásmido pUC19 por *MluI*, se llevó a cabo el proceso de mutagénesis, tal y como se describe en el apartado 2.6. Se utilizó para ello el plásmido pJL2, que se obtuvo insertando un fragmento *XbaI-SmaI* de 2,1 Kb, que contiene el gen *glnA* completo de *A. azollae* incluyendo la región promotora, en el plásmido pUC19, en la misma orientación que el promotor *plac* del plásmido (Figura 11).

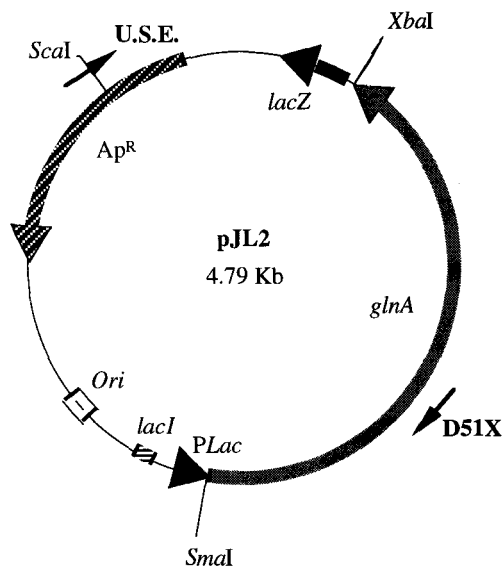


FIGURA 11. Esquema del plásmido pJL2 utilizado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida del gen *glnA* de *A. azollae*.

Un fragmento *XbaI-SmaI* de 2,1 Kb del plásmido pJL1 fue clonado en el plásmido pUC19. Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes. También se indican las zonas de hibridación de los oligonucleótidos "U.S.E.", que cambia el sitio de restricción *ScaI* por *MluI* en el plásmido pJL2 y los diseñados para cambiar el residuo Asp-51 por los distintos amonácidos.

Se obtuvieron numerosos clones en cada proceso de mutagénesis que fueron analizados mediante restricción de los plásmidos con la enzima *MluI*. Sólo se seleccionaron aquellos clones que presentaban un punto de corte para esta enzima. Algunos de estos clones fueron secuenciados, empleando para ello el oligonucleótido GS1 (5'-TTCATCGATACAGTAGGT-3') que hibrida en una posición cercana al residuo Asp-51 del gen *glnA*. La mayor parte de los clones contenían las mutaciones deseadas (Figura 12) y los plásmidos que los contenían se designaron como pD51E, pD51S, pD51A, pD51N y pD51R para los cinco mutantes dirigidos.

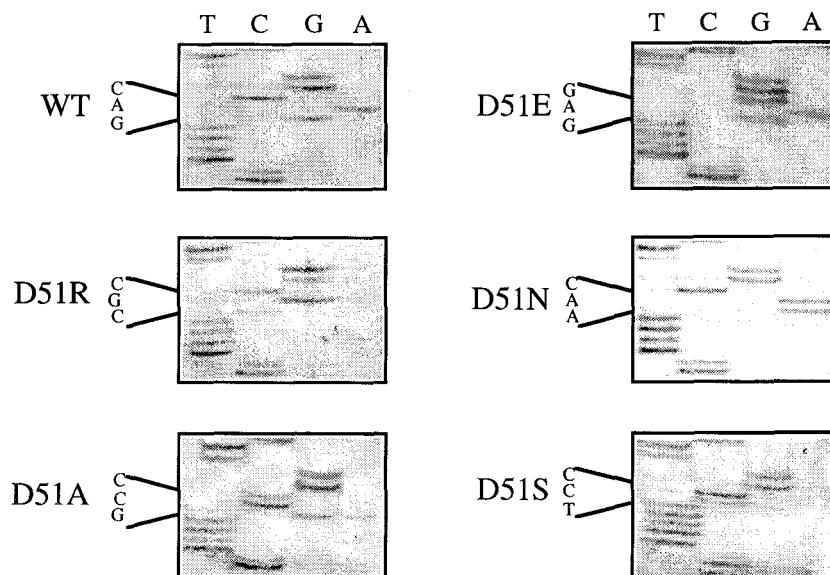


FIGURA 12. Secuenciación de la zona del gen *glnA* correspondiente a los nucleótidos que codifican el residuo Asp-51 en la proteína silvestre y en los cinco mutantes dirigidos.

3.4. ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DIRIGIDOS EN *E. COLI*.

3.4.1. Expresión del gen *glnA* de *A. azollae* y los cinco mutantes dirigidos en la estirpe de *E. coli* ET6017.

La expresión tanto de la GS silvestre como de los distintos mutantes dirigidos era un paso obligatorio para poder llevar a cabo una completa caracterización bioquímica de las proteínas. Para ello se empleó la estirpe mutante de *E. coli* ET6017 que carece de GS y es por tanto auxótrofa para glutamina. Además, se utilizaron las construcciones pJL2, pD51E, pD51S, pD51A, pD51N y pD51R que contienen el gen *glnA* y los distintos mutantes dirigidos, todas basadas en el plásmido pUC19 (Figura 11). Con estas construcciones se transformó la estirpe ET6017, que se cultivó en medio rico (LB). Se determinó la actividad transferasa de la GS en los distintos cultivos. Como se muestra en la Tabla 5, todas las estirpes de *E. coli* ET6017 transformadas con las construcciones anteriores presentaban actividad GS, siempre con valores inferiores a los obtenidos con la proteína silvestre, a excepción de la estirpe que contiene el plásmido pD51R en la que no se detectó actividad.

TABLA 5. Actividad de las GSs silvestre y mutantes dirigidos expresados en ET6017¹.

Proteína	Act. GS transferasa (U/mg)
Silvestre	1,897 ± 290
D51S	0,323 ± 25
D51A	0,122 ± 42
D51E	1,585 ± 240
D51N	0,097 ± 35
D51R	n. d. ²

¹Células competentes de la estirpe de *E. coli* ET6017 fueron transformadas con las construcciones pJL2, pD51S, pD51A, pD51E, pD51N y pD51R y cultivadas en medio LB a 37°C durante 12 h. Posteriormente se tomaron muestras de cada cultivo para determinar la actividad GS mediante el ensayo transferasa (apartado 2.2.1). ²No determinado: los valores de actividad menores a 0,005 U/mg no se consideraron.

3.4.2. Identificación del producto de expresión del gen *glnA* y los mutantes dirigidos en *E. coli*.

Para comprobar que las distintas versiones mutadas de la GS eran expresadas correctamente en la estirpe de *E. coli* ET6017, extractos crudos de células de dicha estirpe de *E. coli* transformadas con los plásmidos de los mutantes dirigidos, fueron sometidos a electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 12 % y posteriormente a inmunodetección con anticuerpos anti-GSI. Como se muestra en la Figura 13A, una banda mayoritaria a la altura de 50 KDa aparecía en las muestras en las que se expresaba la GS silvestre de *A. azollae* y las formas mutantes de esta proteína. Dicha banda se corresponde con la que se observa en la inmunodetección en las mismas muestras (Figura 13B).

Los resultados de la Tabla 5, junto con los obtenidos en la inmunodetección usando anticuerpos anti-GSI, indican que tanto la GS silvestre como los cinco mutantes dirigidos se expresan correctamente en *E. coli* aunque no todos eran igualmente funcionales.

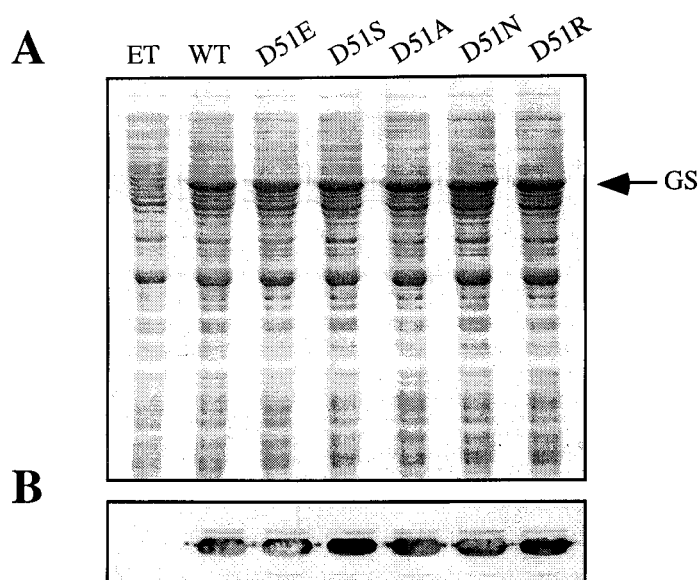


Figura 13. Expresión de las formas mutantes de la GSI de *A. azollae* en *E. coli* ET6017.

A) Electroforesis desnaturalizante en SDS de extractos crudos de células de *E. coli* ET6017 sin transformar (ET) o transformadas con los plásmidos pJL2 (WT) y los que contienen los distintos mutantes dirigidos de la GS de *A. azollae*. Con la flecha se señala la proteína GS producida en estas células. Cada carril contiene 30 μ g de proteína. B) Inmunodetección de los extractos crudos anteriores usando anticuerpos anti-GSI.

3.4.3. Complementación del mutante de *E. coli* ET6017 en medio mínimo.

Para analizar la funcionalidad de los cinco mutantes de GS se transformó la estirpe ET6017 con las construcciones pJL2, pD51E, pD51S, pD51A, pD51N y pD51R y el producto de la transformación se sembró en cajas de Petri con medio mínimo M9, incubándose a 37 °C al menos durante 48 h. Además, dado que en la GS de *E. coli* los cambios producidos en el residuo Asp-50 producen una alteración de la afinidad de la enzima por el sustrato amonio (Alibhai y Villafranca, 1994), la complementación de la estirpe ET6017 se realizó en medio mínimo M9 conteniendo distintas concentraciones de amonio.

Los resultados de la Tabla 6 indican que únicamente el mutante D51R no puede complementar la auxotrofia para glutamina independientemente de la concentración de amonio presente en el medio. Sin embargo, el mutante D51N sólo restaura la auxotrofia en concentraciones de amonio mayores de 5 mM y, aunque es capaz de complementar, muestra un crecimiento lento en concentraciones de amonio de 10 y 20 mM. El mutante D51A, aunque al igual que la GS silvestre y los mutantes D51E y D51S permitía el crecimiento en todas las concentraciones de amonio, presentaba un crecimiento lento cuando la cantidad de amonio en el medio fue muy baja (0,5 mM).

TABLA 6. Complementación de la estirpe ET6017 de *E. coli* en medio mínimo con las construcciones que expresan la GS de *A. azollae* y los cinco mutantes dirigidos.

Proteína	NH ₄ Cl presente en el medio mínimo (mM)					
	50	20	10	5	1	0,5
Silvestre	+ ^a	+	+	+	+	+
D51E	+	+	+	+	+	+
D51S	+	+	+	+	+	+
D51A	+	+	+	+	+	+/- ^b
D51N	+	+/-	+/-	- ^c	-	-
D51R	-	-	-	-	-	-

^a Crecimiento normal; ^b crecimiento mínimo; ^c no hay crecimiento.

Células competentes de ET6017 fueron transformadas con los plásmidos pJL2, pD51E, pD51S, pD51A, pD51N y pD51R (apartado 2.5.1), inoculadas en cajas con medio mínimo M9 e incubadas a 37°C durante 48 h.

3.5. PURIFICACIÓN DE LA GS SILVESTRE Y LOS CINCO MUTANTES DIRIGIDOS EXPRESADAS EN *E. coli*.

3.5.1. Purificación de la GS silvestre.

La GS silvestre de *A. azollae* expresada en *E. coli* se purificó con objeto de realizar un estudio cinético de la misma y comparar sus propiedades con las de los distintos mutantes dirigidos.

La purificación se llevó a cabo a partir de 3,2 gr de células (peso fresco) de la estirpe ET6017 transformada con la construcción pJL2, cultivadas en medio LB y recogidas mediante centrifugación. Las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) (tampón A) conteniendo PMSF 1 mM y se rompieron por tratamiento con ultrasonidos. El lisado se centrifugó a 18.000 rpm 15 min y el sobrenadante obtenido constituyó el extracto crudo.

La actividad GS presente en el extracto crudo se purificó hasta homogeneidad electroforética en tres etapas que se describen a continuación. Todo el proceso se realizó a 4 °C empleando el tampón A de forma estandar.

3.5.1.1. Precipitación al 35-70 % de saturación de (NH₄)₂SO₄.

Al extracto crudo se le añadió de forma gradual y con agitación constante (NH₄)₂SO₄ sólido hasta llegar al 35 % de saturación de dicha sal (apartado 2.3.3). El precipitado obtenido tras centrifugar la muestra se descartó y al sobrenadante se le

adicionó más $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, hasta llegar al 70 % de saturación. Tras centrifugar de nuevo, en este caso se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en aproximadamente 5 ml de tampón A.

Al final de esta etapa se recuperó un 83 % de la actividad inicial. Si bien la purificación obtenida fue pequeña, este paso permitió eliminar componentes celulares protéicos y no protéicos que podrían interferir en los siguientes pasos de purificación.

3.5.1.2. Cromatografía en DEAE-celulosa.

La preparación obtenida a partir de la precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (1,5 cm x 9 cm) equilibrada en tampón A. Tras lavar la columna con 3 volúmenes de lecho de este tampón a un flujo de 30 ml/h, la elución se llevó a cabo aplicando un gradiente de KCl 0-0,5 M en 60 ml de tampón A recogiendo fracciones de 2 ml. La actividad GS eluyó en un sólo pico a una fuerza iónica de 0.19 M de KCl (Figura 14). Las fracciones con alta actividad GS se reunieron para constituir el eluato de la cromatografía en DEAE-celulosa.

Al final de la etapa se recuperó el 35 % de la actividad inicial, con un factor de purificación de 2,5 veces.

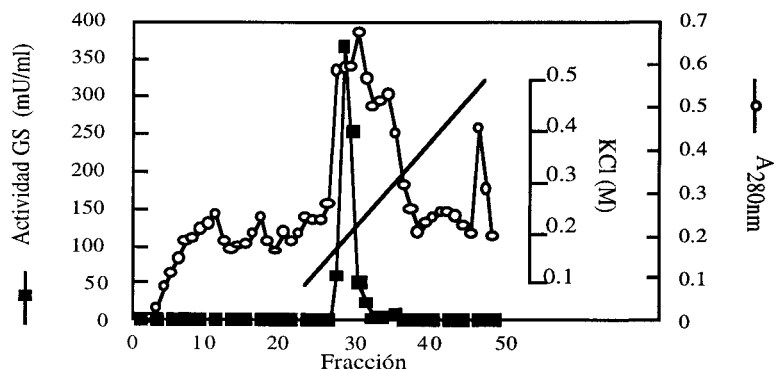


FIGURA 14. Perfil de elución de la GS recombinante en la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

Las condiciones de la cromatografía se indican en el apartado 2.3.2.1. Se aplicó a la columna una preparación procedente de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio conteniendo 249 U de actividad GS transferasa.

3.5.1.3. Cromatografía de afinidad en Blue-Sefarosa.

El eluato de la DEAE-celulosa obtenido en el paso anterior se diluyó hasta 50 mM KCl con tampón A y se aplicó a una columna de Blue-Sefarosa (1,5 cm x 10 cm), previamente equilibrada con el mismo tampón. La columna se lavó con 1,5 volúmenes de tampón A suplementado con KCl 0,3 M a una velocidad de 15 ml/h, recogiendo fracciones de 1,6 ml. La elución se llevó a cabo lavando de nuevo la columna con tampón A conteniendo en este caso KCl 0,4 M y ADP 2mM. Como se observa en la Figura 15, la adición de KCl 0,3 M provoca la elución de algunas proteínas contaminantes que permanecían unidas a la matriz pero no de la GS, que eluye específicamente cuando el tampón de lavado contiene ADP.

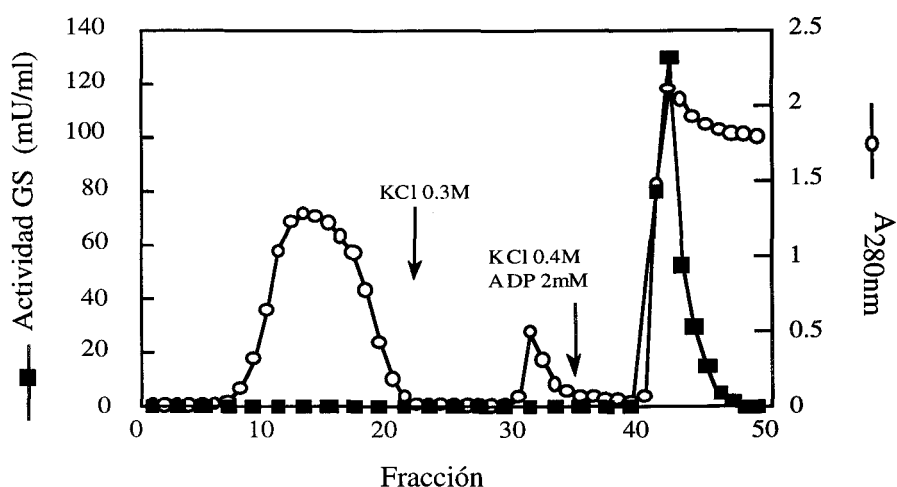


FIGURA 15. Perfil de elución de la GS recombinante en cromatografía de Blue-Sefarosa.

Las condiciones empleadas en esta cromatografía se describen en el apartado 2.3.2.2. Se aplicó una preparación procedente de la cromatografía en DEAE-celulosa que contenía 29.5 U de actividad GS.

Esta cromatografía constituyó la etapa más crítica de la purificación debido a la alta afinidad de la GS por la Blue-Sefarosa, que permitió eliminar la totalidad de las proteínas que permanecían unidas a la matriz. Las fracciones con alta actividad GS se reunieron para constituir el eluato de la cromatografía.

En la Tabla 7 se resumen todos los pasos de la purificación de la GS silvestre de *A. azollae* expresada en *E. coli*. La recuperación final del proceso fue del 50 % de la actividad inicial, consiguiéndose purificar la proteína a homogeneidad electroforética (Figura 16).

TABLA 7. Purificación de la GS de *A. azollae* expresada en *E. coli* ET6017^a.

Etapa	Act. (U)	Prot. (mg)	Act. esp. (U/mg prot)	Purif. (veces)	Recup. (%)
Extracto crudo	4326	345	12.5	1	100
35-70 % (NH ₄) ₂ SO ₄	3602	249	14.4	1.2	83
DEAE-celulosa	2305	29.5	78	6.25	53
Blue Sefarosa	2180	15.8	138	11	50

^a Material inicial: 3,2 g de peso fresco.

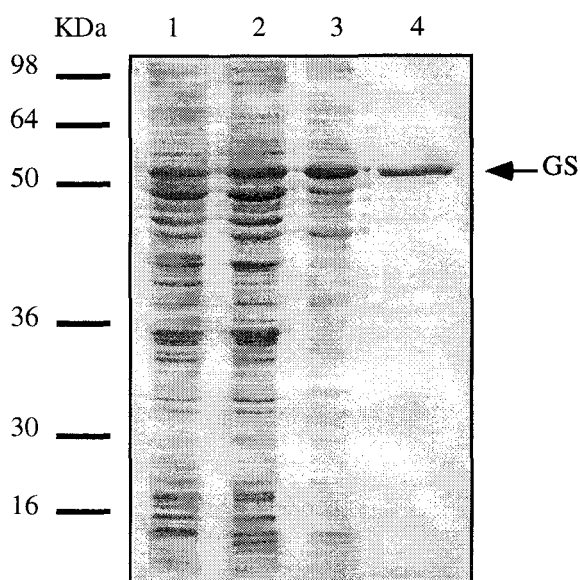


FIGURA 16. Patrones electroforéticos de proteínas de las diferentes etapas en la purificación de la GS silvestre recombinante.

Se muestra el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las muestras procedentes de cada etapa de purificación. Carril 1, extracto crudo (100 µg); carril 2, muestra procedente de la precipitación con sulfato de amonio (75 µg); carril 3, eluato de la cromatografía en DEAE-celulosa (20 µg); carril 4, GS purificada procedente de la cromatografía de afinidad en Blue-Sefarosa (1,5 µg). Las condiciones de la electroforesis y de la tinción con azul de Coomassie se detallan en los apartados 2.3.4.1 y 2.3.4.3.

Finalmente, el eluato de la cromatografía se concentró por ultrafiltración, centrifugándolo en microconcentradores Microsep 30K (Filtron, EE.UU.). Para reducir la concentración de ADP se añadieron 3 volúmenes de tampón A a la preparación una vez que ésta había sido concentrada hasta aproximadamente un volumen de 1,5 ml y se continuó concentrando la muestra hasta un volumen final de 1-1,5 ml.

3.5.2. Purificación de los mutantes dirigidos de la GS de *A. azollae*.

Los cinco mutantes dirigidos de la GS de *A. azollae* se purificaron hasta homogeneidad electroforética siguiendo el mismo método descrito para la proteína silvestre, salvo que, dado el bajo rendimiento obtenido en la cromatografía de intercambio iónico y la alta afinidad que presentaba la GS silvestre por la matriz de Blue-Sefarosa, se sustituyó la cromatografía de DEAE-celulosa por una de afinidad en Blue-Sefarosa. En este apartado se analizan por tanto únicamente las diferencias más significativas respecto al proceso de purificación.

Debido a la alta estabilidad de la GS silvestre que se observa en el extracto crudo, se empleó el mismo tampón de rotura (tampón A) para todas las proteínas mutantes. Tras someter dicho extracto crudo a la precipitación fraccionada al 35-70 % de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el precipitado final se resuspendió en un volumen de 10-15 ml de tampón A para ser aplicado a la primera columna de Blue-Sefarosa.

La primera cromatografía de afinidad en Blue-Sefarosa se realizó siguiendo la misma metodología descrita para la purificación de la GS silvestre. Una vez eluida la GS con 2 mM de ADP, se reunieron todas las fracciones con alta actividad GS, constituyendo el eluato de la primera cromatografía de afinidad. Los cinco mutantes dirigidos de la GS presentaban la misma afinidad que la proteína silvestre por la matriz de Blue-Sefarosa, lo que facilitó su purificación. La eliminación del ADP de esta preparación, que podría interferir en la segunda cromatografía de afinidad impidiendo la unión de la GS a la matriz, se llevó a cabo por precipitación del eluato al 60 % de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El precipitado obtenido se resuspendió en un volumen de 10-15 ml de tampón A, descartándose el sobrenadante en el cual estaba disuelto el ADP.

En la segunda cromatografía de afinidad en Blue-Sefarosa se aplicó a la columna el eluato resultante de la primera cromatografía de afinidad después de haber eliminado el ADP, procediendo de igual forma que en la purificación de la GS silvestre.

Finalmente, el eluato resultante se concentraba con el mismo tipo de microconcentradores empleados con la GS silvestre.

La purificación de todos los mutantes dirigidos se pudo seguir en sus distintas etapas mediante el ensayo transferasa de la GS, a excepción del mutante D51R que, al no poder detectarse dicha actividad, se tuvo que hacer un seguimiento por electroforesis en geles de poliacrilamida durante el transcurso de toda la purificación.

En la Figura 17 se muestra un ejemplo (en este caso, el del mutante D51E) de los patrones electroforéticos de las distintas etapas de la purificación de los mutantes dirigidos de la GS de *A. azollae*, ya que en los cinco casos se observó siempre el mismo patrón de purificación.



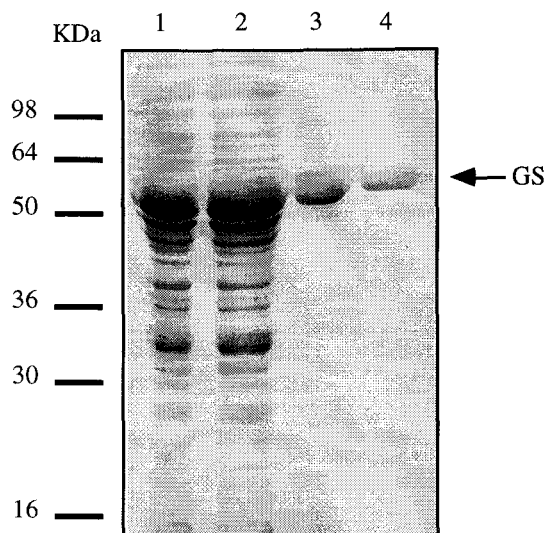


FIGURA 17. Patrones electroforéticos de proteínas de las diferentes etapas en la purificación del mutante dirigido de la GS D51E expresado en *E. coli*.

Electroforesis desnaturalizante en SDS de las muestras procedentes de cada paso de purificación. Carril 1, extracto crudo (75 µg); carril 2, muestra procedente de la precipitación con sulfato de amonio (55 µg); carril 3, eluato de la primera cromatografía de afinidad en gel de Blue-Sefarosa (4,5 µg); carril 4, GS purificada procedente de la segunda cromatografía de afinidad en Blue-Sefarosa (2,5 µg).

En las Tablas 8-11 se resumen todos los pasos de las purificaciones de las proteínas mutantes D51E, D51S, D51A y D51N. En todos los casos el porcentaje de actividad recuperada fue aproximadamente el mismo.

Como se puede observar en la Figura 18, tanto la GS silvestre como los cinco mutantes dirigidos fueron purificados hasta homogeneidad electroforética siguiendo los dos métodos de purificación descritos en este apartado.

TABLA 8. Purificación de la GS mutante D51S de *A. azollae* expresada en *E. coli* ET6017^a.

Etapa	Act. (U)	Prot. (mg)	Act. esp. (U/mg prot)	Purif. (veces)	Recup. (%)
Extracto crudo	1014	526	1,9	1	100
35-70 % (NH ₄) ₂ SO ₄	768	480	1,6	0,8	76
Blue-Sefarosa I	490	40,8	12	6,2	48
Blue Sefarosa II	395	15,8	25	13	39

^a Material inicial: 5 g de peso fresco.

TABLA 9. Purificación de la GS mutante D51A de *A. azollae* expresada en *E. coli* ET6017^a.

Etapa	Act. (U)	Prot. (mg)	Act. esp. (U/mg prot)	Purif. (veces)	Recup. (%)
Extracto crudo	175	352	0,49	1	100
35-70 % (NH ₄) ₂ SO ₄	148	282	0,52	1	84
Blue-Sefarosa I	99	33	3	6,1	56
Blue Sefarosa II	83	19,5	4,25	8,7	47

^a Material inicial: 5 g de peso fresco.**TABLA 10. Purificación de la GS mutante D51N de *A. azollae* expresada en *E. coli* ET6017^a.**

Etapa	Act. (U)	Prot. (mg)	Act. esp. (U/mg prot)	Purif. (veces)	Recup. (%)
Extracto crudo	31,6	276	0,114	1	100
35-70 % (NH ₄) ₂ SO ₄	30,2	212	0,142	1,25	95
Blue-Sefarosa I	23,5	29	0,81	7,1	74
Blue Sefarosa II	13,3	12,9	1,03	9	42

^a Material inicial: 4 g de peso fresco.**TABLA 11. Purificación de la GS mutante D51E de *A. azollae* expresada en *E. coli* ET6017^a.**

Etapa	Act. (U)	Prot. (mg)	Act. esp. (U/mg prot)	Purif. (veces)	Recup. (%)
Extracto crudo	8320	702	11,8	1	100
35-70 % (NH ₄) ₂ SO ₄	7728	615	12,5	1	93
Blue-Sefarosa I	4042	99	40,8	3,45	48,5
Blue Sefarosa II	3652	36,3	100	8,5	44

^a Material inicial: 7 g de peso fresco.

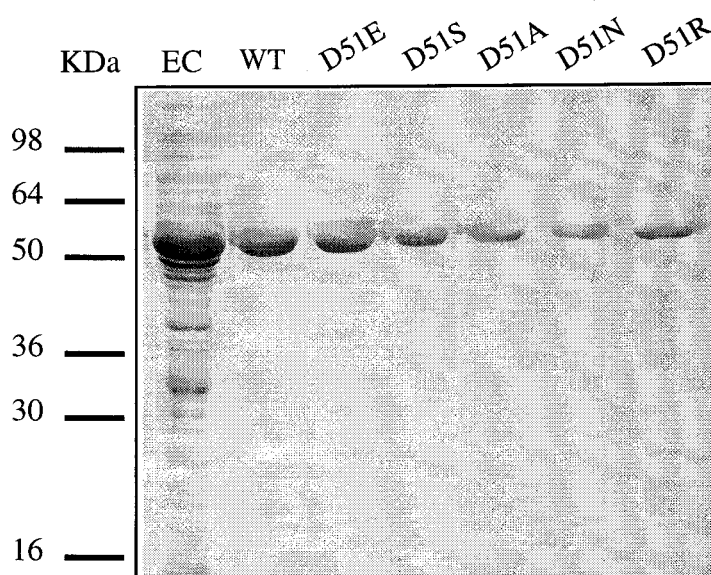


FIGURA 18. Patrones electroforéticos de las GS silvestre y los cinco mutantes dirigidos purificados.

Electroforesis desnaturalizante en SDS de un extracto crudo de *E. coli* expresando la GS silvestre de *A. azollae* (EC) y de las GS purificadas, tanto silvestre (WT) como de los distintos mutantes dirigidos (D51E, D51S, D51A, D51N y D51R).

3.6. CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA GS SILVESTRE Y DE LOS CINCO MUTANTES DIRIGIDOS.

Todos los estudios cinéticos de la GS silvestre de *A. azollae* y los mutantes dirigidos en el residuo Asp-51 se llevaron a cabo utilizando preparaciones enzimáticas purificadas.

3.6.1. Actividades biosintética y transferasa.

Con objeto de realizar un estudio comparativo de las actividades biosintética y transferasa de la GS silvestre y los distintos mutantes dirigidos, muestras de las proteínas purificadas se sometieron a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 6.25 % (apartado 2.4.3.2). Tras la electroforesis se ensayaron *in situ* la actividad biosintética y transferasa según se describe en los apartados 2.4.3.4 y 2.4.3.5. La detección *in situ* de la actividad transferasa presenta el inconveniente de la alta inestabilidad del γ -GHA producido durante la reacción, por lo que resulta difícil obtener una imagen adecuada del ensayo. Como se observa en la Figura 19, los mutantes dirigidos D51S, D51A y D51N mostraban una actividad transferasa menor que la proteína silvestre. En el caso del mutante D51E, la actividad detectada en gel fue similar a la de la GS silvestre. Por otra parte, en el mutante D51R

nunca se llegó a visualizar señal alguna como consecuencia de la formación del γ -GHA durante el ensayo. En la reacción biosintética, los cinco mutantes dirigidos presentaban una actividad menor que la proteína silvestre, siendo apenas detectable en los mutantes D51E y D51N. Mediante la tinción de las proteínas con azul de Coomassie se pudo observar que no existía ninguna diferencia en la movilidad electroforética de las GSs mutantes respecto a la proteína silvestre.

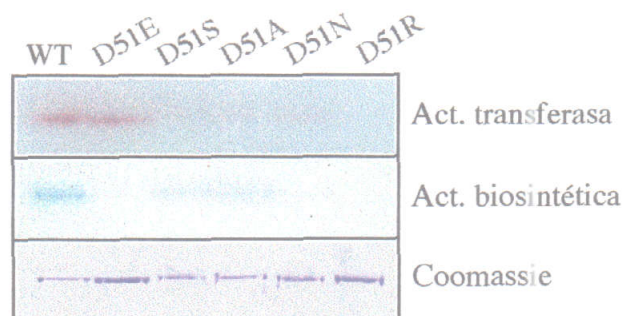


FIGURA 19. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes de las GSs purificadas.

Cada carril contiene 2,5 μ g de proteína purificada que se analizó por electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida y se detectó mediante ensayo *in situ* de la actividad GS transferasa, de la actividad GS biosintética o por tinción con azul de Coomassie.

En la Tabla 12 se muestra el resultado de la cuantificación de las actividades transferasa y biosintética de la GS silvestre y los cinco mutantes dirigidos realizadas con las proteínas purificadas. La actividad biosintética se midió mediante el ensayo acoplado de la GS, según se describe en el apartado 2.2.2.

TABLA 12: Actividades específicas de las GSs purificadas silvestre y mutantes^a.

Proteína	Act. biosintética (%)	Act. transferasa (%)
Silvestre	100 ^b	100 ^c
D51S	24 \pm 4	15 \pm 1
D51A	6.5 \pm 1.5	4.0 \pm 1.2
D51E	4.5 \pm 1.2	86.5 \pm 2
D51N	1.7 \pm 0.7	2.4 \pm 0.2
D51R	n. d.	n. d.

^a Las actividades biosintética y transferasa se determinaron según se describe en los apartados 2.2.2 y 2.2.1, respectivamente. ^b El 100 % de actividad biosintética corresponde a 8400 moles gln/ mol GS min. ^c El 100 % de actividad transferasa corresponde a 29262 moles de γ -glutamihidroxamato/mol GS min.

3.6.2. Constantes de Michaelis-Menten (K_m).

Con objeto de estudiar la afinidad de la GS de *A. azollae* y de los mutantes dirigidos por los distintos sustratos en la reacción biosintética, se realizaron ensayos seriados variando la concentración del sustrato estudiado en cada caso. En todos los ensayos se mantenían siempre los demás sustratos a concentraciones saturantes para no limitar la reacción. Los valores de las distintas K_m se obtuvieron tras realizar representaciones de Lineweaver-Burk de dobles inversos ($1/[S]$ frente a $1/v$). En la Tabla 13 se muestran dichos valores para la GS silvestre y los mutantes dirigidos. Los resultados obtenidos para la proteína silvestre son similares a los ya descritos para la GS purificada de la cianobacteria *Anabaena* 7120 (Orr y Haselkorn, 1981b), como era de suponer dada la alta identidad de ambas proteínas.

TABLA 13. Constantes de Michaelis-Menten (K_m) y catalíticas (k_{cat}) de las GSs recombinantes¹.

Proteína	K_m (mM)			k_{cat} (s ⁻¹)
	NH ₄ ⁺	glutamato	ATP	
Silvestre	0.05	1.50	0.21	42
D51S	5.95	0.37	0.07	13.1
D51A	12.45	0.32	0.05	2.6
D51E	0.55	16	10.6	0.33
D51N	0.92	0.85	0.12	0.96
D51R	n. d. ²	n. d.	n. d.	n. d.

¹Las condiciones de ensayo biosintético son las estándar (apartado 2.2.2), excepto que el sustrato cuya K_m se estudia se añade a distintas concentraciones no saturantes. Los datos de velocidad inicial obtenidos se representan en función de la concentración de sustrato utilizada en cada ensayo ($1/v$ frente a $1/[S]$). A partir de la V_{max} obtenida de las representaciones de dobles recíprocos y teniendo en cuenta el peso molecular de la GS, se determinaron las k_{cat} de cada enzima. ²n. d., no determinado.

Todas las proteínas mutantes presentaban una afinidad mucho más baja por el amonio, siendo 120 y 240 veces menor para las proteínas D51S y D51A, respectivamente. Para los otros dos sustratos del ensayo biosintético, glutámico y ATP, sólo la GS mutante D51E tenía unos valores de K_m más elevados. Para el resto de los mutantes estos valores fueron similares o incluso menores.

3.6.3. Constantes catalíticas (k_{cat}).

Con los resultados obtenidos de las representaciones de los dobles recíprocos en los ensayos de actividad de las proteínas purificadas, se determinaron la velocidad máxima de las enzimas y el número de moléculas de glutamina formadas por segundo por molécula de GS o constante catalítica de la reacción (Tabla 13). Así mismo, también se determinaron las constantes específicas (k_{cat}/K_m) para los tres sustratos de la reacción biosintética de la GS en la enzima silvestre y en los mutantes dirigidos (Tabla 14).

TABLA 14. Constantes específicas para los diferentes sustratos de las proteínas purificadas recombinantes.

Proteína	$k_{cat}/K_m^{NH_4^+}$ ($s^{-1} mM^{-1}$)	k_{cat}/K_m^{glu} ($s^{-1} mM^{-1}$)	k_{cat}/K_m^{ATP} ($s^{-1} mM^{-1}$)
Silvestre	435	27.8	193
D51S	2.2	34.8	182
D51A	0.2	8.1	47
D51E	0.6	0.02	0.03
D51N	1.0	1.1	7.7

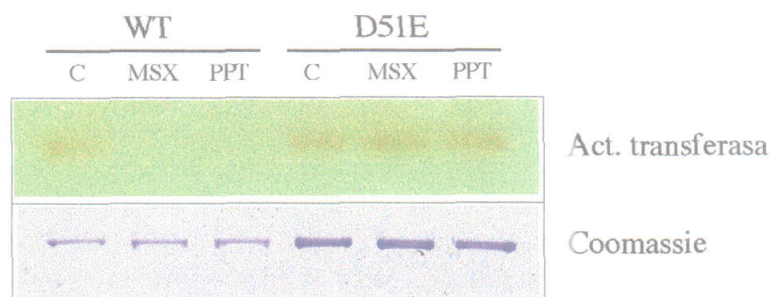
3.6.4. Efecto de los inhibidores MSX y PPT sobre la actividad GS en las proteínas silvestre y mutantes.

El MSX y la PPT son compuestos análogos del glutámico que actúan como inhibidores competitivos de la actividad GS (Weisbrod y Meister, 1973; Logusch *et al.*, 1990). Tanto la proteína silvestre como los mutantes dirigidos fueron inactivados *in vitro* según se describe en Materiales y Métodos (apartado 2.2.3). Los resultados de la Tabla 15 muestran que la actividad transferasa de la proteína silvestre y de los mutantes D51S, D51A y D51N fue completamente inhibida a una concentración de 0.5 mM para ambos compuestos. Sin embargo, en la proteína mutante D51E la inhibición fue sólo de un 7 % con MSX y un 70 % con PPT. En la Figura 20 se muestra un ensayo *in situ* de la actividad transferasa de las proteína silvestre y mutante D51E sin inactivar e inactivadas con MSX o con PPT a una concentración de 0.5 mM para cada uno de ellos. Mientras que la actividad en la GS silvestre se inhibía completamente con ambos compuestos, en la proteína mutante D51E se visualizaba el γ -GHA producido en el ensayo transferasa en presencia de MSX o PPT.

TABLA 15. Inactivación de las GSs purificadas silvestre y mutantes con MSX y PPT¹.

Proteína	Inactivación (%)	
	MSX	PPT
Silvestre	100 ²	100
D51E	7 ± 4.5	70 ± 4.5
D51S	100	100
D51A	100	100
D51N	100	100

¹ Muestras de cada proteína purificada (5 µg) fueron incubadas *in vitro* en presencia o ausencia de MSX o PPT a una concentración final de inhibidor de 0,5 mM (apartado 2.2.3) y posteriormente se ensayó la actividad transferasa (apartado 2.2.1) de cada muestra. ²Los valores de inactivación corresponden al porcentaje de actividad GS que ha sido inactivada por el inhibidor.

**FIGURA 20. Electroforesis en condiciones no desnaturizantes de la GS silvestre y la forma mutante D51E inactivadas con MSX o con PPT.**

Muestras purificadas de la GS silvestre y de la forma mutante D51E (3,5 y 5 µg, respectivamente) fueron inactivadas *in vitro* con los inhibidores MSX y PPT (apartado 2.2.3), posteriormente se sometieron a electroforesis en condiciones no desnaturizantes y la actividad GS transferasa se detectó mediante el ensayo *in situ* descrito en el apartado 2.3.4.4 o se tiñeron con azul de Coomassie.

Con objeto de caracterizar más a fondo la inhibición producida por el MSX y la PPT en la GS silvestre y en la proteína mutante D51E, se llevaron a cabo inactivaciones *in vitro* (apartado 2.2.3) de ambas proteínas con diferentes concentraciones de inhibidor. La actividad de la enzima silvestre fue completamente inhibida por ambos compuestos con concentraciones menores de 10 µM, mientras que la actividad del enzima D51E apenas fue alterada por el MSX, incluso a una concentración de 10 mM (Figura 21A). Sin embargo, dicha enzima mutante sí que se inactivaba con PPT,

aunque con una concentración de inhibidor casi 10^3 veces superior a la requerida para inactivar la proteína silvestre (Figura 21B).

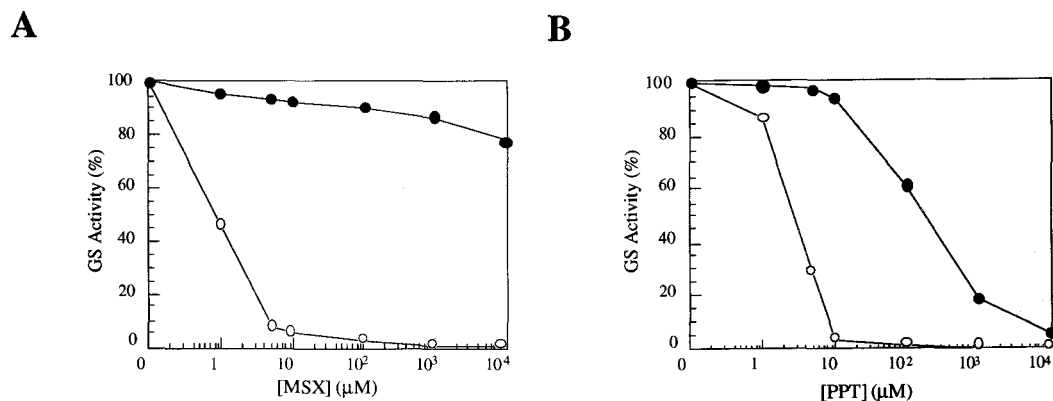


FIGURA 21. Inactivación de la GS silvestre de *A. azollae* y el mutante dirigido D51E con MSX o con PPT.

Muestras purificadas de las GS silvestre (O) y de la forma mutante D51E (●) fueron inactivadas con diferentes concentraciones de los inhibidores MSX (A) o PPT (B), según se describe en el apartado 2.2.3, determinándose posteriormente la actividad GS transferasa. El 100 % de actividad de la GS silvestre correspondió a 1,4 U/mg y para la enzima mutante fue de 1,1 U/mg, tanto en las inactivaciones con MSX como con PPT. En todos los casos se empleó la misma cantidad de proteína purificada, que fue 4,5 μg para la GS silvestre y 5,5 μg para la forma mutante D51E.

Se han determinado las constantes de inhibición (K_i) para ambos compuestos en la GS silvestre y en la forma mutante D51E tanto para la reacción biosintética como para la transferasa, dada la diferencia que había entre ambas actividades en la proteína D51E. Para ello se utilizó la representación de Dixon para inhibidores competitivos en la que se representa $1/v$ frente a la concentración de inhibidor en presencia de diferentes concentraciones fijas de sustrato (Figura 22).

En la Tabla 16 se muestran los valores de K_i estimados a partir de las representaciones anteriores. Como se puede observar, las K_i de la GS silvestre son similares para el MSX y la PPT en las reacciones biosintética y transferasa. Sin embargo, estos valores fueron mucho más elevados en la proteína mutante en ambas reacciones, con una diferencia de cuatro órdenes de magnitud para el MSX y tres órdenes para la PPT.

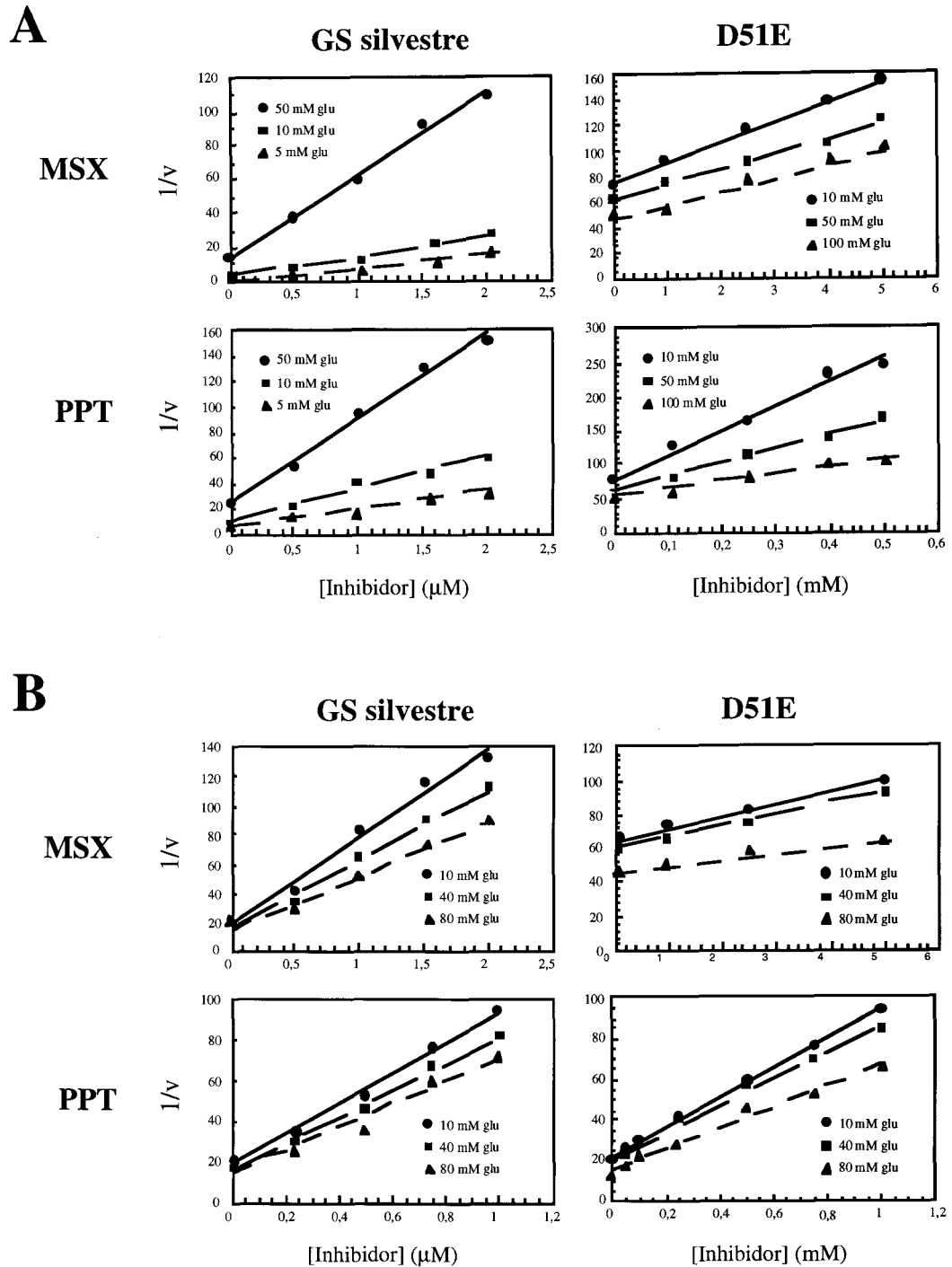


FIGURA 22. Representaciones de Dixon para el cálculo de los valores de K_i para el MSX y la PPT en la GS silvestre de *A. azollae* y la forma mutante D51E.

Las actividades GS biosintética (A) y transferasa (B) fueron determinadas en las proteínas silvestre y mutante variando la concentración de inhibidor y en presencia de distintas concentraciones de glutamato para el ensayo biosintético, o de glutamina para el ensayo transferasa. En cada ensayo de la enzima silvestre se emplearon 4 μ g, tanto para la actividad biosintética como para la actividad transferasa. Con la GS mutante D51E se emplearon 8 μ g para los ensayos de actividad transferasa y 40 μ g para los biosintéticos, debido a la baja actividad biosintética que presenta esta forma mutante. El método gráfico de análisis empleado fue la representación de Dixon.

TABLA 16. Valores de K_i de la GS silvestre y de la forma mutante D51E para los inhibidores MSX y PPT en las actividades biosintética y transferasa¹.

Proteína	K_i (μ M)			
	Ensayo biosintético		Ensayo transferasa	
	MSX	PPT	MSX	PPT
WT	0.2	0.3	0.2	0.3
D51E	2940	100	4510	290

¹Los valores de K_i fueron obtenidos como se describe en el apartado 2.2.3 empleando el método de Dixon.

3.7. REGULACIÓN POR FUENTE DE NITRÓGENO DE LA GS DE *A. azollae*.

Los resultados de la caracterización bioquímica realizada con la GS silvestre y sus formas mutantes indican que, entre otros factores, la afinidad por el sustrato amonio de los mutantes dirigidos se veía significativamente alterada en comparación con el valor obtenido en la proteína silvestre. Como un paso previo a la introducción de las formas mutantes del gen *glnA* en *Anabaena* por conjugación, es necesario realizar una completa caracterización de la GS en esta cianobacteria tanto a nivel de actividad como de expresión del gen.

El efecto regulador que produce la fuente de nitrógeno presente en el medio sobre la enzima GS ha sido ampliamente estudiado en numerosas cianobacterias, fijadoras y no fijadoras de dinitrógeno (REFS). Generalmente, los niveles más altos de actividad GS se dan en medio carente de nitrógeno combinado (REF) y, en presencia de amonio la expresión del gen *glnA* y la actividad GS están fuertemente reprimidas (REF). Por tanto, se llevó a cabo un estudio de la regulación de esta enzima en *A. azollae* cultivada en presencia de distintas fuentes de nitrógeno.

3.7.1. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre los niveles de actividad GS y de RNAm del gen *glnA*.

Anabaena azollae fue cultivada en medio BG11 con diferentes fuentes de nitrógeno: nitrato, amonio o ausencia de nitrógeno combinado. Cuando los cultivos se encontraban en fase exponencial de crecimiento (5-7 μ g clorofila/ml de cultivo), se tomaron muestras para determinar la actividad y cantidad de proteína GS mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GSI (apartado 2.3.5). Asimismo, también se determinaron los niveles de expresión del gen *glnA* por hibridación de RNA total de la cianobacteria con un fragmento *HincII* de 818 pb interno al gen *glnA* de *A. azollae* (apartado 2.4.3.2).

Como se muestra en la Figura 23A, el nivel más elevado de actividad se dió con nitrato como fuente de nitrógeno, siendo un 20 % mayor que el detectado en ausencia de nitrógeno combinado. Sin embargo, cuando *A. azollae* fue cultivada en presencia de amonio como única fuente de nitrógeno, la actividad GS que se encontró fue mucho menor, en torno a un 25 % del nivel detectado con nitrato. Los niveles de proteína GS que se detectaron mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GSI fueron similares en las diferentes condiciones de cultivo (Figura 23A).

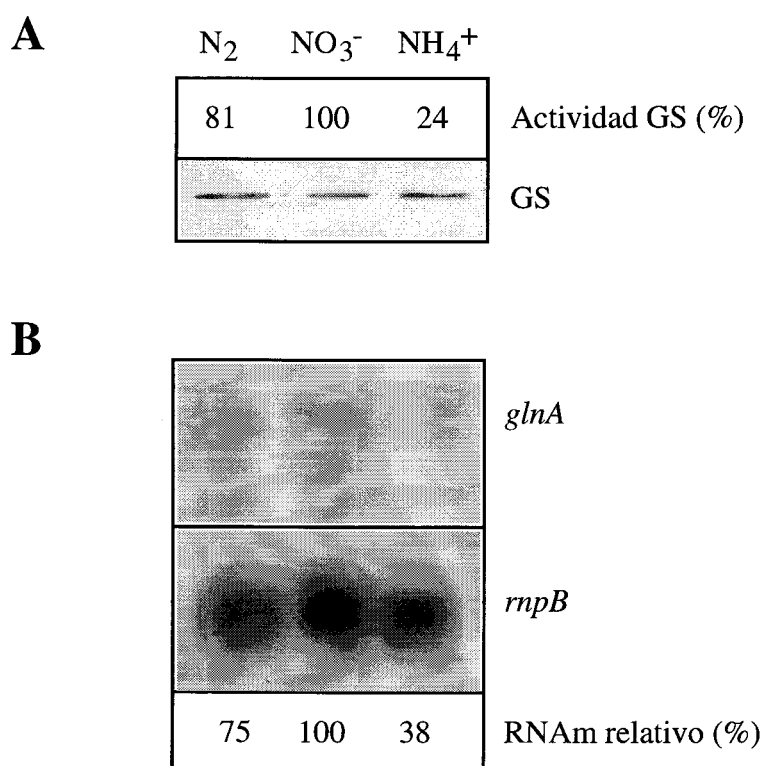


FIGURA 23. Niveles de actividad GS, proteína GSI y transcrito *glnA* de *A. azollae* cultivada con distintas fuentes de nitrógeno.

A) Niveles de actividad GS y proteína GSI en células de *A. azollae* en fase exponencial de crecimiento (3-5 µg clf/ml) cultivadas en medio con nitrato, amonio o en condiciones de fijación de nitrógeno molecular. El 100 % de actividad GS corresponde a 488 mU/mg. Los datos son medias de tres experimentos independientes, con un error estandar para todos los valores menor del 8 %. Extractos crudos procedentes de células de *A. azollae* cultivadas en las distintas condiciones nitrogenadas fueron sometidas a analisis por inmunodetección con anticuerpos anti-GSI. Cada carril contiene 25 µg de proteína.

B) RNA total (15 µg) extraído de células de *A. azollae* en fase exponencial de crecimiento cultivadas en las tres condiciones nitrogenadas anteriores, se desnaturalizó, se separó en electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se hibridó empleando como sonda un fragmento de DNA *HincII* de 818 pb interno al gen *glnA* de *A. azollae*. Tras la hibridación, los filtros se lavaron y se rehibridaron con una sonda del gen que codifica el RNA de la RNasaP (*rnpB*) de *Synechocystis* 6803 (fragmento *HindIII* de pAV1100, 450 pb). Los niveles de RNAm fueron cuantificados mediante un aparato InstantImager. Los valores son media de dos hibridaciones independientes.

El análisis mediante *Northern blot* del RNA total aislado mostró un transcrito de aproximadamente 1,7 kb (Figura 23B). Los niveles de RNAm del gen *glnA* fueron más altos en células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, aproximadamente un 25 % más elevados que en condiciones de fijación de nitrógeno molecular. Sin embargo, en presencia de amonio el nivel de transcrito *glnA* disminuyó hasta un 38 %.

Estos resultados demostraban que, al igual que ocurre en otras cianobacterias, la regulación tanto de la actividad GS como de la expresión del gen *glnA* de *A. azollae* dependía de la disponibilidad de nitrógeno.

3.7.2. Inactivación por amonio de la GSI de *A. azollae*.

La actividad GS, tanto de tipo I como de tipo III, están fuertemente reguladas en cianobacterias por la presencia de amonio en el medio, produciéndose una rápida inactivación de la enzima tras la adición de amonio (Mérida *et al*, 1991a; Reyes, 1994). Con objeto de comprobar si la actividad GS de *A. azollae* también se encuentra regulada por amonio de igual forma que en otras especies de *Anabaena* (ref), a células de *A. azollae* cultivadas en nitrato o en condiciones de fijación de dinitrógeno se les añadió amonio a una concentración final de 1 mM, tomándose muestras a distintos tiempos para determinar la actividad GS y la cantidad de proteína mediante Western blot. Como se observa en la Figura 24A, el nivel de actividad GS fue de un 40 % del nivel inicial después de 2 h de la adición de amonio a un cultivo de *A. azollae* con nitrato, llegando hasta un 30 % a las 3 h. Sin embargo, cuando *A. azollae* se cultivó en ausencia de fuente nitrogenada, se necesitaron 6 h para conseguir una disminución del 40 % (Figura 24B). En ambas condiciones de cultivo, los niveles de proteína GS se mantenían estables, por lo que la caída de la actividad tras la adición de amonio se debe más bien a una inactivación de la enzima que a una disminución en la cantidad de proteína (Figura 24C).

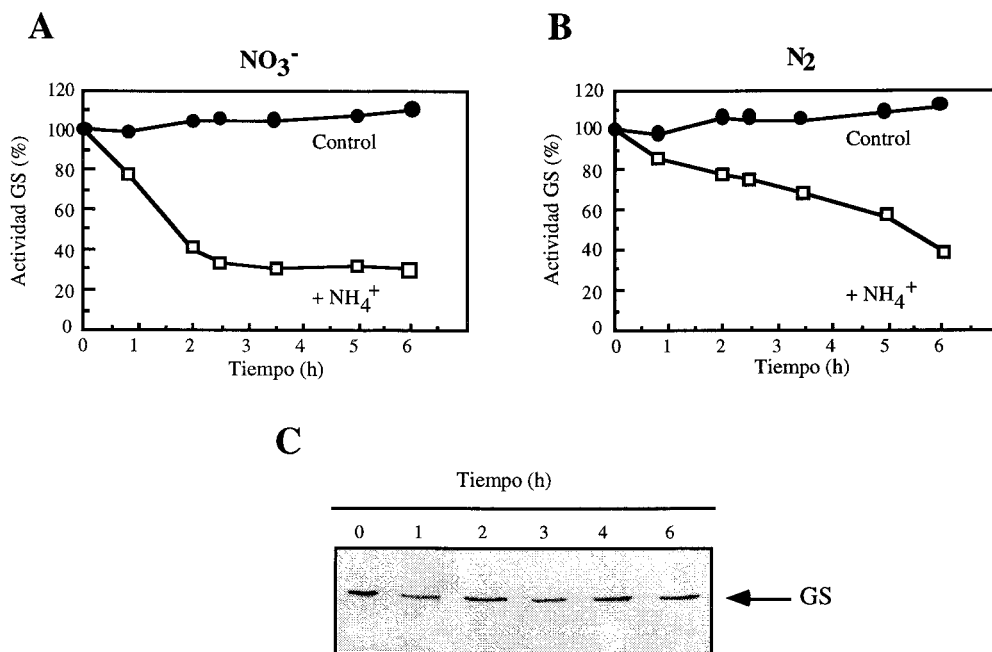


FIGURA 24. Inactivación de la actividad GS de *A. azollae* por amonio. A células de *A. azollae* en fase exponencial de crecimiento cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno (A) o en ausencia de nitrógeno combinado (B), se les añadió amonio a una concentración final de 5 mM. A los tiempos indicados se tomaron muestras para determinar la actividad GS. Se muestra un experimento típico. El 100 % de actividad GS corresponde a 120 mU/mg para las células cultivadas en nitrato y 96 mU/mg para las cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno molecular. (C) El nivel de proteína GS se determinó también en el transcurso de la caída de actividad provocada por la adición de amonio a células de *A. azollae* cultivadas en presencia de nitrato mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GSI.

3.9. ANÁLISIS DE LOS MUTANTES DIRIGIDOS DE LA GSI DE *A. azollae* EN CIANOBACTERIAS.

Para realizar un estudio de los mutantes dirigidos de la GS en *A. azollae* es necesario introducir en el genoma de esta cianobacteria una copia mutante del gen *glnA* que contenga la mutación dirigida. Como se ha descrito anteriormente, la transferencia de DNA a estirpes filamentosas de cianobacterias se lleva a cabo habitualmente mediante un sistema de conjugación interespecífica desde *E. coli* a la cianobacteria (Wolk *et al.*, 1984). Es necesario para esta transferencia el uso de un vector movilizable mediante conjugación, que porte la versión mutante del gen. El plásmido pRL277 es portador de genes de resistencia a estreptomicina y espectinomicina, además del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* y la región *bom* ("basis of mobilization") del plásmido pBR322. Esta región hace que los plásmidos derivados de pRL277 puedan ser introducidos en *Anabaena* mediante conjugación desde *E. coli*.

De los cinco mutantes dirigidos sólo seleccionamos tres: las proteínas D51S y D51A, porque presentaban una mayor actividad biosintética, y la proteína D51E porque a pesar de su baja actividad biosintética, mostraba resistencia a los inhibidores MSX y PPT. Se construyeron tres plásmidos diferentes, denominados pAzS, pAzA y pAzE, que contenían respectivamente las proteínas mutantes D51S, D51A y D51E (Figura 25A). Para ello se insertó en el plásmido pRL277 un fragmento de DNA de 4,1 kb que contenía:

- un fragmento *ClaI* de 560 pb de la zona 5' del gen *glnA* de *A. azollae* que incluye la región promotora del gen y parte de la zona codificante de la proteína, justo hasta el residuo Gln-39

- el gen *npt* en orientación opuesta al gen anterior y que confiere resistencia al antibiótico neomicina

- una copia completa del gen *glnA* de *A. azollae* con la mutación dirigida en el residuo Asp-51, en orientación opuesta al gen *npt* y por tanto en igual orientación que el fragmento *ClaI* del mismo gen (Figura 25A).

La introducción de la mutación dirigida del gen *glnA* de *A. azollae* en el genomio de esta cianobacteria puede ocurrir mediante un doble suceso de recombinación entre la copia cromosómica del gen *glnA* y las dos copias plasmídicas del mismo gen, tal y como se ilustra en la Figura 25B. De esta forma se produce también la integración del gen *npt*, que permite seleccionar los dobles recombinantes por resistencia a neomicina. Sin embargo, esta estrategia presenta dos inconvenientes. Por un lado, se pueden seleccionar también colonias resistentes a neomicina si se produce la integración del plásmido completo en el genomio mediante un único suceso de recombinación. Estos mutantes resistentes a neomicina se pueden identificar de los dobles recombinantes gracias a la presencia en el plásmido del gen *sacB*, que codifica la enzima levansacarasa, una proteína cuya producción es inducida por la sacarosa (Gay *et al.*, 1985). La expresión del gen *sacB* es letal para algunas bacterias Gram (-) cuando estas se cultivan en presencia de sacarosa al 5 % en medio sólido (Gay *et al.*, 1983 y 1985; Reid y Collmer, 1987). Se ha descrito que esta letalidad condicional afecta también a las células de *Anabaena* (Cai y Wolk, 1990), por lo que se empleó este método de selección para la mutagénesis del gen *glnA*. Por otra parte, la integración de la mutación dirigida sólo puede ocurrir si el suceso de recombinación que hemos denominado R2 en la Figura 25B, tiene lugar más allá del residuo Asp-51, por lo que un porcentaje de los dobles recombinantes resistentes a neomicina no tendrán integrada la mutación puntual. La presencia en el plásmido pAzX del fragmento *ClaI* del gen *glnA* de *A. azollae*, donde debe ocurrir uno de los sucesos de recombinación, podría contribuir a que la otra recombinación tenga lugar más allá del residuo Asp-51. De esta forma se integraría la zona del gen *glnA* con la mutación puntual en la copia cromosómica de este gen.

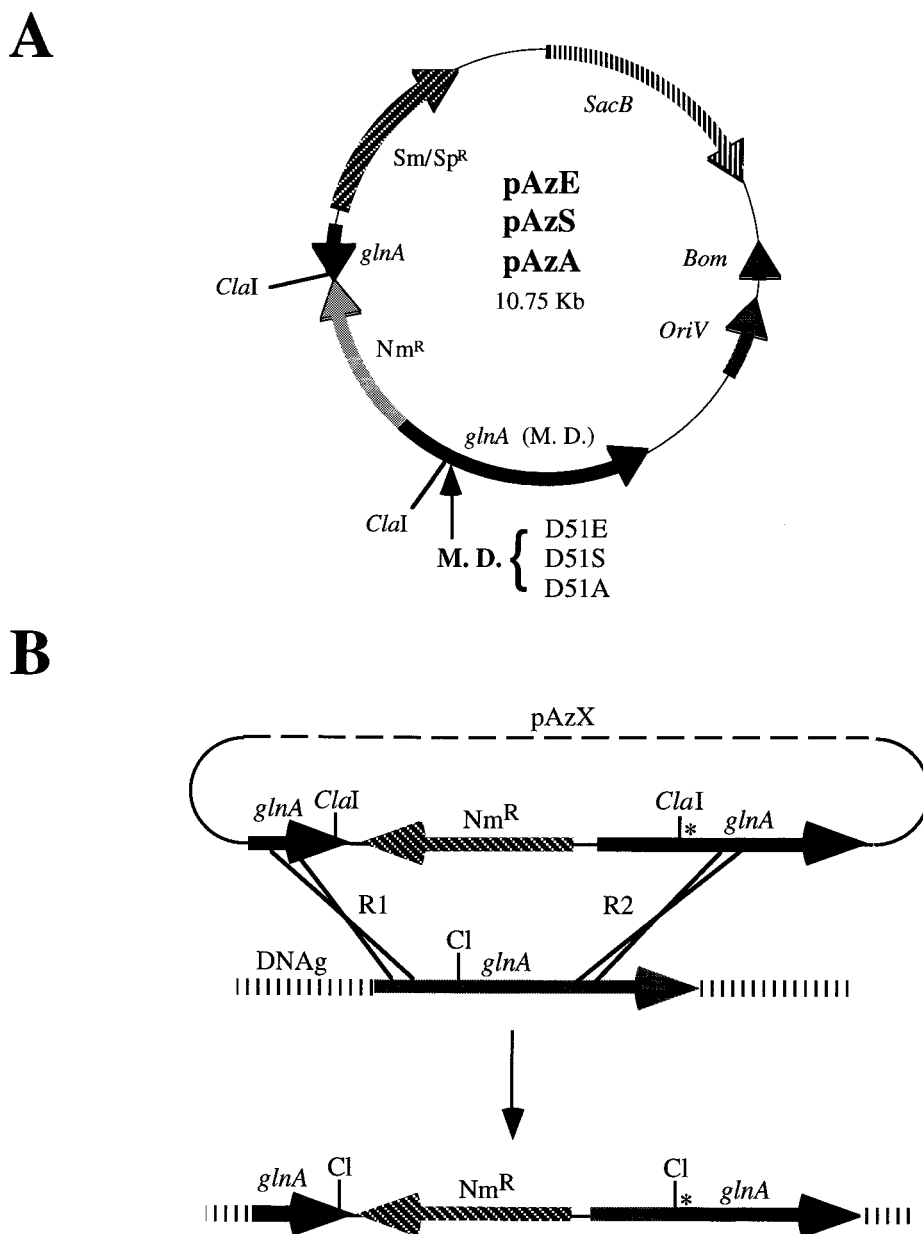


FIGURA 25. Esquema de los plásmidos empleados en la conjugación de *Anabaena* y mecanismo de mutagénesis para la integración de mutaciones puntuales en el gen *glnA* de *Anabaena*.

A) Esquema del plásmido construido para la conjugación de *Anabaena*. En color negro se muestra el gen *glnA* completo portador de la mutación dirigida y en fragmento *ClaI* de 560 pb de la zona 5' de dicho gen. Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes. Los plásmidos pAzS, pAzA y pAzE difieren tan sólo en la mutación puntual del gen *glnA*. B) Esquema del proceso de mutagénesis empleado en *Anabaena* para la introducción de la mutación dirigida del gen *glnA* de *A. azollae*, marcada con un asterisco. Los dos sucesos de recombinación que deben ocurrir a ambos lados del gen *npt* para que se produzca la integración del mismo en el *DNAg* de *Anabaena*, se han designado como R1 y R2.

3.9. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEN *glnN* DE *Pseudanabaena* SP. PCC 6903.

Recientemente se ha identificado la presencia de GS tipo III en la cianobacteria *Synechocystis* 6803, donde ha sido clonado el gen estructural de esta enzima, *glnN* (Reyes y Florencio, 1994). Además de en *Synechocystis* 6803, la GSIII también ha sido identificada en otras cianobacterias (Reyes y Florencio, 1994; García-Domínguez *et al.*, 1997), entre las que se incluye *Pseudanabaena* 6903, una especie que se encuentra bastante distanciada filogenéticamente de la mayoría de las cianobacterias (Giovannoni *et al.*, 1988). Dado que en *Synechocystis* 6803, la GSIII parece tener un papel secundario frente a la GSI, que es la más abundante en la célula, y que además este tipo de GS se expresa fundamentalmente en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Reyes y Florencio, 1994; Reyes *et al.*, 1997), nos propusimos buscar otras cianobacterias donde la GSIII pudiera tener funciones menos secundarias respecto a la GSI. La cianobacteria *Pseudanabaena* 6903 era un candidato adecuado para llevar a cabo este proyecto.

3.9.1. Clonación del gen *glnN* de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903.

La clonación del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia de complementación que la empleada en la clonación del gen *glnA* de *A. azollae*. De igual forma, en primer lugar hubo que construir una genoteca de *Pseudanabaena* 6903, siguiendo la metodología que se describe en los apartados 2.4.5 de Materiales y Métodos y 3.1.1 de Resultados. En este caso, se obtuvo una genoteca de 2×10^4 clones. Al transformar el mutante de *E. coli* ET6017 con la genoteca de *Pseudanabaena* 6903 se obtuvieron seis colonias capaces de complementar la auxotrofía de glutamina en medio mínimo. Se aislaron los plásmidos de los seis clones y tras un análisis con diferentes enzimas de restricción se comprobó que los seis clones contenían un mismo fragmento de DNA de 5,5 Kb.

Con el fin de realizar un primer análisis del tipo de GS expresada en los seis clones aislados, se llevó a cabo una inmunodetección a partir de extractos crudos de dichos clones con anticuerpos anti-GSI y anti GSIII (apartado 2.3.5). Como se observa en la Figura 26, una única banda fue reconocida por los anticuerpos anti-GSIII en los seis clones, mientras que no se observó ninguna señal con los anticuerpos anti-GSI. Al parecer, en todos los clones se expresaba una misma proteína que era reconocida por los anticuerpos anti-GSIII. La presencia de una GS tipo III en *Pseudanabaena* 6903 con el uso de estos mismos anticuerpos había sido ya detectada en nuestro laboratorio (García-Domínguez *et al.*, 1997). Se seleccionó uno de estos clones, que se denominó pJL10, para proceder a la secuenciación del fragmento de DNA clonado y comprobar si en él se encontraba el gen *glnN* que codifica la GS tipo III de *Pseudanabaena* 6903.

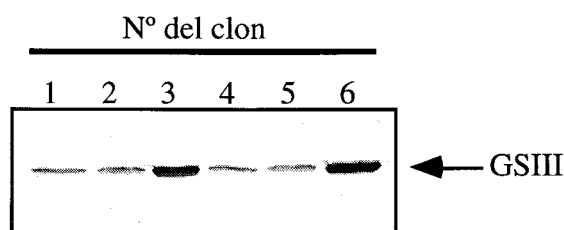


FIGURA 26. Inmunodetección de la GS tipo III en los clones complementantes de *E. coli* ET6017.

Extractos crudos de los seis clones (1-6) de la estirpe de *E. coli* auxótrofa de glutamina ET6017 obtenidos por complementación en medio mínimo, fueron sometidos a inmunodetección mediante anticuerpos anti-GSIII obtenidos con la GSIII purificada de *Synechocystis* 6803. Cada carril contiene 15 μ g de proteína.

3.9.2. Secuenciación y análisis de la secuencia del gen *glnN*.

Para la secuenciación del fragmento de DNA clonado en el plásmido pJL10 se subclonó un fragmento *Xba*I de dicho plásmido de aproximadamente 4,5 Kb en el plásmido pBS. La construcción resultante, que complementaba la auxotrofia del mutante de *E. coli* ET6017, se denominó pJL11 y se empleó para realizar delecciones seriadas con exonucleasa III, según se describe en el apartado 2.4.2.1. El análisis de la secuencia de dicho fragmento reveló una ORF de 2172 pb que codificaría una proteína de 724 aminoácidos (Figura 27) con una masa molecular de 79.503 Da.

La secuencia de nucleótidos se comparó con las secuencias disponibles en los bancos de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL, Heidelberg y GenBank). Se encontró una alta identidad (74 %) con la GSIII de *Synechocystis* 6803 y bastante menor con las GSs de *B. fragilis* y *B. fibrisolvans* (45 y 38 %, respectivamente), dos bacterias anaeróbicas estrictas pertenecientes a la familia *Bacteroidaceae*. El alineamiento de dichas secuencias mostró que aminoácidos críticos que se encuentran en zonas con una alta similitud entre las GSs procarióticas y eucarióticas y que están implicados en la función catalítica de la proteína (Pesole *et al.*, 1991) están conservados. También se encontraron otras regiones con una alta identidad que podrían ser asignadas sólo a las GS tipo III (Figura 28).

ATTCGGGGCAATATTCCATCGCGCAATCACAGTGTGCTACTACCAAAGTCAATAGCGATCGCGCTCAATAAITATCCTT	79
ACCTAATAACTAAAATAAACAGCATAATCTGTAACCTATAATTTTTTGTGCGCGTTTATACCAATCAAGTGGCATCTA	158
ATCGGTATCTTTTTTATCTATTGTGATAAATATATCTTGAGTATCATTGTAGAAACTTGACAATAATCTCTAAAACAACC	237
ATG AGC GGA AAC GAG TCG CGC ATT CAA GCT ATT TAT CAG ATC ACC AAT CGC GAA CCC CAG	297
M S G N E S R I Q A I Y Q I T N R E P Q	20
CCA AAG AAG GCT CCA AAG CGG TTG GAG GAG ATG TGG GCA ACC GAT GTG TTT ACT CTG AGT	357
P K K A P K R L E E M W A T D V F T L S	40
AAA ATG CAA GAG TGT CTA CCT AAG ACA GTC TTT AAG TCG ATC AAG AAA ACA ATT CAG ACT	417
K M Q E C L P K T V F K S I K K T I Q T	60
GGT GAG CCT CTT GAT ATC TCA GTA GCT GAT GCG ATC GCA TTG GCA ATG AAG GAT TGG GCA	477
G E P L D I S V A D A I A L A M K D W A	80
ATT TCT AAA GGC GCA TTG TAT TAC GCC CAC GTC TTT TAT CCT CTG ACC AAT GCA ACC GCC	537
I S K G A L Y Y A H V F Y P L T N A T A	100
GAA AAG CAT GAT GGC TTT ATT TCA GTA CAG AGT GAT GGT TCA GCA ATT TCC GAA TTT GCA	597
E K H D G F I S V Q S D G S A I S E F A	120
GGC AAA TTA TTA GTT GAT GGT GAA CCT GAT GGT TCT TCT TTC CCC AAT GGT GGT ATC CGC	657
G K L L V Q G E P D G S S F P N G G I R	140
TCC ACC TTT GAG GCA CGC GGC ATC ACA GCA TGG GAT GTA ACC AGC CCT GCA TAC ATC ATG	717
S T F E A R G I T A W D V T S P A Y I M	160
GAA ACC GAT AAT GGT TCC ACC CTC TGT ATT CCT ACG GTT TTC GTA TCT TGG ACT GGA GAA	777
E T D N G S T L C R I P T V F V S W T G E	180
GCT CTA GAC AAA AAG ACT CCT ATC CTC CGT TCT AAT GCG GCA ATG AAT AAG GCT GCC ACC	837
A L D D K K K T P I L R S N A A M N K A A T	200
AGA GTT CTA AAA CTC TTG GGC GAA AAA GAT ATT GCC CCT GTT AAC TCT AGT TGT GGT GCT	897
R V L K L L L G E K D I A P V N S S C G A	220
GAG CAA GAA TAT TTC TTG GTT GAT GCT AAT TTT GCT AAT GCC CGT CCT GAC TTG TTG CTA	957
E Q E Y F L V D A N F A N A R P D L L T	240
GCA GGT CGC ACA CTT TTT GGT AGA CCA TCG GCT AAG GGG CAG CAA TTT GAT GAC CAT TAC	1017
A G R T L F G G R P S A K G Q Q F D D H Y	260
TTT GGC GCA ATC CCA GAG CGC GTC CAA GTA TTC ATG CAA GAT GTT GAA GAG CGA CTC TAT	1077
F G A I P E R V Q V F M Q D V E E R L Y	280
CGC CTT GGG ATT CCT GCG AAG ACT CGT CAT AAC GAA GTA GCT CCT GGA CAG TTT GAA ATT	1137
R L G I P A K T R H N E V A P G Q P E I	300
GCC CCT GTA TTT GAA GCA GCA AAC GTG GCA ACC GAT CAC CAA CAA ATG ATC ATG ACC ATC	1197
A P V F F E A A N V A T D H Q Q M I H T I	320
GTG CGC TTT ACT GCG AAG AAG CAT GGA TTT GTT TGC TTA CTC CAC GAA AAA CCC TTC GCT	1257
V R F T A K K H G F V C L L H E K P F A	340
GGT ATT AAC GGT TCT GGT AAG CAC GTT AAC TGG TCT GTT GGT AAC GCC ACT CAA GGT AAC	1317
G I N G S G K H V N W S V G N A T Q G N	360
TTG CTC GAT CCC GGC GAT ACC CCT CAC TCC AAC GCA CAG TTC CTA GTG TIC TGT GGT GCG	1377
L L D P G D T P H S N A Q F L V F C G A	380
GTT ATT CGC GGT ATT CAC AAA TAT GGC CCT TTG TTG CGC TCC GTT GTA GCA ACT GCT GGT	1437
V I R G G I H K Y G P L L R S V V A T A G	400
AAT GAC CAC CGT TTA GGT GCG AAC GAA GCT CCT CCT GCA ATT ATC TCG GTT TAC TTG GGT	1497
N D H R L G A N E A P P A I I S V Y L G	420
TCA CAG CTT GAG GAT GTA TTT GAG CAA ATT GCA AGG ACG AAT CTA AAG AGT TCG ACT GGT	1557
S Q L E D V F E Q I A R T N L K S S T G	440
AAA GGT CAG ATG CAC AIT GGT GTA GAC ACC TTG CCC GTA TTG CCA ACC GAC CCC GGC GAT	1617
K G Q M H I G V D T L P V L P T D Y G D	460
CGC AAC CGT ACT TCG CCT TTT GCT TTT ACA GGC AAC CGT TTT GAG TTC CGT GCC GTT GGT	1677
R N R T S P F A F T G N R F E F R A V G	480
TCT AAT CAA TCT GTA TCT GGC CCT CTG GCG ATG AAT TCC ATC TTG GCG GAT TCG CTA	1737
S N Q S V S G P L V A M N S I L A D S L	500
AAC TGG GTA GGC GAT CAG CTT GAA GCC GAA ATT GCC AAA GGT TTG GGA TTA AAC GAT GCC	1797
N W V G D Q L E A E I A K G L G L W D A	520
ATT GCT ACG GTA CTG AAG CAA GTC ATG GAA TTG CAT GGC GCG ATC ATC TTC AAT GGC AAT	1857
I A T V L K Q V M E L H G A I I F N G N	540
GGT TAC TCT GAA GAG TGG CAC AAG GAA GCT GTT GAA CAA CGT GCG TTA CGC AAC CTT CGC	1917
G Y S E E W H K E A V E A L R N L R	560
ACC ACT GCT GAT GCT TTG CCT GTG TTG AAG GAG CCA GAA GTT GAA GAA TTG TTC AGT AAG	1977
T T A D A L P V L K E P E V E E L F S K	580
CTC GGT GTT TTA TCT CCT GTT GAT TTC AGT AGC CGC TTT GAA ACT TAC GCT GAG CAA TAT	2037
L G V L S P V E F S S R F E T Y A E Q Y	600
ATT CTC TCG ATT GAG GTG GAG GCT AAG CTA GTT GTC AGC ATG GTC AAG ACC ATG ATC TAT	2097
I L S I E V E A K L V V S M V K T M I Y	620
CCT GCA GCA ACT CGC TAT CTA GCT GAT CTG TCA AAT ACA GCT CTT AGC CTT AAG GAA ATG	2157
P A A T R Y L A D L S N T A L S L F E M	640
GGT ATG GAC TTT GAT AAG GAA ACC CTT GAG AAG GTT TCA TCT CTT ACC AAG TCG ATG ATG	2217
G M D F D K E T L E K V S S L T K S M M	660
GAT TGT GCC AGC AAG CTT ACC GAT GCG CTA GGG CAG CAT GAT TTT GCA TCT CCT GAA GAA	2277
D C A S K L T D A L G Q H D F A S F E E	680
CAT ATG CAG TTC ATC TCC CAC ACC ATC CGT CCT TTG ATG GAT ACA ACC CGT ACC TAT GTT	2337
H M Q P I S H T I R P L M D T T R T Y V	700
GAT ACC CTA GAG GGT GAA TTG GCT GAT GAC CTA TGG CCA TTG CCA ACT TAC CAA GAA ATG	2397
D T L E G E L A D D L W P L P T Y Q E M	720
CTG TTC ATC AAG TAA GTAACCTAAACCTCAAACCTGTGGCGCAGCATGCGCCACAGGTTTGAGCTCTGGGCTTTA	2471
L F I K STOP	724
ATTGCAATTTTTGATGCTAAAAGCGAATGGCAAGAACCTAGTTCTCGCCATCGCTTTTTGTGTTAGAGTAGCTCTGTAG	2550
AGCGTTCGGCAAGCTTAGAACGCTCACCTTTACTCAGGGTATATGCCCGCTAAA	2570

FIGURA 27. Secuencia de nucleótidos del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 y secuencia de aminoácidos deducida.

Sobre la secuencia de nucleótidos se muestran las posibles cajas -10 y -35 de la región promotora del gen.

Pseuda 6903	MSGNESRIQAIYQITNR--EPQPKKAPKRLEEMWATDVFTLSKMQECLPKTVFKS IKKTIQ	59
Syn 6803	MTGNAARTQSVHQIINR-PLSSGKLSRLEDMWAENVFNLSKMQASLPKGVFKS IKNTIT	59
B. fragi	MS--KMRFFALQELSNRKPLEITTPSNKLSDYASHVFDKRMQEYLPKEAYKAVVDAT	58
R. flave	-----MEKVADYFGSMVFDRIKMATLSEKVIKSLKRTID	35
B. fibri	-----MIEASKLTTEFGSLVFNDKIMKERLPKDIYKAVHKTIE	38
	** * *	
	A	
	TGEPLDISVADAIALAMKDWAIKSGALYYAH-VFYPLTNATAEKHDGFISVQSDGSAISE	118
	TGEKLDPSVADAVATAMRDWAMGKGYAH-VFYPMTNLSAEKHDFISVQGDGNVISE	118
	KGTPISEMADLIANGMKSWAKSLNVTHYTH-WFQPLTDGTAEKHDGFIEFGEDGEVIER	117
	RGTPLDISVANAVAAMKDWAIELGATHYTH-WFQPMGTGVTAEKHDSFISPAEDGRVIMQ	94
	KEPHLEPGCSYSSNHEGVGNREQC YHFTPPGSSPMTGLTAEKHDSFISPTEDGRSSWS	98
	***** ** **	
	I	
	FAGKLLVQGEFPGSSFPNGGIRSTFEARGITAWDVTSPAYIMETDNGSTLCIPTVFSWT	178
	FSGKVLVQGEFPGSSFPNGGIRDTFEARGYTGWDVTSPAYIMETDNGSTLCIPTVFSWT	178
	FSGKLLIQGEFPGSSFPNGGIRNTFEARGYTAWDSSPAFVVDT----TLCIPTIFISYT	173
	FSGKELVKGEFPGSSFPNGGLRATFEARGYTAWDPTSAYAFVKDG----TLYIPTAFCSYT	150
	SQEKSWLRANLMHQASQWSSCHNSMRYQHGLHHHAFIKDG----SLLPTAFCSYG	154
	* ** * * * *	
	B C	
	GEALDKKTPILRSNAAMNKAATRVLKLGEKDIAPVNSSCGAEQEYFLVDANFANARPDL	238
	GEALDKKVPLLRSIAAMDKAARKVLSLGNEDIAHVNSSCGAEQEYFLVDANFASQRPDL	238
	GEALDYKTFPLLKALAAVDKAAATEVCQLF-DKNITRVFTNLGWEQEYFLVDTSLYNARPDL	232
	GEALDKKVPLLRSMEAINKQALRILKLFNGTKVKS IKTSVGEQEYFLVDRELWKQRKDL	210
	GEALDRDS-LLRSMEALSNEAVKMMRLGVEDVNRVNTTIGSEQEYFLIDKDFYKRRKDL	213
	***** * * * * *	
	D II	
	LLAGRTLFGRPASAKGQFDDHYFGAIPERVQVFMQDVEERLYRLGIPAKTRHNEVAPGQF	298
	LLAGRTLFGKLPKAGQEFDDHYFGAIPERVQVFMQDVEETLYRLGIPAKTRHNEVAPGQF	298
	RLTGRITLMGHSSAKDQQLLEDHYFGSIPPRVTAFMKELEIECHRLGIPVTRHNEVAPNQF	292
	MNTGRTLFGAMPKQEMDDHYFGSIPPRVAEYMDLDRDLWRLGILAKTKHNEVAPAQH	270
	LLTGRITLIGAPASKGQEMEDHYFGVIKPKVSAYMHDLDDEELWRLGIPAKTKHNEVAPSQH	273
	***** * * * * *	
	II III	
	EIAHVFEEANVATDHQQMIMTIVRFTAkkHGfVCLLHEKPFAGINGSgKHVNWSVGNATQ	358
	EIAHVFEEANVASDHQQLLMTVLKNTAKKHGfVCLLHEKPFAGINGSgKHVNWSVGNSTQ	358
	ELAHVFENCNLANDHNLVMDLMKRIARKHFAVLPHEKPYNGVNGSGKHNNWSLCTDTG	352
	ELAHVYDTTNIADHNQLTMEVMQKVALRHGLVCLLHEKPFAGVNGSGKHNNWSISTDQG	330
	ELAHVFETANIAVDHNQLTMEVMKVKADKHNYACLHEKPFAGVNGSGKHNNWSICTDTG	333
	* * * * * * * * * * *	
	E	
	GNLDPGDTPHSNAQFLVFCGAVIRGIHKYGPLLRSVVATAGNDHRLGANEAPPAILISVY	418
	GNLDPGDSPHDNAQFLVFCGAVIRGVHKGPLMRAAIATASNDHRLGANEAPPAILMSVY	418
	INLFAPGKNPKGNMLFLTFLVNVLMVHKQDILLRASIMSGNSHRLGANEAPPAILSIF	412
	ENLLSPGETPAENAQFLFLAAVIKAVDDYQDLLRLSVATAGNDHRLGANEAPPAVISIF	390
	INLLDPGKNPGENIPLVFLMSVIAAVIDEYAPILRLSVASAGNDHRLGANEAPPAILSIF	393
	* * * * * * * * * * *	
	IV V	
	LGSQLEDVFEQIAR--TNLKSS-TGKGQMHIGVDTLVLPDTPGDRNRTPPFATGNRFE	475
	LGTQLEEVFEQIKT--GSVKDS-KKKGVMDLGVLDLTKDAGDRNRTPPFATGNRFE	475
	LGSQLSATLDEIVRQVTNSKMPPEKTTLLKLGIGRIPEILLDTDRNRTPPFATGNRFE	472
	LGDELTAVLDAIEK--DVPYGGTAKEKMKLGVLDLQFSKDTDRNRTPPFATGNRFE	447
	VGDELAEVLKAVEAG-EAYKAA--GKSQMTWEQQYF-TFTKNDTDRNRTPPFATGNRFE	449
	* * * * * * * * * * *	
	V	
	FRAVGSNQSVSGFLVAMNSILADSLNWVDQLEAEIAKGLGLNDAIATVLKQVMELHGAI	535
	FRAVGSSQSVSGFLVIVLNTMLADSLNWIGDRLEAEIAKGLDLDTAIILTVLKEIMENHGQV	535
	FRAAGSSANCAAAAMIAINAAMANQLENEFKASVDKLMEEGIGKDEAIFRILKENIIASELI	532
	FRLGSSNSISCANIHNAVAEVLVRFADKLENAK---DFNKS LHD LIRKTIKAKKRI	503
	S-DGGHSSVANGKYGPQHMQLQKEVATLNAKLSAYS--GDELKEKVKVELKETLLAKHRV	506
	*	
	IFNGNGYSEEWKHAVEQRALRNLRTTADALPVLKEPEVEELFSKLGVLSPVEFSSRFET	595
	IFGNGYSEEWKMAVEERGLANLRTTADALPVLKEKYEIEDLFEKTGVLPVELESRFEV	595
	RFEGDGYSEEWKQEAAR-RGLTNICHVPEALMHYMDNQSRVAVLIGERIFNETELACRLEV	591
	IFNGNGYDDAWIAEAEK-RGLMNLKTTADAMPHICDKKNVMDLTSHGIFTEAEIIFSRDI	562
	LFNGNGYTDWEVVEAAK-RGLPNLKALPDCMPYWISDESIDLFRHGIFTEAEIISRYEI	565
	* * * * * * * * * * *	

YAEQYILSIEVEAKLVVSMVKMTMIYPAATRYLADLSNTALSLKEMG-----MDFD- KE	647
YAEQYILSIEVEAKLVVSMKACTVIYPAAVEYLSKLSSTIASLSGLG-----IDFE- KE	647
ELEKYTMKVQIESRVLGDLAINHIVPIAVSYQNRLLLENLCRMKEIFSEEEYVMSADR KE	651
MLENYIKTVNIEAVTMVDMARKEIIPAVAKFAADTASAVAVKKSVS--KAACKYETN---	617
LLENYSKSIHIESLTMQEMIRKDLTEGLVAYEKDLSKEIVQKKSLLDG--DCCALELG---	621
* * *	
TLEKVSSLTKSMMDCAS KL TDA--LGQHDFASPEEHMQFISHTIRPLMDTTRTYVDTLEG	705
SAKKIADLTNQMGAVAKL SEA --MAKHDFANTEEKLYCAQTLRPLMDEVRTFADALEG	705
LIKEISHRVSAIKVLVRDMTEARKVANHKENFK E KAFAY-EETVVRPYLESIRDHIDHLEM	710
LVTQLSELI DEM DESTSALEKA-VAEFRTNEVIVDASEFIRD TVLP AMDKLRVSADKA EI	676
VLKSLDKSSA EM GKALS SKL FEDTK KA EGMTEALETASYY-ESTVLAD MD ELRKYADE AEA	680
* * *	
ELADDLWPLPTYQ EM LFIK	724
EIADSEFWPLPTYQ EM LFIK	724
EIDDEIWPLPKYRELLE FK	729
VTAESYWFPFAYDKLLE GV	695
LIPEKYLSYPTY GE MFLSLR	700
* * *	



FIGURA 28. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las GSs tipo III.

Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de las GSs tipo III de *Pseudanabaena* 6903, *Synechocystis* 6803, *B. fragilis*, *R. flavefaciens* y *B. fibrisolvans*. El alineamiento fue llevado a cabo con el programa CLUSTAL X. Se marcan en negrita los aminoácidos idénticos en al menos tres de las cinco secuencias. Con un asterisco se señalan los aminoácidos idénticos en las cinco GSs. Las cinco regiones conservadas entre las GSs tipo I y II se representan sombreadas. Regiones adicionales altamente conservadas en las cinco GSIII aparecen también marcadas.

3.10. PRESENCIA DE UN ÚNICO TIPO DE GS EN *PSEUDANABAENA* 6903.

El hecho de que los seis clones obtenidos mediante la complementación del mutante ET6017 sólo contuvieran el gen *glnN*, que codifica la GS tipo III, nos condujo a buscar por diferentes métodos la presencia de la GS tipo I, que se encuentra en todas las cianobacterias hasta ahora descritas, en *Pseudanabaena* 6903.

Como primera aproximación, se aplicó un extracto crudo de *Pseudanabaena* 6903 a una columna de DEAE-celulosa, según se describe en el apartado 2.3.2.1. Ya que el amonio o incluso el nitrato han sido descritos como represores de la expresión de la GS (Mérida *et al.*, 1991a; García-Domínguez *et al.*, 1997; Reyes *et al.*, 1997), se empleó un cultivo de *Pseudanabaena* 6903 sometido a deficiencia de nitrógeno durante 10 h para la obtención del extracto crudo. Como se muestra en la Figura 29A, un único pico de actividad GS eluyó aproximadamente a una concentración de 0,2 M de KCl en la cromatografía de DEAE-celulosa. La fracción con máxima actividad y las fracciones en torno a ella fueron sometidas a inmunodetección con anticuerpos anti-GSI y anti-GSIII. Sólo se observó reacción con los anticuerpos anti-GSIII, disminuyendo la señal conforme disminuía la actividad de las fracciones (Figura 29B).

También se llevaron a cabo experimentos de inmunodetección con los anticuerpos de los dos tipos de GS en extractos crudos de las cianobacterias *Pseudanabaena* 6903, *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120 cultivados en medio con nitrato como fuente de nitrógeno. Como se observa en la Figura 29C, en el extracto de *Pseudanabaena* 6903 se detectó una única banda correspondiente a la GS tipo III, y no se identificó banda alguna con los anticuerpos anti-GSI, mientras que en *Synechocystis* 6803 se detectaron ambas proteínas y en *Anabaena* 7120 sólo la GS tipo I.

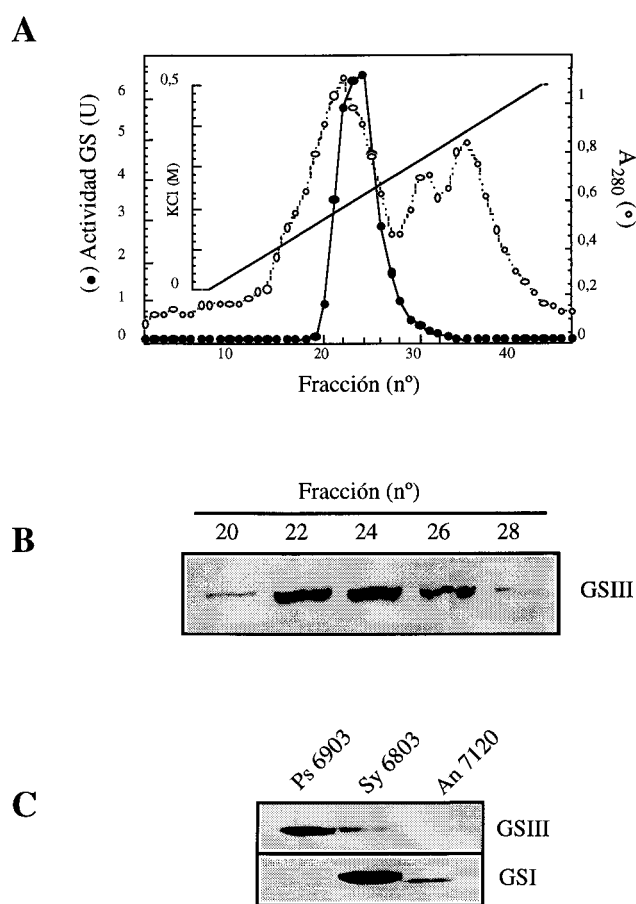


FIGURA 29. Existencia de un único tipo de GS (GSIII) en *Pseudanabaena* 6903.

A) Perfil de elución de la actividad GS en cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Un extracto crudo obtenido a partir de células de *Pseudanabaena* 6903 sometidas a deficiencia de nitrógeno combinado durante 10 h se aplicó a una columna de DEAE-celulosa y la GS se eluyó con un gradiente lineal de KCl (0-0,5 M).

B) La fracción con máxima actividad GS transferasa y las fracciones anteriores y posteriores a ella obtenidas en la cromatografía de intercambio iónico fueron sometidas a inmunodetección con anticuerpos anti-GSI y anti-GSIII. El mismo volumen de cada fracción fue cargado por carril.

C) Extractos crudos de células de *Pseudanabaena* 6903 (Ps 6903), *Synechocystis* 6803 (Sy 6803) y *Anabaena* 7120 (An 7120) obtenidos de células cultivadas en presencia de nitrato fueron sometidos a inmunodetección con anticuerpos anti-GSI y anti-GSIII. Cada carril contiene 20 μ g de proteína.

La posible existencia del gen *glnA*, que codifica la GS tipo I, en *Pseudanabaena* 6903 se analizó mediante experimentos de Southern en condiciones de hibridación de baja estringencia empleando como sonda el gen *glnA* de *Synechocystis* 6803. El resultado obtenido fue, como se observa en la Figura 30, una señal muy débil y que no mostraba un patrón claro de hibridación que sí se daba en otras cianobacterias que contienen el gen *glnA*.

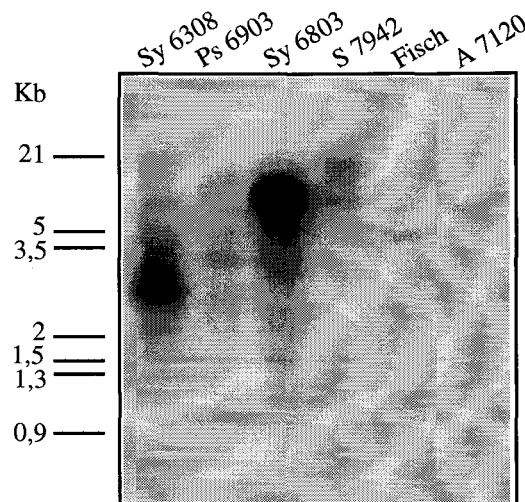


FIGURA 30. Detección por hibridación de secuencias homólogas al gen *glnA* de *Synechocystis* 6803 en diferentes cianobacterias.

DNA procedente de distintas estirpes de cianobacterias fue digerido con *Hind*III, excepto el DNA de *Synechocystis* 6308 que se digirió con *Dra*I. Como sonda se empleó un fragmento de DNA *Sal*I de 1,57 Kb que contenía el gen *glnA* completo de *Synechocystis* 6803. Las diferentes estirpes de cianobacterias se abrevian de la siguiente forma: Sy 6308, *Synechocystis* 6308; Ps 6903, *Pseudanabaena* 6903; Sy 6803, *Synechocystis* 6803; S 7942, *Synechococcus*; Fisch, *Fischerella*; A 7120, *Anabaena* 7120.

3.11. REGULACIÓN EN *Pseudanabaena* 6903 DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *glnN* Y DE LA ACTIVIDAD GS POR LA FUENTE DE NITRÓGENO.

3.11.1. Niveles de actividad GS y RNAm del gen *glnN* en función de la fuente de nitrógeno.

Células de *Pseudanabaena* 6903 se cultivaron en medio BG11_c con nitrato o amonio como fuente de nitrógeno o sometida a carencia de nitrógeno durante 7 horas. Se tomaron muestras de los distintos cultivos para determinar los niveles de actividad GS y de proteína GSIII mediante inmunodetección con anticuerpos anti-GSIII. Los niveles de expresión del gen *glnN* también fueron determinados por hibridación de RNA total

de la cianobacteria, empleando como sonda un fragmento *Bst*XI de 761 pb interno al gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903.

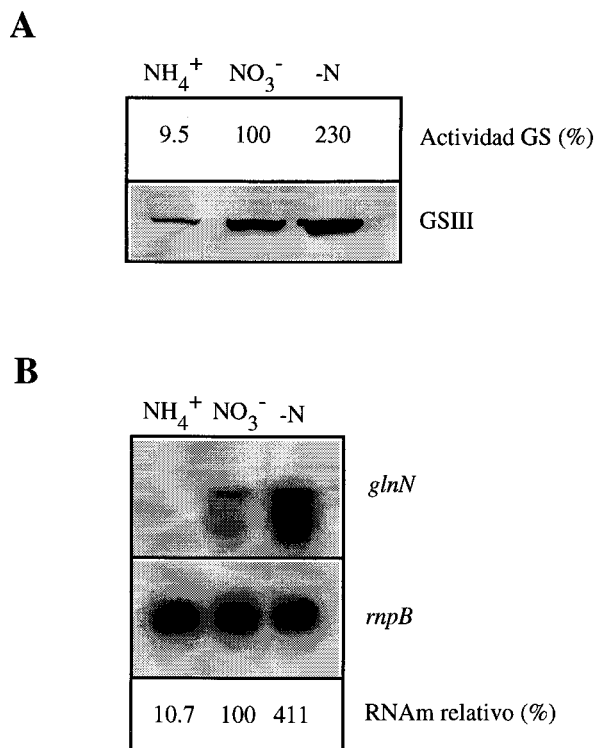


FIGURA 31. Niveles de actividad GS, proteína GSIII y transcrito *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 cultivada con distintas fuentes de nitrógeno.

A) Niveles de actividad GS y proteína GSIII en células de *Pseudanabaena* 6903 en fase exponencial de crecimiento (3-5 μg clf/ml) cultivadas en medio con nitrato, amonio o sometidas a deficiencia de nitrógeno combinado durante 7 h. El 100 % de actividad GS corresponde a 1,24 U/mg. Los datos son medias de tres experimentos independientes, con un error estandar para todos los valores menor del 9 %. Extractos crudos procedentes de células de *Pseudanabaena* 6903 cultivadas en las distintas condiciones nitrogenadas fueron sometidas a análisis por inmunodetección con anticuerpos anti-GSIII. Cada carril contiene 30 μg de proteína.

B) RNA total (15 μg) extraído de células de *Pseudanabaena* 6903 en fase exponencial de crecimiento cultivadas en nitrato, amonio o sometida a deficiencia de nitrógeno combinado durante 7 h, se desnaturalizó, se separó en electroforesis en gel de agarosa al 1 % y se hibridó empleando como sonda un fragmento de DNA *Bst*XI de 761 pb interno al gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903. Tras la hibridación los filtros se lavaron y se rehibridaron con una sonda del gen que codifica el RNA de la RNasaP (*rnpB*) de *Pseudanabaena* 6903 (fragmento *Eco*RI-*Xho*I de pAP111, 550 pb). Los niveles de RNAm fueron cuantificados mediante un aparato InstantImager. Los valores son media de dos hibridaciones independientes.

En todos los experimentos de *Northern blot* se detectó una banda de RNAm de 2,4 Kb correspondiente al gen *glnN* (Figura 31 B). Otras bandas de menor intensidad y tamaño, que probablemente sean debidas a productos de degradación del transcrito,

fueron también detectadas. El nivel más bajo tanto de actividad GS como de transcrito *glnN* se detectó en células cultivadas en amonio, mientras que los niveles máximos se dieron cuando se había sometido a las células a carencia de nitrógeno (Figura 31A, B). Se observó un aumento de 10 veces tanto en la actividad GS como en la cantidad de transcrito *glnN* en células cultivadas en nitrato con respecto a células cultivadas en amonio. El nivel de transcrito *glnN* aumentó 4 veces cuando se sometió a las células a deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, este incremento no se correspondía con un aumento paralelo en la actividad GS o en la cantidad de proteína GSIII, ya que éste sólo fue de 1,5 veces.

3.11.2. Regulación de la actividad GS, cantidad de proteína GSIII y transcrito *glnN* debida al cambio en la fuente de nitrógeno.

El crecimiento de *Pseudanabaena* 6903 con una fuente nitrogenada rica, como es el amonio, o el someter a las células a una deprivación de nitrógeno combinado, provocan un fuerte cambio en los niveles de actividad GS y de transcrito *glnN* con respecto a los detectados al cultivar las células en presencia de nitrato. Con el fin de estudiar más a fondo la cinética de ambos procesos, se llevaron a cabo experimentos en los cuales se añadía amonio a células de *Pseudanabaena* 6903 cultivadas en nitrato, o bien se transferían dichas células a medio carente de nitrógeno combinado durante 10 h, tomándose muestras cada cierto tiempo para medir los niveles de actividad GS, de proteína GSIII y de transcrito *glnN*.

La adición de amonio a una concentración final de 10 mM provocó una rápida disminución del 50 % en el nivel de transcrito *glnN* en tan sólo 5-10 min, llegando a un nivel del 10 % a las 2 h. Sin embargo, la actividad GS disminuyó casi totalmente y de forma drástica a los 5 min de haber añadido el amonio, mientras que la cantidad de proteína se mantuvo más o menos constante durante las 7 h del experimento (Figura 32 A, B).

Por otra parte, cuando células de *Pseudanabaena* 6903 cultivadas en nitrato fueron transferidas a medio carente de nitrógeno combinado, se observó un aumento en los niveles de transcrito *glnN*, alcanzándose un máximo de 4 veces el nivel original a las 5 h y una disminución significativa durante las 5 h siguientes. Tanto la actividad GS como la cantidad de proteína GSIII fueron aumentando progresivamente hasta llegar a un valor de aproximadamente el doble de la actividad original (Figura 32 C, D).

Para un mejor entendimiento de los diferentes efectos que el amonio y el nitrato provocan sobre la actividad y la expresión de la GSIII de *Pseudanabaena* 6903, se añadió de forma separada ambas fuentes nitrogenadas a cultivos sometidos a hambre de nitrógeno. Como se observa en la Figura 33 A-C, la adición de amonio tuvo como consecuencia una rapidísima caída de la actividad GS, mientras que el nitrato no produjo ningún efecto sobre dicha actividad. La cantidad de proteína GSIII no fue alterada

significativamente en el período de tiempo analizado (2 h). Sin embargo, tanto el amonio como el nitrato provocaron una disminución del nivel de transcrito *glnN*, siendo más acusada con la adición de amonio (Figura 33 A,C y D).

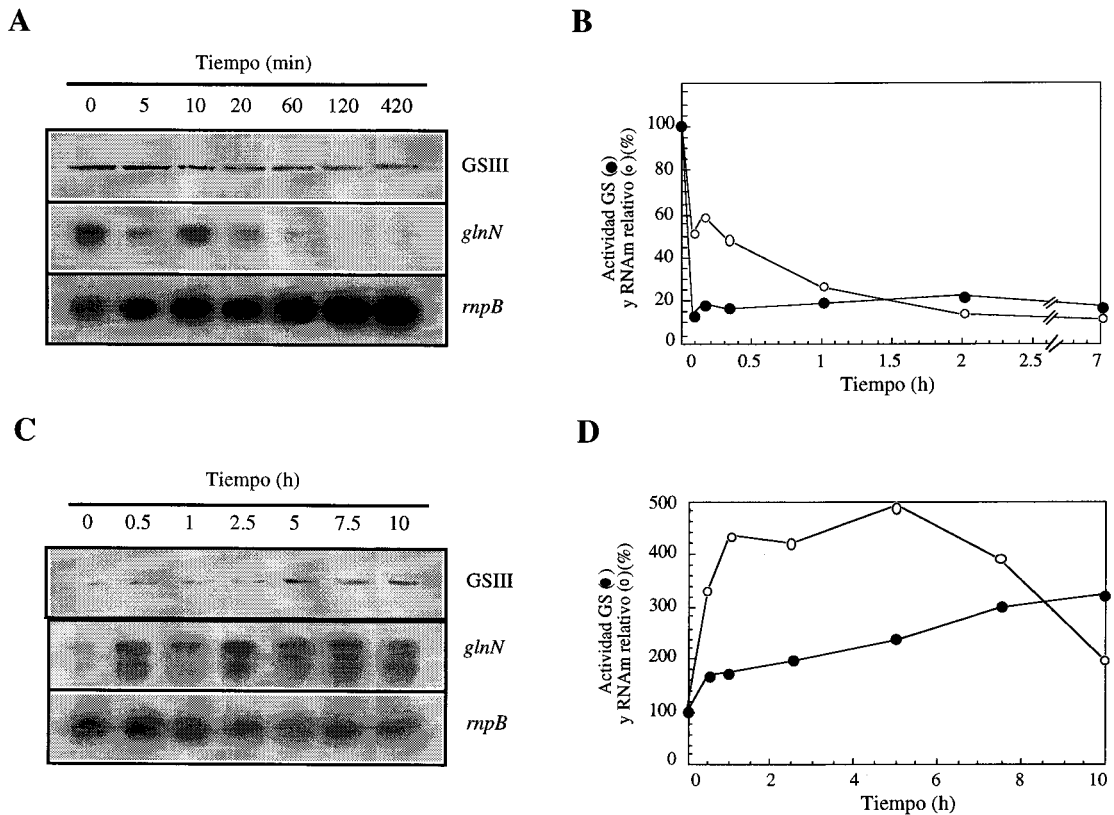


FIGURA 32. Efecto en el nivel de actividad GS, cantidad de proteína GSIII y transcrito *glnN* provocado por la adición de amonio o estrés de nitrógeno en *Pseudanabaena* 6903.

A) Efecto de la adición de amonio a células de *Pseudanabaena* 6903 cultivadas en presencia de nitrato en la cantidad de proteína GSIII y transcrito *glnN*. A los tiempos indicados se tomaron muestras para la obtención de extractos crudos y RNA total. La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos anti-GSIII. Las muestras de RNA se procesaron como se describe en la Figura 31 y se hibridaron con sondas del gen *glnN* y del gen del RNA de la RNasaP.

B) Cinética de caída de la actividad GS y niveles relativos de transcrito *glnN* después de la adición de amonio a células cultivadas en nitrato. El valor del 100 % de actividad GS corresponde a 0,93 U/mg. Los resultados son media de dos experimentos diferentes y el error estándar fue menor del 7 % en todos los puntos. Los niveles relativos de RNAm están expresados como porcentaje del valor inicial.

C) Acumulación de proteína GSIII y transcrito *glnN* provocada por la deficiencia de nitrógeno. Se recogieron células de *Pseudanabaena* 6903 cultivadas con nitrato, que fueron lavadas y transferidas posteriormente a medio carente de nitrógeno combinado. Se tomaron muestras para el análisis por Western y Northern blot, que se procesaron como se describe en la Figura 31.

D) Cinética de caída de la actividad GS y niveles relativos de transcrito *glnN* provocada por la deficiencia de nitrógeno. El valor del 100 % de actividad GS corresponde a 0,93 U/mg. Los resultados son media de dos experimentos diferentes y el error estándar fue menor del 9 % en todos los puntos. Los niveles relativos de RNAm están expresados como porcentaje del valor inicial.

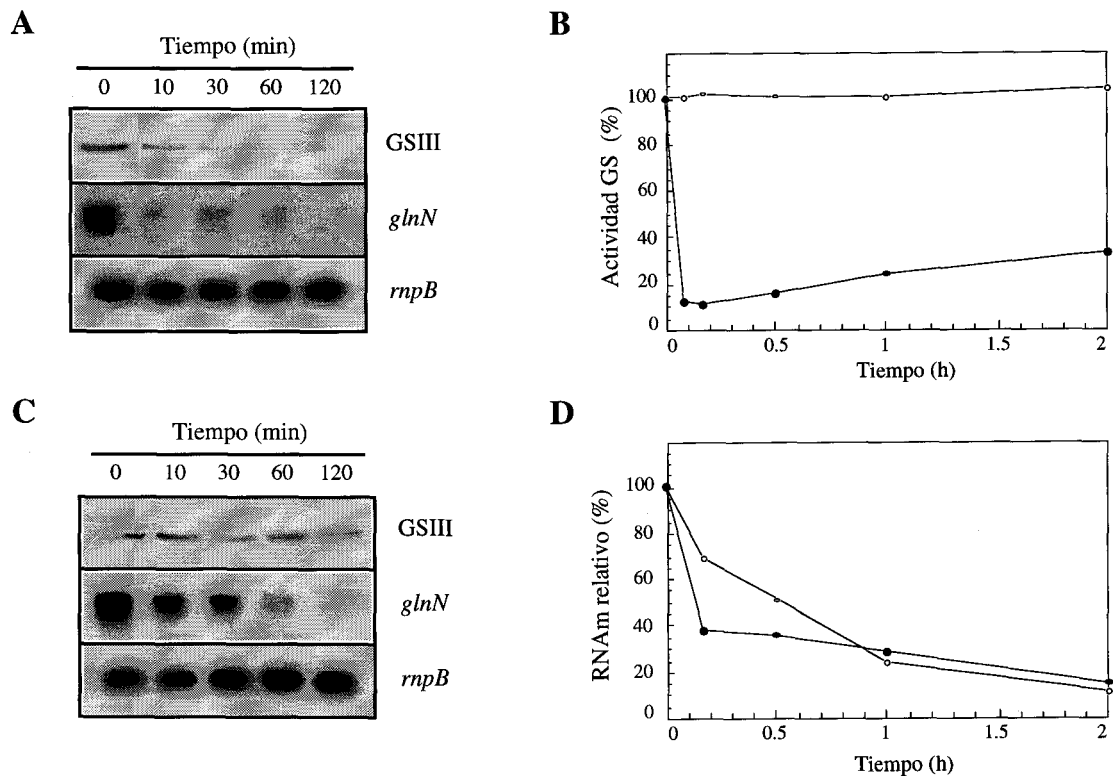


FIGURA 33. Efecto de la adición de amonio o nitrato a células de *Pseudanabaena* 6903 sometidas a deficiencia de nitrógeno.

Efecto de la adición de amonio (A) o nitrato (C) a células de *Pseudanabaena* 6903 sometidas a estrés de nitrógeno en los niveles de proteína GSIII y transcrito *glnN*. A los tiempos indicados se tomaron muestras para la preparación de extractos crudos y aislamiento de RNA total. Los experimentos de inmunodetección se llevaron a cabo como se describe en el apartado 2.3.5 usando anticuerpos anti-GSIII. El RNA fue procesado e hibridado como se describe en la Figura 31.

B) Efecto sobre la actividad GS por la adición de amonio (●) o nitrato (○) a células de *Pseudanabaena* 6903 sometidas a estrés de nitrógeno. El valor del 100 % de actividad GS corresponde a 2,023 U/mg en ambos casos. Los resultados son media de dos experimentos diferentes y el error estandar fue menor del 3 % en todos los puntos.

D) Niveles relativos de transcrito *glnN* después de la adición de amonio (●) o nitrato (○) expresados como porcentaje del valor inicial.

Todos estos datos indicaban que tanto la actividad como la síntesis de la GSIII en *Pseudanabaena* 6903 están fuertemente moduladas por la fuente de nitrógeno presente en el medio de cultivo.

3.11.3. Análisis del promotor del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903: regulación por NtcA.

Los niveles de transcrito *glnN* en *Pseudanabaena* 6903 y la regulación observada por la fuente de nitrógeno, mostraban similitudes con los observados en el gen *glnA* de *Synechocystis* 6803, cuya transcripción está regulada por el activador transcripcional NtcA (Reyes *et al.*, 1997). Además, dicho activador se une también directamente al promotor del gen *glnA* en *Anabaena* 7120 y *Synechococcus* 7942 (Luque *et al.*, 1994; Ramasubramanian *et al.*, 1994; Wei *et al.*, 1994), pero no al promotor del gen *glnN* de *Synechocystis* 6803 (Reyes *et al.*, 1997).

Con el fin de determinar la región promotora del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 se llevaron a cabo experimentos de extensión de cebadores. Para ello se empleó el oligonucleótido spe10 (5'-AATGCGCGACTCGTTTCC-3') complementario a la zona 5' del RNAm de dicho gen (situado entre las posiciones +24 y +7, considerando como nucleótido +1 el primero del codón de inicio de traducción ATG) y RNA total procedente de células cultivadas en nitrato, amonio o sometidas a 10 h de carencia de nitrógeno. Como se observa en la Figura 34A, un único producto de extensión coincidente con un residuo de citosina a -61 nucleótidos del codón de inicio de traducción, fue detectado en las diferentes condiciones nitrogenadas, siendo más abundante con el RNA procedente de células deficientes en nitrógeno que con el RNA de las células cultivadas en nitrato. En el caso del RNA aislado de células cultivadas en amonio, el producto de extensión fue casi indetectable.

A seis nucleótidos del residuo de C, aparece una secuencia (TATCTT) muy similar al consenso de la secuencia -10 (TATAAT) de los promotores reconocidos por el factor σ^{70} de *E. coli* (McClure, 1985) (Figura 34A). Sin embargo, no se encontró ninguna secuencia homóloga al consenso de *E. coli* en la región -35. En su lugar, a 22 nucleótidos de la región -10 se encontró la secuencia GTGN₈TAC, que tan sólo difiere en una base respecto al consenso GTAN₈TAC, descrito como el sitio de unión del regulador transcripcional NtcA (Luque *et al.*, 1994). Un alineamiento de las regiones promotoras reguladas por NtcA de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno de distintas cianobacterias, mostró una alta similitud en estructura con el promotor del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 (Figura 34B). A pesar de que en el caso del gen *icd* de *Synechocystis* 6803 la zona de unión a NtcA no exhibe un 100 % de identidad ya que difiere en uno de los seis nucleótidos del consenso (GTAN₈TGC), se ha demostrado que el activador transcripcional NtcA es capaz de unirse a esta región (Muro-Pastor *et al.*, 1996).

Con el objetivo de confirmar que NtcA es también capaz de unirse a la región promotora del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903, se llevaron a cabo experimentos de retardo en gel (apartado 2.4.6) con proteína NtcA de *Synechocystis* 6803 producida en *E. coli* y un fragmento de DNA de 250 pb que contenía la región promotora del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903. Como controles negativos se emplearon un fragmento de DNA de tamaño similar procedente del plásmido pBS y la proteína glutatión transferasa (GST). El resultado del experimento se muestra en la Figura 35. El aumento de la cantidad de NtcA produjo un mayor retardo del fragmento que contenía el promotor del gen *glnN*, mientras que la adición de un exceso de 15 veces de sonda no marcada provocó el efecto contrario. Por otra parte, con la proteína GST no se observó ningún retardo, ni tampoco cuando se empleó NtcA con el fragmento del plásmido pBS.

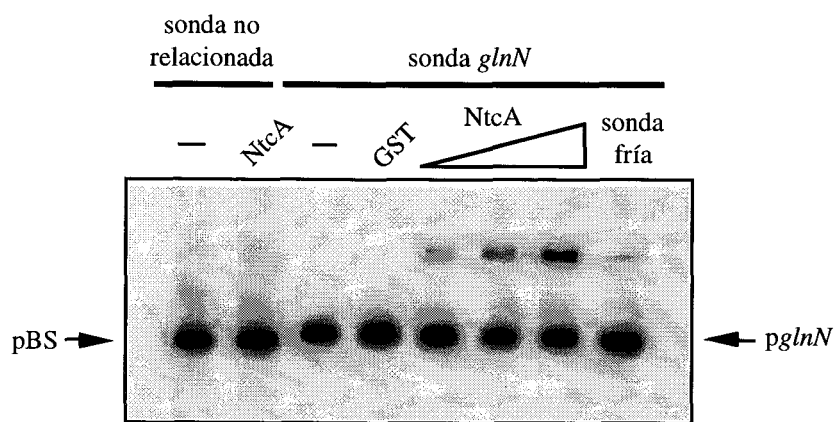


FIGURA 35. Ensayos de retardo en gel del promotor del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 con NtcA de *Synechocystis* 6803.

Un fragmento de DNA conteniendo la región 5' del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 (*pglnN*) fue marcado radiactivamente y ensayado en ausencia de proteína, con 1,0 μM de proteína glutatión transferasa (GST), con 0,05, 0,1 ó 0,2 μM de proteína NtcA o con 0,2 μM de proteína NtcA en presencia de un exceso de 15 veces de la misma sonda de DNA sin marcar radiactivamente (sonda fría). Como control negativo se empleó un fragmento de DNA del plásmido pBS de tamaño similar en ausencia o en presencia de 0,2 μM de proteína NtcA. Todos los ensayos de retardo se llevaron a cabo como se describe en el apartado 2.4.6 de Materiales y Métodos.

Todos estos resultados sugerían que NtcA reconocía y se unía a la región promotora del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 para activar su transcripción.

3.12. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA GS TIPO III DE *PSEUDANABAENA* 6903.

3.12.1. Elección de las mutaciones específicas.

La GS tipo III difiere en tamaño y número de subunidades con respecto a la GS tipo I (Tabla XX), aunque existen dominios bastante conservados entre ambas GSs (Reyes y Florencio, 1994). En una de estas regiones se encuentra la secuencia altamente conservada DGSS, que incluye el residuo Asp-130, equivalente al residuo Asp-50 de la GS de *E. coli*. Con el objetivo de comprobar si en la GS tipo III de *Pseudanabaena* 6903 el residuo Asp-130 juega un papel crítico en la catálisis de la reacción, al igual que ocurre con los residuos equivalentes en las GSs de *E. coli* y *A. azollae*, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida en dicha posición. Para ello se diseñaron dos cambios, que consistieron en sustituir el residuo Asp-130 original por uno de Ala o de Glu. De esta forma, con el mutante de Ala se elimina el grupo carboxilo de la cadena lateral, que es el que participa en la reacción catalizada por la GS de *E. coli* (Alibhai y Villafranca, 1994). Con el cambio de Asp por Glu aumenta el tamaño de la cadena lateral aunque se mantiene el grupo carboxilo, por lo que se puede estudiar como afecta en la reacción un cambio en el tamaño del residuo Asp-130 sin afectar la carga neta.

3.12.2. Proceso de mutagénesis.

Para realizar la mutagénesis dirigida del residuo Asp-130 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos, donde las bases que difieren respecto a la secuencia del gen silvestre aparecen subrayadas:

Asp-Ala: 5'-AGAAGAACCTGCAGGTTACC-3'

Asp-Glu: 5'-AGAAGAACCCTCAGGTTACC-3'

Con cada uno de estos oligonucleótidos y el suministrado por el fabricante, denominado "U.S.E." (Pharmacia, Suecia), se llevó a cabo el proceso de mutagénesis tal y como se describe en el apartado 2.6.

Para ello se empleó el plásmido pJL20, que se obtuvo por clonación de un fragmento *SacI* de 2,8 Kb del plásmido pJL10 que contiene el gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 en el plásmido pUC19 (Figura 36). En esta construcción, la expresión del gen *glnN* quedaba bajo el control del promotor *plac* y de esta forma se podían expresar tanto la GS silvestre como los mutantes dirigidos que se obtuvieran a partir de este plásmido.

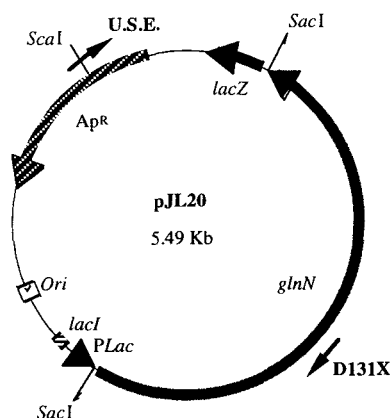


FIGURA 36. Esquema del plásmido pJL20 utilizado para llevar a cabo la mutagénesis dirigida de la proteína GSIII de *Pseudanabaena* 6903.

Un fragmento *SacI* de 2,8 kb del plásmido pJL10 fue clonado en el plásmido pUC19. Las flechas indican el sentido de transcripción de los genes. También se indican las zonas de hibridación de los oligonucleótidos “U.S.E.”, que cambia el sitio de restricción *SacI* por *MluI* y los diseñados para cambiar el residuo Asp-130 por los distintos aminoácidos.

El proceso de selección de los mutantes dirigidos se realizó mediante restricción de los plásmidos con la enzima *MluI* y análisis de la actividad GS de los clones (apartado 2.6). En el caso del mutante de Ala, la selección fue más sencilla debido a que con el cambio de aminoácido introducido por el oligonucleótido también se creó una diana nueva para la enzima de restricción *PstI*, con lo cual se podía hacer una selección directa al cortar el plásmido de los distintos clones con dicha enzima (Figura 37). Para confirmar definitivamente los mutantes dirigidos, se realizaron reacciones de secuenciación con el oligonucleótido Pse12 (5'-TTACGCCACGTCTTTTATCC-3'), que hibrida en una posición cercana al residuo Asp-130 del *glnN* (Figura 35). Los plásmidos construidos que contenían las mutaciones dirigidas de Ala y Glu se denominaron pD130A y pD130E, respectivamente.

3.13.3. Análisis de la actividad GS de los mutantes dirigidos expresados en *E. coli*.

Tanto la GSIII silvestre como los dos mutantes dirigidos eran expresados en *E. coli* a partir de los plásmidos pJL20, pD130A y pD130E, de forma que, como un acercamiento básico al estudio de los mutantes dirigidos, se determinó la actividad GS de estas proteínas. Los resultados de la Tabla 17 muestran que el mutante D130A presenta un nivel de actividad mucho más bajo que el observado para la proteína silvestre, mientras que en el mutante D130E la actividad GS no está apenas afectada.

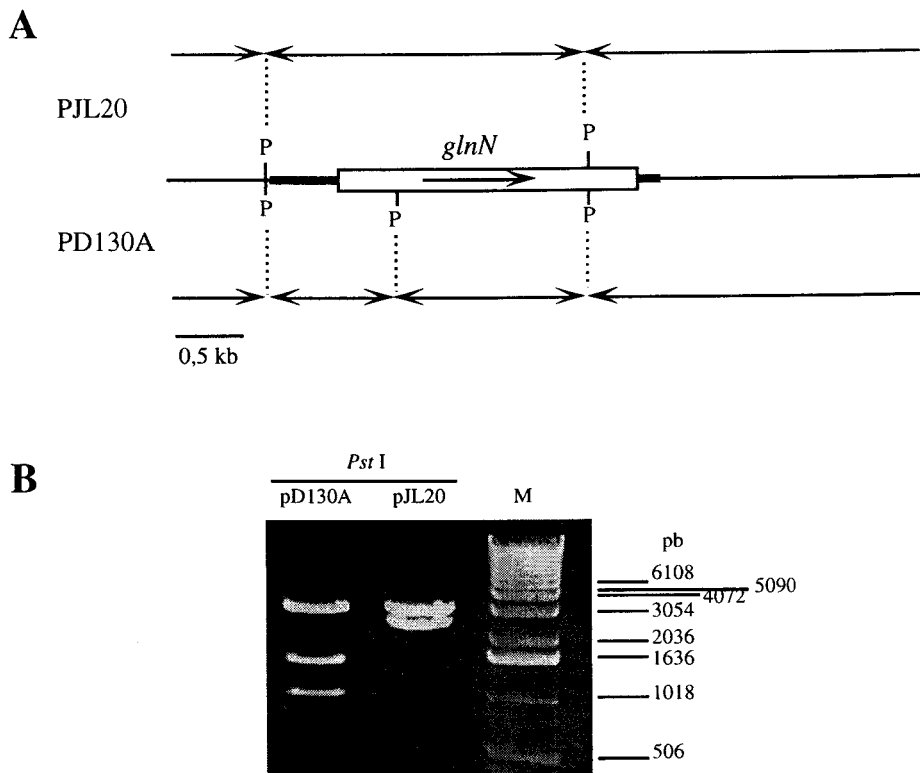


FIGURA 37. Comprobación por análisis de restricción con la enzima *Pst*I de la mutación dirigida D130A.

A) Mapa de restricción del plásmido pJL20 con y sin la mutación dirigida que sustituye el residuo Asp-130 por Ala.

B) Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos pJL20 y pD130A cortados con la enzima de restricción *Pst*I.

4. DISCUSIÓN

4.1. RESISTENCIA DE *A. azollae* A LA PPT Y AL MSX.

La fotosíntesis es un proceso natural que puede ser empleado para el desarrollo biotecnológico de las denominadas energías renovables, y en este campo, las cianobacterias pueden jugar un papel muy importante al actuar como eficientes biocatalizadores en la conversión de la energía solar. Las cianobacterias han sido y son actualmente utilizadas para la producción de gas hidrógeno mediante la fotólisis del agua (Hall y Rao, 1989; Lambert y Smith, 1981; Markov *et al.*, 1995), para la eliminación de nitratos y fosfatos de aguas contaminadas (Garbisu *et al.*, 1992, 1994) y también para la producción de amonio (Brouers y Hall, 1986). Las cianobacterias son los únicos organismos que llevan a cabo una fotosíntesis oxigénica y son capaces al mismo tiempo de fijar N_2 atmosférico y reducirlo hasta amonio, empleando la luz solar como fuente de energía.

El amonio es asimilado en las cianobacterias mayoritariamente por la enzima GS para incorporarse en los esqueletos carbonados. Sin embargo, cuando esta asimilación disminuye, el amonio es excretado al medio extracelular, por lo que puede ser utilizado como fertilizante nitrogenado para otros organismos. Un ejemplo de fertilización natural y de importancia en la agricultura, es la relación simbiótica que se da entre el helecho acuático *Azolla* y la cianobacteria *A. azollae*. En esta simbiosis se produce una fijación de N_2 superior a los 3 kg por hectarea y día (Swaminathan, 1984), cantidad más que suficiente para cubrir el requerimiento de nitrógeno del helecho, por lo que buena parte del amonio producido es liberado al campo de cultivo y asimilado por las plantas. En el interior del helecho, la cianobacteria presenta una elevada frecuencia de heterocistos, superior al 30 % (Hill, 1975), que le permite mantener una alta tasa de fijación de N_2 . Esta alta frecuencia de heterocistos disminuye cuando la cianobacteria es aislada del helecho y cultivada de forma separada. Sin embargo, se ha demostrado que la inmovilización de la cianobacteria en esponjas de polivinilo o poliuretano provoca un aumento del número de heterocistos por filamento, alcanzando valores del 14-17 %, similares a los observados en la relación simbiótica (Hall *et al.*, 1995). Este aumento en la frecuencia de heterocistos, junto con la estabilidad que se observa de la actividad nitrogenasa con la inmovilización de las células, tiene como consecuencia una producción continua de amonio superior a los 50 $\mu\text{moles mg clorofila}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en cultivo en fotobiorreactores (Hall *et al.*, 1995). Por tanto, la inmovilización de *A. azollae* podría simular de alguna forma el nicho natural de esta cianobacteria en el helecho.

Uno de los objetivos que hemos pretendido en este trabajo fue obtener estirpes de *A. azollae* que fueran capaces de producir amonio sin necesidad de inmovilizar las células, de forma que se optimizase la producción de amonio en el cultivo en fotobiorreactores. Para llevar a cabo este proyecto nos centramos en la enzima clave en la asimilación del amonio, la glutamina sintetasa. Un primer abordaje consistió en

conseguir mutantes de esta cianobacteria con menor actividad GS, empleando para ello los inhibidores de la GS MSX y PPT, con objeto de encontrar estirpes resistentes a estos compuestos. La adición de MSX o PPT a cultivos de cianobacterias provoca una rápida inactivación de la GS (Orr y Haselkorn, 1982; Turpin *et al.*, 1984; Ramos *et al.*, 1982) y de forma paralela un aumento en el nivel de amonio presente en el medio de cultivo. El mismo efecto se observó cuando se añadió MSX o PPT a células de *A. azollae* cultivadas con nitrato (Figura 7). Tras una hora en presencia de 10 μM de PPT o MSX, la actividad GS fue casi completamente inhibida. En *Anacystis nidulans*, concentraciones similares de MSX y algo superiores de PPT, próximas a 100 μM , provocan una inactivación similar de la GS (Ramos *et al.*, 1982; Lea *et al.*, 1984), mientras que en *Anabaena flos-aquae* es necesario 1 mM de MSX para conseguir la misma inhibición (Turpin *et al.*, 1984).

Como consecuencia de la inactivación de la GS, la concentración de amonio en el medio aumentó tanto en presencia de MSX como de PPT, si bien en el caso de la PPT se llegó un nivel menor de amonio extracelular que no se incrementó después de 6 h de la adición del inhibidor (Figura 7). Por tanto, la PPT y el MSX provocan una inactivación de la GS de *A. azollae* similar a la que se da en otras cianobacterias, aunque las concentraciones de inhibidor pueden variar de unas especies a otras.

Una continua exposición de *A. azollae* al inhibidor PPT provoca una rápida muerte celular, en un período de 3-4 días. Sin embargo, con una frecuencia de aproximadamente 10^{-5} aparecen colonias de células capaces de crecer en presencia de PPT (mutantes PPT^R). El MSX también resulta igualmente tóxico para las células, aunque en ningún caso se obtuvieron colonias resistentes a este compuesto. El análisis de la actividad GS *in vivo* e *in vitro* de parte de los mutantes PPT^R, no mostró ninguna diferencia significativa con respecto a la actividad registrada en la estirpe silvestre. Además, en todos los mutantes analizados, la GS podía ser inactivada *in vitro* en igual medida que lo era la GS de la estirpe silvestre. Por tanto, la resistencia de estas estirpes a la PPT no podía ser debida a una alteración de la enzima GS que modificase la afinidad por este inhibidor.

Cuando los mutantes resistentes a PPT fueron cultivados en presencia de MSX, con una frecuencia bastante alta ($2,8 \cdot 10^{-2}$), algunos de estos mutantes también mostraban resistencia al MSX (mutantes PPT/MSX^R). La adición de PPT a los mutantes PPT^R no produjo ningún efecto sobre la actividad GS, aunque el MSX sí produjo una inactivación de la enzima y, como consecuencia, una excreción de amonio similar a la observada en la estirpe silvestre con este mismo inhibidor (Figura 8 A y B). Sin embargo, en los mutantes PPT/MSX^R, ninguno de los dos compuestos era capaz de alterar la actividad GS (Figura 8C).

Todos estos resultados parecen indicar que tanto los mutantes PPT^R como los PPT/MSX^R podrían estar afectados en el sistema de transporte de estos compuestos al interior celular. En cianobacterias parece existir al menos un sistema de transporte para

aminoácidos neutros, y algunas especies también tienen sistemas específicos para el transporte de aminoácidos básicos o ácidos (Montesinos *et al.*, 1997). En *Anabaena* 7120 existe un sistema de alta afinidad para el transporte de aminoácidos básicos (Herrero y Flores, 1990) y otro para el de aminoácidos neutros (Montesinos *et al.*, 1995). Además, también puede existir un sistema de baja afinidad para el transporte de aminoácidos básicos (Montesinos *et al.*, 1995). Se han obtenido mutantes resistentes a MSX de dos especies de cianobacterias filamentosas, *Anabaena* 7937 y *Nostoc* 7413, afectados en el transporte de Asp, Glu y aminoácidos neutros (Montesinos *et al.*, 1997). Sin embargo, no se han descrito estirpes resistentes a PPT. El MSX y la PPT podrían ser transportados por el mismo sistema que el Glu, dada la similitud que tienen ambos compuestos con este aminoácido, aunque hasta el momento esta posibilidad no ha sido demostrada. El hecho de que los mutantes de *A. azollae* resistentes a PPT sean sensibles a MSX podría sugerir que estos mutantes están afectados en un elemento del sistema de transporte capaz de discernir entre ambos productos, o bien que sean transportados por sistemas distintos. Sin embargo, la alta frecuencia con la que los mutantes PPT^R adquieren resistencia a MSX podría indicar que se tratase de un mismo sistema. Para poder distinguir entre estas hipótesis sería necesario llevar a cabo un completo estudio del transporte de aminoácidos tanto en la estirpe silvestre como en las mutantes.

4.2. EL GEN *glnA* DE *A. azollae*.

Dado que ninguna de las estirpes de *A. azollae* obtenidas con el uso de la PPT y del MSX presentaban alteraciones en la actividad GS, se optó por seguir una estrategia distinta, basada en la mutagénesis dirigida de la enzima mediante el empleo de las técnicas de la biología molecular.

La clonación del gen estructural de la GS, *glnA*, de *A. azollae* era un requisito fundamental para poder llevar a cabo este proyecto, que se consiguió por complementación de un mutante *glnA* de *E. coli* auxótrofo de glutamina. Este tipo de estrategia ha sido utilizada con éxito para clonar genes estructurales de GS, tanto de procariotas como eucariotas (Nakano *et al.*, 1989; Southern *et al.*, 1986; Snustad *et al.*, 1988; Reyes y Florencio 1994).

La secuencia de aminoácidos de la GSI de *A. azollae* muestra una altísima homología con la GSI de la cianobacteria *Anabaena* 7120, ya que ambas proteínas tan sólo difieren en 9 de los 475 aminoácidos (Figura 10). Esta identidad se extiende más allá de la zona codificante, siendo del 95 % en la región promotora de ambos genes. La GS de *Anabaena* 7120 también muestra una identidad del 90 % con la GS de otra cianobacteria filamentosa, *Calothrix* sp PCC 7601 (Elmorjani *et al.*, 1992), aunque disminuye hasta valores del 77 % cuando se compara con la GS de cianobacterias unicelulares como *Synechocystis* 6803 o *Synechococcus* (Reyes, 1994). Por tanto, a

pesar de que la homología entre las distintas GSs tipo I de cianobacterias es significativamente alta, se pueden establecer dos grupos: uno, que incluiría las especies filamentosas formadoras de heterocistos, con identidades superiores al 90 %, y otro, el de las cianobacterias unicelulares, con valores algo inferiores, próximas al 80 %. De todas formas, la GSI de cianobacterias constituye un grupo bastante homogéneo dentro de los procariotas.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la GS de *A. azollae* con la de la GS de *E. coli*, la identidad observada seguía siendo alta, aunque disminuyó hasta el 54 %. La similitud de secuencia entre la GS de ambos organismos era de suma importancia, ya que el trabajo de mutagénesis dirigida que se iba a llevar a cabo en la GS de *A. azollae* estaba basado en los estudios previos realizados con la GS de *E. coli*.

4.3. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA GSI DE *A. azollae*.

La afinidad de la GS de *E. coli* por el amonio se ve fuertemente alterada al sustituir el residuo Asp-50 por otro de Ala o Glu (Alibhai y Villafranca, 1994). Este residuo se encuentra situado en el sitio activo de la enzima y junto con el Glu-327 forma un pequeño “bolsillo” con carga negativa que está implicado en la unión y desprotonación del amonio durante la reacción catalítica (Alibhai y Villafranca, 1994; Liaw *et al.*, 1995). La aplicación de la mutagénesis dirigida en el residuo equivalente al Asp-50 de la GS de *A. azollae* tiene un doble interés. Por una parte, ésta sería la segunda GS tipo I donde se ha llevado a cabo esta mutagénesis después de la de *E. coli*, por lo que sería interesante desde el punto de vista del mecanismo de acción de la enzima analizar los efectos que provoca esta sustitución en una GS que no pertenece a una especie de enterobacterias y con la que guarda algo más de un 50 % de identidad a nivel de aminoácido. Por otra parte, existe además un interés puramente biotecnológico, que se basa en la obtención de estirpes mutantes de *Anabaena* productoras de amonio. *A. azollae*, al tratarse de una cianobacteria que ha sido ya empleada para la producción de amonio mediante la inmovilización y cultivo en fotobiorreactores (Hall *et al.*, 1995), constituye un candidato adecuado para llevar a cabo este proyecto biotecnológico. De esta forma, la sustitución de la GS silvestre en esta cianobacteria por una enzima mutante con una menor actividad y una menor afinidad por el amonio, provocaría que una parte del amonio producido en la fijación y posterior reducción que lleva a cabo la nitrogenasa no pudiera ser asimilado y por tanto fuera excretado al medio extracelular.

En la GS de *E. coli* se han obtenido dos mutantes dirigidos en el residuo Asp-50. En uno de ellos, la proteína D50A, se sustituyó el residuo de Asp por Ala, de forma que se alteró tanto el tamaño como la carga neta del residuo al eliminar el grupo carboxilo de la cadena lateral. En el otro mutante dirigido, la proteína D50E, se cambió el Asp por Glu, con lo que sólo se aumenta el tamaño de la cadena lateral en un grupo

-CH₂ sin modificar la carga neta (Alibhai y Villafranca, 1994). Con la GS de *A. azollae*, además de estos dos mismos mutantes (las proteínas D51A y D51E), se han construido otros tres mutantes dirigidos distintos (las proteínas D51S, D51N y D51R) con el objetivo de examinar más a fondo la esencialidad y la funcionalidad tanto del tamaño como de la carga eléctrica del residuo conservado Asp-51. Con el cambio de Asp por Ser se modificó el tamaño y la carga de la cadena lateral, aunque se mantuvo en ésta la presencia de un grupo hidroxilo. En la proteína mutante D51N aparece un residuo de Asn en la posición del Asp-51, con lo que se eliminó el grupo carboxilo de la cadena lateral aumentándose el tamaño de la misma al igual que en la proteína D51E. Finalmente, con la sustitución por el residuo de Arg se provocó una fuerte alteración tanto en la carga neta como en el tamaño.

La GS silvestre de *A. azollae* y los cinco mutantes dirigidos se expresaron correctamente en *E. coli* (Figura 13). La purificación a homogeneidad electroforética de las seis proteínas se consiguió mediante el empleo de la cromatografía de afinidad en Blue-Sefarosa como paso crítico en todo el proceso de purificación. Este tipo de matriz ha sido también utilizada con éxito para la purificación de la GS de *Anabaena* 7120 (Orr *et al.*, 1981). Sin embargo, la GS de *Synechocystis* 6803 no presenta afinidad por la Blue-Sefarosa (Reyes, comunicación personal), aunque sí se une de forma específica a otro tipo de matriz de afinidad, la 2', 5'-ADP-Sefarosa, que ha sido empleada para su purificación (Mérida *et al.*, 1990). La Blue-Sefarosa es un tipo de matriz que presenta afinidad por proteínas con sitios de unión a nucleótidos, ya que el ligando de la misma, Cibacron Blue F3GA, se une al dominio para dinucleótidos común a estas proteínas (Thompson *et al.*, 1975; Thompson y Stellwagen, 1976; Heyns y DeMoor, 1974). Por tanto, el punto de interacción de la GS de *A. azollae* con esta matriz debe darse por el sitio de unión al ATP. El hecho de que los cinco mutantes dirigidos de la GS de *A. azollae* hayan sido purificados con este tipo de matriz con un porcentaje de recuperación similar al de la proteína silvestre, sugiere que al menos la zona de unión al ATP no ha sido alterada en estas proteínas, o bien que la mutación dirigida no ha afectado a la interacción con la Blue-Sefarosa.

En la Tabla 18 se recogen los parámetros cinéticos de las GSs de varias especies cianobacterianas y de *E. coli*. El valor de actividad GS transferasa en *A. azollae* era sensiblemente inferior al de la GS de *Anabaena* 7120, si bien éste era un valor bastante elevado, superior incluso al observado en la GS de *E. coli*. Los valores de las constantes de Michaelis-Menten para el amonio en estas dos GSs cianobacterianas eran muy bajos en comparación con los detectados en otras especies. Esta elevada afinidad por el amonio mostrada por la GS en *Anabaena* (50 µM para la GS de *A. azollae* y 20 µM para la de *Anabaena* 7120) determina que la asimilación de nitrógeno en condiciones de limitación de amonio en el medio (p. ej. con nitrato como fuente de nitrógeno) se realice principalmente a través de esta enzima.

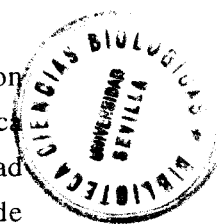


TABLA 18. Parámetros cinéticos de la GS purificada de diferentes organismos procarióticos.

Organismo	K_m (mM)			Actividad específica ^a		Referencia
	NH_4^+	Glu	ATP	Biosintética	Transferasa	
<i>A. azollae</i>	0,05	1,5	0,21	8.400	29.000	Este trabajo
<i>Anabaena</i> 7120	<0,02	2,1	0,32	10.020	131.000	Orr y Haselkorn (1981)
<i>Synechocystis</i> 6803	0,17	1,2	0,55	-	90.900	Merida <i>et al.</i> (1990)
<i>A. cylindrica</i>	1	2	-	5.600	19.200	Dharmawardene <i>et al.</i> (1973) Sampaio <i>et al.</i> (1979)
<i>Anabaena</i> CA	0,2	5	-	10.200	90.000	Stacey <i>et al.</i> (1979)
<i>E. coli</i> ^b	0,1	5,5	0,4	86.500	54.000	Alibhai y Villafranca (1994) Woolfolk <i>et al.</i> (1966)

^aLos valores de actividad biosintética están expresados en moles de glutamina formada por mol de GS y min, y los valores de actividad biosintética en moles de γ -glutamihidroxamato formado por mol de GS y min. ^bPara el cálculo de los valores de K_m y de actividad biosintética se empleó Mg^{2+} como cofactor, y Mn^{2+} para la actividad transferasa.

Todos los mutantes dirigidos en el Asp-51 de la Gs de *A. azollae* presentaban una menor actividad biosintética que la proteína silvestre, que fue más acentuada en los mutantes D51E y D51N (Tabla 12). La proteína D51R presentaba unos valores de actividad tan sumamente bajos, que resultó muy difícil poder determinarlos con precisión, por lo que no se pudo tampoco determinar ningún otro parámetro de esta proteína. En la GS de *E. coli*, la sustitución del residuo Asp-50 por Ala o Glu también provoca una disminución de la actividad biosintética de la enzima, sobre todo en el mutante D50E (Alibhai y Villafranca, 1994).

La actividad transferasa se vió afectada en todos los mutantes de igual forma que la actividad biosintética, a excepción de la proteína D51E (Tabla 12). En este mutante, la actividad biosintética fue tan sólo de un 2 % respecto a la proteína silvestre, mientras que la actividad transferasa apenas se vió afectada. Las reacciones biosintética y transferasa de la GS son distintas en varios aspectos: los sustratos son diferentes en cada una de ellas, ya que en la reacción biosintética se emplea glutamato y amonio, y en la transferasa, glutamina e hidroxilamina. Además, en la reacción transferasa no se forma el intermediario γ -glutamil-fosfato durante la catálisis de la enzima. Se ha descrito un mutante de la cianobacteria *Anabaena variabilis* resistente a etilendiamina (EDA) que presenta una GS afectada en su actividad biosintética pero no en la actividad transferasa (Kerby *et al.*, 1986b). La EDA es un análogo del amonio que resulta tóxico para las cianobacterias y que es metabolizado por la GS a aminoetilglutamina, un

análogo de la glutamina (Rai *et al.*, 1984; Kerby *et al.*, 1985, 1986a). El mutante de *A. variabilis* resistente a EDA presenta la misma actividad transferasa que la estirpe silvestre mientras que el nivel de actividad biosintética es tan sólo de un 8 % (Kerby *et al.*, 1986b). Sin embargo, no se ha llevado a cabo ningún estudio para caracterizar la GS de este mutante a nivel molecular.

Las constantes catalíticas (k_{cat}) o número de recambio de los mutantes dirigidos de la GS de *A. azollae* eran sensiblemente menores que en la enzima silvestre, en especial en las proteínas D51E y D51N (Tabla 13). El mutante dirigido D50E de la GS de *E. coli* presenta una k_{cat} similar a la de la proteína D51E de *A. azollae*. Sin embargo, en la proteína mutante de *E. coli* D50A, este valor no se ve muy afectado respecto a la enzima silvestre (Alibhai y Villafranca, 1994), mientras que en la GS de *A. azollae*, la misma sustitución provoca un descenso muy significativo del número de recambio de la enzima (Tabla 13).

Se han determinado los valores de K_m de la GS silvestre de *A. azollae* y de los mutantes dirigidos para el amonio, el ATP y el glutamato en el ensayo biosintético de la enzima (Tabla 13). Los cambios más significativos en la K_m de las proteínas mutantes de *A. azollae* se dieron para el amonio. Todas las proteínas presentaban una afinidad menor por este sustrato, que en el caso de la proteína D51A fue de 250 veces. En la GS de *E. coli*, esta misma mutación también provoca un aumento específico de la K_m por el amonio de aproximadamente 500 veces. Sin embargo, la sustitución en la GS de *E. coli* del Asp-50 por Glu sólo produce un aumento de 10 veces de la K_m para el glutamato, mientras que apenas se altera la afinidad para el ATP o el amonio (Alibhai y Villafranca, 1994). El mismo cambio en la GS de *A. azollae* (proteína D51E) origina un efecto similar en la K_m para el glutamato, aunque también afecta a los otros sustratos, sobre todo al ATP, cuya constante específica es la menor de todas las proteínas mutantes (Tablas 13 y 14).

Los resultados obtenidos con los mutantes dirigidos de la GS de *A. azollae* tanto en los valores de K_m como en las constantes específicas, indican que un aumento en el tamaño de la cadena lateral del residuo Asp-51 (proteínas D51E, D51N y D51R) provoca un mayor efecto sobre la enzima que cuando se acorta la longitud de la misma (proteínas D51S y D51A), incluso aunque se mantenga en el residuo la presencia del grupo carboxilo (proteína D51E). El intermediario de la reacción catalítica de la GS, γ -glutamil-fosfato, debe situarse correctamente en el sitio activo de la enzima para que pueda llevarse a cabo el ataque nucleofílico del amonio y se produzca glutamina. Gracias al estudio cristalográfico que se ha llevado a cabo con la GS de *E. coli* ligada a diferentes sustratos, se ha podido determinar la orientación de cada átomo del γ -glutamil-fosfato en el sitio activo (Figura 38) (Liaw y Eisenberg, 1994). En la GS de *E. coli*, la unión a la enzima del ADP producido por la hidrólisis del ATP durante la reacción biosintética, induce el movimiento del Asp-50 hacia el sitio de unión del amonio (Liaw *et al.*, 1995).

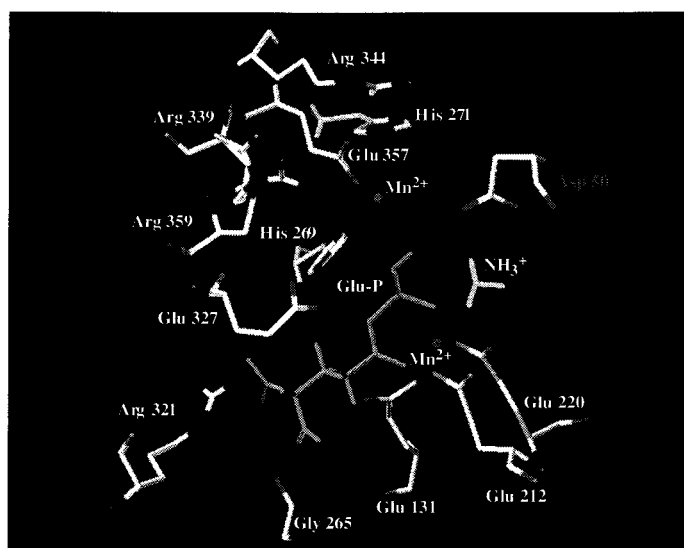


FIGURA 38. Esquema del sitio activo de la GS de *E. coli*.

En la figura se muestran los residuos implicados en la catálisis de la enzima (Liaw y Eisenberg, 1994; Liaw et al., 1995), y que están absolutamente conservados en la GS de *A. azollae*. En color verde se muestra el intermediario γ -glutamil-fosfato (Glu-P) producido durante la reacción enzimática, y en color amarillo la forma activa del amonio (NH_3^+). La imagen ha sido obtenida a partir de los datos cristalográficos de la GS de *E. coli* (Yamashita et al., 1990) empleando el programa informático SYBYL.

Junto al Asp-50 y formando también parte del “bolsillo” con carga negativa, se encuentran también los residuos Glu-327, Glu-212 y Tyr-179 (Liaw y Eisenberg, 1994). Todos estos residuos, además de los que aparecen indicados en la Figura 38, están conservados en la GS de *A. azollae*, por lo que el sitio activo de esta proteína no debe diferir mucho del de la GS de *E. coli*. La desprotonación del amonio es necesaria para que se pueda formar NH_3 , que ataca al γ -glutamil-fosfato formando un intermediario tetraédrico que posteriormente se escinde para formar glutamina y P_i . En esta desprotonación parece intervenir el grupo carboxilo del residuo Asp-50, por lo que cuando se elimina este grupo sin aumentar el tamaño de la cadena lateral (mutante D50A de *E. coli* (Alibhai y Villafranca, 1994) y mutantes D51S y D51A de *A. azollae*), la reacción de desprotonación del amonio podría ser llevada a cabo por alguno de los residuos ácidos próximos al Asp-50, como el Glu-327 o el Asp-212. Sin embargo, cuando se provoca un aumento del tamaño de la cadena lateral del residuo Asp-50 (mutante D50E de *E. coli* (Alibhai y Villafranca, 1994) y mutantes D51E, D51N y D51R de *A. azollae*), se puede producir una distorsión en el sitio activo de la GS que impida la desprotonación del amonio, o bien pueda interferir en la correcta orientación del γ -glutamil-fosfato en el sitio activo. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que tanto en la GS de *E. coli* como en la de *A. azollae*, cuando se disminuye

la longitud de la cadena lateral del residuo de Asp, la k_{cat} de la enzima no se ve tan fuertemente alterada como cuando se incrementa el tamaño de la misma. Además, mientras que la sustitución por Ala en *E. coli* o Ala y Ser en *A. azollae* no modifica la afinidad de la enzima por el glutamato o el ATP, ésta sí que se ve disminuida cuando aparece un Glu en la posición del Asp conservado. Por otra parte, el efecto más drástico se observó en la forma mutante D51R, en la que el aumento considerable de la cadena lateral provocó una pérdida total de la actividad de la enzima.

4.4. INHIBICIÓN DE LA GS DE *A. azollae* POR MSX Y PPT.

El MSX y la PPT inhiben la actividad GS *in vivo* de *A. azollae* (Figura 7) de igual forma que en otras cianobacterias. Se han determinado los valores de K_i de ambos inhibidores para la GS purificada de *A. azollae* (Tabla 16) y, al igual que en la GS de *E. coli*, tanto el MSX como la PPT actúan como potentes inhibidores (Tabla 19). Sin embargo, en la GS de plantas (Ericson, 1985) y mamíferos (Logusch *et al.*, 1989), estos valores de K_i son algo más elevados, sobre todo para el MSX (Tabla 19). Por tanto, el MSX y la PPT podrían actuar como inhibidores más potentes de la GS de procariontes y algo más débilmente en eucariotes, si bien en todos los casos se encuentra en el rango de μM .

TABLA 19. Valores de las K_i de la GS de varios organismos para los inhibidores MSX y PPT.

Organismo	K_i (μM)		Referencia
	MSX	PPT	
<i>A. azollae</i>	0,2	0,3	Este trabajo
<i>E. coli</i>	1,0	0,6	Logusch <i>et al.</i> (1990)
Oveja (cerebro)	105	14	Logusch <i>et al.</i> (1989)
Espinaca (hojas)	100	6,1	Ericson (1985)

Todas las formas mutantes de la GS de *A. azollae* construidas en este trabajo, a excepción de la proteína mutante D51E, son inhibidas completamente por MSX o PPT (Tabla 15). En el caso del mutante dirigido D51E, fue necesario aumentar más de 10^3 veces la concentración de PPT para inhibir totalmente la actividad de la enzima. Con el MSX, ni siquiera una concentración de 10 mM de inhibidor en el ensayo se consiguió inactivar algo más de un 20 % la actividad de la enzima (Figura 21). El valor de K_i de esta proteína fue 10^4 veces más elevado para el MSX y algo menos de 10^3 para la PPT (Tabla 16). Dada la peculiaridad que tiene este mutante con las actividades biosintética y transferasa, se determinaron los valores de K_i en las dos reacciones de la GS, aunque no se observó ninguna diferencia significativa (Tabla 16).

Tanto la PPT como el MSX deben ser fosforilados para poder inactivar la GS. Una posible explicación de porqué el mutante D51E es capaz de resistir esta alta concentración de inhibidor podría ser porque ni la PPT ni el MSX se fosforilasen en el sitio activo de la enzima. Sin embargo, el hecho de que al aumentar la concentración de ATP en el ensayo de inactivación, llegando incluso a valores de 35 mM, no aumente absolutamente nada la inactivación de la enzima, apunta más bien a que esta resistencia pueda ser debida a algún motivo diferente.

También es posible que el cambio de Asp a Glu en la posición 51 de la GS de *A. azollae* provoque una alteración del sitio activo que impida la correcta orientación o la entrada del MSX y la PPT. Esta proteína mutante presenta un valor de la K_m para el glutamato 10 veces superior al observado en la enzima silvestre, lo que podría explicar en parte que esta proteína tuviese una menor afinidad por la PPT y el MSX, ya que ambos compuestos son análogos del glutamato. Sin embargo, es necesario aumentar bastante más de 10 veces la concentración de inhibidor para producir algún efecto sobre la actividad de esta enzima. La PPT y el MSX tienen un tamaño superior al del glutamato, por lo que el aumento en la longitud de la cadena lateral del residuo 51 podría afectar al alojamiento del inhibidor en el sitio activo. Los estudios cristalográficos llevados a cabo con la GS de *E. coli* ligada al MSX han permitido determinar la orientación de cada átomo del MSX en el sitio activo de la enzima (Liaw y Eisenberg, 1994). El Asp-50 de la GS de *E. coli* está orientado hacia el grupo metilo del átomo de azufre del MSX, que es precisamente la zona en la que difiere con el glutamato. Por analogía con el sitio activo de la GS de *A. azollae*, un aumento en la longitud de la cadena lateral del Asp-51 podría afectar más a la entrada del MSX que a la del glutamato por la diferencia de tamaño entre ambos compuestos. La diferente estructura del MSX y la PPT en este punto podría explicar además el diferente comportamiento de la GS mutante D51E con estos dos inhibidores. Por tanto, es posible que la resistencia al MSX y a la PPT que presenta la GS mutante de *A. azollae* D51E pueda ser debida a un problema en la entrada de ambos compuestos en el sitio activo de la enzima.

4.4. LA GSIII DE *Pseudanabaena* 6903.

Recientemente se ha identificado un nuevo tipo de GS, la GS tipo III, en algunas especies cianobacterianas (Reyes y Florencio, 1994; García-Domínguez *et al.*, 1997), en dos especies de bacterias pertenecientes a la familia *Bacteroidaceae*, *B. fragilis* y *B. fibrisolvens* (Goodman y Woods, 1993; Hill *et al.*, 1989; Southern *et al.*, 1987) y en *Ruminococcus flavefaciens*, una especie bacteriana Gram (+) de la familia *Clostridaceae* que al igual que las dos especies anteriores se encuentra en el intestino de algunos mamíferos en condiciones de estricta anaerobiosis. El gen estructural de esta GSIII, *glnN*, ha sido clonado en *Synechocystis* 6803 por complementación de un

mutante de GS de *E. coli* (Reyes y Florencio, 1994), aunque también se ha detectado la presencia de este gen en otras cianobacterias no fijadoras de N₂, como *Synechococcus*, *Gloeocapsa* y *Pseudanabaena* (Reyes y Florencio, 1994). Dado que en *Synechocystis* 6803, la GSIII parece tener un papel secundario frente a la GSI, que es la más abundante en la célula, y que además este tipo de GS se expresa fundamentalmente en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Reyes y Florencio, 1994; Reyes *et al.*, 1997), nos propusimos buscar otras cianobacterias donde la GSIII pudiera tener funciones menos secundarias respecto a la GSI. Para ello se seleccionó la cianobacteria *Pseudanabaena* 6903, en la que ya había sido detectada la presencia de GSIII (Reyes y Florencio, 1994; García-Domínguez *et al.*, 1997). El estudio de la GSIII en esta cianobacteria presentaba un interés añadido por su lejanía evolutiva a la mayoría de especies cianobacterianas (Giovannoni *et al.*, 1988) y por la escasez de datos que se disponía de la actividad GS en esta cianobacteria.

La clonación del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia de complementación de un mutante de *E. coli* auxótrofo para glutamina. La secuencia de aminoácidos de la GSIII de *Pseudanabaena* 6903 mostró una alta identidad (74 %) con la GSIII de *Synechocystis* 6803 y la de *R. flavefaciens* (50 %) y mucho más baja con la de *B. fragilis* y *B. fibrisolvans* (45 y 38 %, respectivamente). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de estas cinco GSIII reveló que muchos de los residuos implicados en la función catalítica de la enzima y que se encuentran situados en las cinco regiones conservadas entre las GS tipo I y II (Pesole *et al.*, 1991) están también conservados en la GS tipo III (Figura 28). Estas cinco regiones están perfectamente conservadas en la GSIII de *Pseudanabaena* 6903, *Synechocystis* 6803 y *B. fragilis*, pero sólo tres de ellas, las regiones II, III y IV, podían ser claramente identificadas en la GS de *B. fibrisolvans*. En la región I se encuentra la secuencia DGSS, absolutamente conservada en las GS tipo I y II (Pesole *et al.*, 1991), que incluye el residuo equivalente al Asp-50 de la GS de *E. coli*, implicado en la unión del amonio durante la catálisis de la enzima. Además de estas cinco regiones, también se identificaron otras cuatro distintas (regiones A, B, C y D) que estaban muy conservadas en las cinco GS tipo III (Figura 28)

Se ha demostrado por diferentes métodos que la GS tipo III es la única GS presente en *Pseudanabaena* 6903 y que por tanto, esta cianobacteria carece de la típica GSI procariótica (Figura 29). Este hecho hace posible que en cianobacterias se den todas las combinaciones posibles de GSs no eucarióticas, es decir, cianobacterias sólo con GSI (como *Anabaena* 7120), sólo con GSIII (*Pseudanabaena* 6903) y con ambas (*Synechocystis* 6803) (Figura 29C). La distribución de la GS en procariotas es relativamente compleja. La típica GSI es la prevalente en la mayoría de los grupos, pero algunos de ellos, como ocurre en miembros de las familias *Rhizobiaceae*, *Frankiaceae* y *Streptomycetaceae*, también contienen GS tipo II (Merrick y Edwards, 1995). Además de en cianobacterias, la GSIII también ha sido identificada en *B. fragilis*, *B.*

fibrisolvens y *R. flavefaciens*, que presentan nichos ecológicos muy diferentes al de las cianobacterias, ya que se encuentran en el intestino de mamíferos rumiantes, bajo estrictas condiciones anaeróbicas (Goodman y Woods, 1993; Hill *et al.*, 1989; Southern *et al.*, 1987), en contraste con las condiciones fotosintéticas necesarias para las cianobacterias.

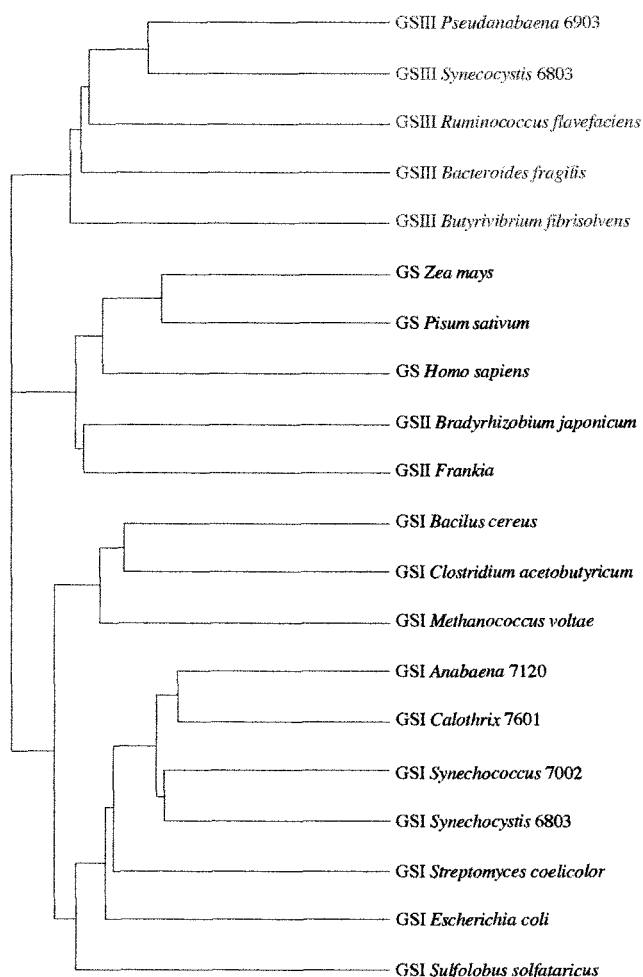


FIGURA 39. Dendrograma indicativo de las relaciones de similitud entre las diferentes secuencias de GSs.

El hecho de que los genes *glnA* y *glnN* estén presentes en grupos de cianobacterias no relacionados filogenéticamente, podría apoyar la hipótesis de que ambos genes estuvieran presentes en un ancestro común y a lo largo de la evolución algunos grupos de cianobacterias podrían haber perdido alguno de ellos. Por otra parte, también sería posible que, dado que *Pseudanabanea 6903* se encuadra en un grupo de cianobacterias bastante alejado evolutivamente de otras cianobacterias como

pueden ser *Synechocystis* 6803 o *Anabaena* 7120, el gen *glnN* podría haber sido el primero en aparecer en las primeras cianobacterias y posteriormente se podría haber incorporado el gen *glnA*. Para poder responder a cualquiera de estas hipótesis sería necesario analizar muchas más especies cianobacterianas.

4.5. REGULACIÓN DE LA GSIII EN *Pseudanabaena* 6903 POR FUENTE DE NITRÓGENO.

En especies de cianobacterias que poseen GSI y GSIII, la expresión de esta última es inducida fuertemente en condiciones de deficiencia de nitrógeno, mientras que su nivel es muy bajo o apenas detectable en presencia de nitrato o amonio en el medio de cultivo (García-Domínguez *et al.*, 1997). Este hecho, junto con el que no se haya descrito la presencia del gen *glnN* en cianobacterias fijadoras de N₂ (Reyes y Florencio, 1994), organismos que nunca se encuentran en condiciones estrictas de deficiencia de nitrógeno, hizo proponer que la GSIII era específicamente requerida en condiciones limitantes de nitrógeno (García-Domínguez *et al.*, 1997). Sin embargo, en *Pseudanabaena* 6903, que carece de GSI, se han detectado altos niveles de GSIII cuando se cultivan las células en presencia de nitrato (Figura 31).

La adición de amonio a células de *Pseudanabaena* 6903 cultivadas con nitrato o sometidas a hambre de nitrógeno, provocó una fuerte y rápida caída de la actividad GS (Figuras 32 y 33). Este efecto del amonio indica que debe existir un mecanismo capaz de inactivar la GSIII en pocos minutos, ya que la cantidad de proteína permanece constante. En *Synechocystis* 6803 también se ha descrito una inactivación similar de la GSIII provocada por el amonio (Reyes, 1994). Estos datos sugieren que, además de la regulación del gen *glnN*, debe existir un sistema que controle la actividad de la GSIII. Este sistema depende de la presencia de amonio pero no de nitrato, ya que la adición de este último a cultivos de *Pseudanabaena* 6903 en condiciones de deficiencia de nitrógeno, no provoca ningún efecto sobre la actividad de la GSIII (Figura 33). La GSI de *Synechocystis* 6803 también es inactivada por la adición de amonio al medio de cultivo, aunque no de una forma tan rápida y drástica como ocurre con la GSIII (Mérida *et al.*, 1991b; Reyes y Florencio, 1995). Por tanto, el sistema de inactivación de la GSIII debe ser distinto al que actúa sobre la GSI.

El nitrato es una fuente de nitrógeno que debe ser reducida hasta amonio para poder ser incorporada a los esqueletos carbonados. En presencia de amonio sólo es necesaria una baja actividad GS para mantener el flujo de nitrógeno hacia los esqueletos carbonados. Sin embargo, en presencia de nitrato se requiere un nivel más alto de actividad GS para asegurar una cantidad de nitrógeno suficiente para el crecimiento celular. Por tanto, cuando se somete a las células a deficiencia de nitrógeno, el nivel de GSIII aumenta (Figura 32), de forma que se garantice que

cualquier ión de amonio que se produzca en el interior celular sea rápidamente incorporado.

La regulación de la expresión del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 recuerda en muchos aspectos a la descrita para el gen *glnA* en otras cianobacterias, como *Synechococcus* (Cohen-Kupiec, 1994) o *Synechocystis* 6803 (Reyes *et al.*, 1997). Esta regulación consiste en mantener bajos niveles de expresión en presencia de amonio, incrementarlos en presencia de nitrato y mantener un máximo de expresión en condiciones de hambre de nitrógeno (Figuras 31, 32 y 33). Este patrón de regulación se ajusta bastante bien al mecanismo de acción propuesto para el regulador NtcA, que actúa como activador transcripcional de genes regulados por la fuente de nitrógeno en ausencia de amonio en el medio de cultivo (Luque *et al.*, 1994). En *Synechocystis* 6803, NtcA regula la transcripción del gen *glnA* (Reyes *et al.*, 1997). Sin embargo, la regulación del gen *glnN* por NtcA en esta misma cianobacteria no es tan obvia, porque a pesar de que existe una secuencia en el promotor del gen que se ajusta bastante bien al consenso de unión de NtcA, hasta el momento no ha sido posible demostrar la unión *in vitro* de NtcA a esta región del promotor (Reyes *et al.*, 1997). No obstante, no se debe descartar la hipótesis de que NtcA controle la expresión del gen *glnN* en *Synechocystis* 6803, ya que se podrían requerir la presencia de otros factores adicionales que promoviesen la unión al promotor de este gen.

En la región promotora del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 se ha identificado una secuencia palindrómica a 34 nucleótidos del punto de inicio de transcripción, que se ajusta muy bien al consenso de unión a NtcA (Figura 34). Tan sólo difiere en uno de los seis nucleótidos del palíndromo GTA...N₈...TAC, aunque esto no impide de ninguna forma que se observe una unión de la proteína NtcA de *Synechocystis* 6803 a esta región promotora del gen *glnN*, como demuestran los resultados de retardo en gel de la Figura 35. Por tanto, NtcA debe tomar el control de la expresión de la GSIII en *Pseudanabaena* 6903, la única GS que ha sido identificada en este organismo, y de esta forma se mantienen unos niveles apreciables de GS bajo condiciones de crecimiento en nitrato.

4.6. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE LA GSIII DE *Pseudanabaena* 6903.

A pesar de las diferencias estructurales que existen entre la GSI y la GSII tanto en el número como en el tamaño de las subunidades, se ha propuesto que ambas GSs podrían tener mecanismos de acción muy similares (Meister, 1980; Maurizi *et al.*, 1987). Dado que la mayor parte de los residuos críticos en la catálisis de la GS están conservados en la GSIII de *Synechocystis* 6803 (Reyes y Florencio, 1994), se podría pensar que la reacción catalítica de este tipo de GS no debe diferir mucho de la propuesta para la GS tipo I y II. Hasta el momento no se ha cristalizado ninguna GSIII, por lo que no se tienen muchos datos acerca de su estructura. La GSIII de

Synechocystis 6803 (Reyes y Florencio 1994; García-Domínguez *et al.*, 1997), al igual que la de *B. fragilis* (Southern *et al.*, 1987), es una proteína hexamérica, con un tamaño para cada subunidad de 80 kDa y que, en el caso de *Synechocystis* 6803 presenta unos valores de K_m similares a los de la GSI de esta misma cianobacteria (García-Domínguez *et al.*, 1997).

La secuencia de aminoácidos DGSS, que incluye el residuo de Asp implicado en la unión y desprotonación del amonio en la catálisis de la GS, se encuentra absolutamente conservado en la GS tipo I y II (Pesole *et al.*, 1991). Este dominio está también conservado en la GSIII de *Pseudanabaena* 6903 y *Synechocystis* 6803, aunque ha sido sustituido por la secuencia DASS en la GSIII de *B. fragilis* y *R. flavefaciens*, y desaparece por completo en *B. fibrisolvens* (Figura 28). Los mutantes dirigidos de la GSIII de *Pseudanabaena* 6903 D130A y D130E se construyeron con el objetivo de investigar en la funcionalidad del residuo de Asp de este dominio en el mecanismo de acción de la GS tipo III. Los resultados obtenidos tras el análisis de la actividad de estas proteínas mutantes parece indicar que el residuo Asp-130 de la GSIII de *Pseudanabaena* 6903 podría tener una gran importancia en la catálisis de la enzima, ya que su sustitución por un residuo de Ala o Glu provoca un fuerte descenso de la actividad biosintética y transferasa (Tabla 17).

5. CONCLUSIONES

1. Se han obtenido y purificado a homogeneidad electroforética cinco mutantes dirigidos de la GS de *Anabaena azollae* en el residuo Asp-51, equivalente al residuo Asp-50 de la GS de *Escherichia coli* implicado en la unión y desprotonación del amonio durante la reacción catalítica de la enzima.

2. La sustitución del residuo Asp-51 de la GS de *Anabaena azollae* por los residuos de Ser, Ala o Asn provoca una disminución en la actividad catalítica de la enzima y una menor afinidad por el sustrato amonio. La sustitución del mismo residuo por Arg provoca una pérdida total de la actividad glutamina sintetasa. Por tanto, el residuo Asp-51 de la GS de *Anabaena azollae*, al igual que el Asp-50 de la GS de *Escherichia coli*, parece desempeñar un papel esencial en la unión y desprotonación del amonio en la catálisis de la enzima.

3. La distorsión provocada en el sitio activo del mutante dirigido D51E de la GS de *Anabaena azollae* podría afectar al proceso de fosforilación del glutamato que tiene lugar durante la catálisis de la enzima. Esta modificación provoca una fuerte disminución de la actividad biosintética pero no de la actividad transferasa y una elevada resistencia de la enzima a los inhibidores L-metionina-sulfoximina y fosfinotricina.

4. La cianobacteria *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 posee únicamente GS tipo III, codificada por el gen *glnN*, y constituye el primer caso descrito dentro de las cianobacterias que carece de la GS tipo I procariótica.

5. La regulación transcripcional del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903 en función de la disponibilidad de nitrógeno en el medio difiere de la descrita para este mismo gen en *Synechocystis* sp. PCC 6803, aunque es similar a la observada en el gen *glnA* de otras cianobacterias. El factor transcripcional NtcA se une al promotor del gen *glnN* de *Pseudanabaena* 6903, regulando la transcripción de dicho gen en función de la disponibilidad de nitrógeno en el medio de cultivo.

6. Se han obtenido mutantes dirigidos en el residuo conservado Asp-130 de la GS tipo III de *Pseudanabaena* 6903 equivalente a los residuos Asp-50 de la GS de *Escherichia coli* y Asp-51 de la GS de *Anabaena azollae*, que presentan un menor nivel de actividad que la enzima silvestre, indicando un papel esencial de este residuo en la catálisis de la GS tipo III.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abell, L. y J.J. Villafranca** (1991) Investigation of the mechanism of phosphinothricin inactivation of *E. coli* glutamine synthetase using rapid quench kinetic techniques. *Biochemistry* **30**: 6135-6141.
- Alibhai, M. y J.J. Villafranca** (1994) Kinetic and mutagenic studies of the role of the active site residues Asp-50 and Glu-327 of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry* **33**: 682-686.
- Almasy, R.J., C.A. Janson, R. Hamlin, N.-H. Xuong y D. Eisenberg** (1986) Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature* **323**: 304-330.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl** (1992) Currents Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Bayer, E., K.H. Gugel, K. Hägele, H. Hagenmaier, S. Jessipow, W.A. König y H. Zähler** (1972) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin and Phosphinothricin-alanyl-alanin. *Helv Chim Acta* **55**: 224-239
- Behrmann, I., D. Hillemann, A. Pühler, E. Strauch y W. Wohlleben** (1990) Overexpression of a *Streptomyces viridochromogenes* gene (*glnII*) encoding a glutamine synthetase similar to those of eukaryotes confers resistance against the antibiotic phosphinothricin-alanyl-alanine. *J Bacteriol* **172**: 5326-5334.
- Bergman, B, A. Matveyev y U. Rasmussen** (1996) Chemical signalling in cyanobacterial-plant symbioses. *Trends Plant Sci* **1(6)**: 191-197.
- Birnboim, H.C. y J. Doly** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Black , T.A., Y. Cai y C.P. Wolk** (1993) Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol Microbiol* **9**: 77-84.
- Blanco, F., A. Alaña, M.J. LLama y J.L. Serra** (1989) Purification and properties of glutamine synthetase from the non-N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J Bacteriol* **171**: 1158-1165.

- Böhme., H** (1998) Regulation of nitrogen fixation in heterocyst-forming cyanobacteria. *Trends Plant Sci* **3(9)**: 346-351.
- Böhme., H y R. Haselkorn** (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a gene coding for heterocyst ferredoxin from the cyanobacterium *Anabaena* sp PCC 7120. *Mol Gen Genet* **214**: 278-275.
- Boussiba, S., C.M. Resch y J. Gibson** (1984). Ammonia uptake and retention in some cyanobacteria. *Arch Microbiol* **138**: 287-292.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brouers, M., D.J. Shi y D.O. Hall** (1986) Immobilisation methods for cyanobacteria in solid matrices. *Methods Enzymol* **167**: 629-636.
- Cai, Y. y P. Wolk** (1990) Use of conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J Bacteriol* **172**: 3138-3145.
- Candau, P.** (1979) Purificación y propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- 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.
- Carlson, T.A. y B.K. Chelm** (1986) Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase II from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Nature* **322**: 568-570.
- Clark, D.D. y J.J. Villafranca** (1985) Isotope-exchange enhancement studies of *Escherichia coli* glutamine synthetase *Biochemistry* **24**: 5147-5152.
- 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.

- Chávez, S.** (1992) Glutamato deshidrogenasas en cianobacterias. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Chávez, S., J.M. Lucena, J.C. Reyes, F.J. Florencio y P. Candau** (1999) Glutamate dehydrogenase is a selective advantage for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under non-exponential growth. *J Bacteriol*
- Chávez, S. y P. Candau** (1991) An NAD-specific glutamate dehydrogenase from cyanobacteria. Identification and properties. *FEBS Lett* **285**: 35-38.
- Chiurazzi, M., R. Meza, M. Lara, A. Lahm, R. Defez, M. Iaccario y G. Espin** (1992) The *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli* *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. *Gene* **119**: 1-8.
- Crespo, J.L., M. García-Domínguez y F.J. Florencio** (1998) Nitrogen control of the *glnN* gene that codes for GS type III, the only glutamine synthetase in the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. *Mol Microbiol* **30** (5): 1101-1112.
- Datta, N., R.W. Hedges, E.J. Shaw, R.B. Sykes y M.H. Richmond** (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **108**: 1244-1249.
- de Bruijn, F.J., S. Rossbach, M. Schneider, P. Ratet, S. Messmer, W.W. Szeto, F.M. Ausubel y J. Schell** (1989) *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J Bacteriol* **171**: 1673-1682.
- Deng, W. y J. Nickolof** (1992) Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal Biochem* **200**: 81.
- Deuel, T.F. y E.R. Stadtman** (1970) Some kinetic properties of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. *J Biol Chem* **245**: 5206:5213.
- Devereux, J., P. Haerberli y O. Smithies** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl Acids Res* **12**: 387-395.
- Dharmawardene, M.W.N. A. Haystead y W.D.P. Stewart** (1973) Glutamine synthetase of the nitrogen-fixing alga *Anabaena cylindrica*. *Arch Mikrobiol* **90**: 281-295.

- Edmands, J., N.A. Noridge y D.R. Benson** (1987) The actinorhizal root-nodule symbiont *Frankia* sp. strain Cp11 has two glutamine synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6126-6130.
- Elhai, J. y C.P. Wolk** (1988a) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**: 119-138.
- Elhai, J. y C.P. Wolk** (1988b) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**: 747-754.
- Elmorjani, K., S. Liotenberg, J. Houmard y N. Tandeau du Marsac** (1992) Molecular characterization of the gene encoding glutamine synthetase in the cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601. *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 1296-1302.
- Ericson, M.C.** (1985) Purification and properties of glutamine synthetase from spinach leaves. *Plant Physiol* **79**: 923-927.
- Espin, G., S. Moreno, M. Wild, R. Meza y M. Iaccarino** (1990) A previously unrecognized glutamine synthetase expressed in *Klebsiella pneumoniae* from the *glnT* locus of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Gen Genet* **223**: 513-516.
- Fisher, R., R. Tuli y R. Haselkorn** (1981) A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase function in *Escherichia coli*, but the enzyme is not adenylylated. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3393-3397.
- 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.
- Florencio, F.J. y J.M. Vega** (1983) Separation, purification and characterization of two isoforms of glutamine synthetase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Z Naturforsch* **38c**: 531-538.
- Florencio, F.J., S. Chávez, M.I. Muro-Pastor, J.C. Reyes, S. Marqués, A. Mérida y P. Candau** (1992) Interaction between photosynthesis and nitrogen assimilating enzymes in cyanobacteria. En *Trends in Photosynthesis Research*. (J. Barber, M.

- G. Guerrero y H. Medrano, Eds.) Intercept, Ltd., Andover (Inglaterra). pp 231-240.
- Florencio, F.J., S. Marqués y P. Candau** (1987) Identification and characterization of glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Lett* **223**: 37-41.
- 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. pp 487-517.
- Flores, E. y A.M. Muro-Pastor** (1990) Mutation and kinetic analysis of basic amino acid transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch Microbiol* **154**: 521-527.
- Flores, E. y A.M. Muro-Pastor** (1988) Uptake of glutamine and glutamate by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett* **56**: 127-123.
- 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.
- Forchhammer, K. y N. Tandeau de Marsac** (1994) The P_{II} protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. *J Bacteriol* **176**: 84-91.
- Frías, J.E., A. Mérida, A. Herrero, J. Martín-Nieto y E. Flores** (1993) General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. *J Bacteriol* **175**: 5710-5713.
- 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.

- García-Domínguez, M.G. y F.J. Florencio** (1997) Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding P_{II} protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* **35**: 723-734.
- García-Domínguez, M.G., J.C. Reyes y F.J. Florencio** (1997) Purification and characterization of a new type of glutamine synthetase from cyanobacteria. *Eur J Biochem* **244**: 258-264.
- Ginsburg, A. y E.R. Stadtman** (1973) Regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. En *The enzymes of glutamine metabolism*. (S. Prusiner y E.R. Stadtman, Eds.). New York: Academic Press. pp 9-43.
- Gass, J.D. y A. Meister** (1970) 1-Amino-1,3-dicarboxycyclohexane (cycloglutamic acid). A new glutamic acid analog and a substrate of glutamine synthetase. *Biochemistry* **9**: 842
- Garbisu, C., D.O. Hall y J.L. Serra** (1992) Nitrate and nitrite uptake by free-living and immobilised N-starved cells of *Phormidium laminosum*. *J Chem Tech Biotechnol* **57**: 181-189.
- Garbisu, C., J.M. Gil, M.J. Bazin, D.O. Hall y J.L. Serra** (1994) Inorganic nitrogen and phosphate removal from water by free-living and polyvinyl-immobilised *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *J Chem Tech Biotechnol* **16**: 395-401.
- 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.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, T. Berkelman y C.I. Kado** (1985) Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **164**: 918-921.
- Gay, P., D. Le Coq, M. Steinmetz, E. Ferrari y J.A. Hoch** (1983) Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: Expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **153**: 1424-1431.
- Goodman, H.J.H. y D.R. Woods** (1993) Cloning and nucleotide sequence of the *Butyrivibrio fibrisolvens* gene encoding a type III glutamine synthetase. *J Gen Microbiol* **139**: 1487-1493.

- Gray, M.W (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Gen* 5: 294-299.
- Guerrero, M.G. y C. Lara (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. En *The Cyanobacteria* (P. Fay and C. Van Baalen, Eds.). Elsevier Science Publisher, Amsterdam. pp 163-186.
- 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.
- Hall, D.O. y K.K. Rao (1989) Immobilised photosynthetic membranes and cells for the production of fuels and chemicals. *Chimica Oggi* 7(3): 41-47.
- Hall, D.O., S.A. Markov, Y. watanabe y K.K. Rao (1995) The potential applications of cyanobacterial photosynthesis for clean technologies. *Photosynthesis Research* 46: 159-167.
- Hanahan, D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. En *Cloning*, vol. 1 (D. M. Glover, Ed.) IRL Press, Oxford.
- Healey, F.P. (1977) Ammonium and urea uptake by some freshwater algae. *Can J Bot* 55: 61-69.
- Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28: 351-359.
- Herrero, A. y E. Flores (1990) Transport of basic aminoacids by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J Biol Chem* 265: 3931-3935.
- Heyns, W. y P. DeMoor (1974) A 3(17) β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat erythrocytes conversion of 5 α -dihydrotestosterone into 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol-and purification of the enzyme by affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta* 358: 1-13.
- Hien, N.T., N.W. Kerby, G.C. Machray, P. Rowell y W.D.P. Stewart (1988) Expression of glutamine synthetase in mutant strains of the cyanobacterial *Anabaena variabilis* which liberate ammonia. *FEMS Lett* 56: 337-342.
- Hill, D.J. (1975) The pattern of development of *Anabaena* in the *Azolla*-*Anabaena* symbioses. *Planta* 122: 179-184.



- Hill, R.T., J.R. Parker, H.J.K. Goodman, D.T. Jones y D.R. Woods** (1989) Molecular analysis of a novel glutamine synthetase of the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Gen Microbiol* **135**: 3271-3279.
- Jaggi, R., W.C. van Heeswijk, H.V. Westerhoff, D.L. Ollis y S.G. Vasudevan** (1997) The two opposing activities of adenylyl transferase reside in distinct homologous domains, with intramolecular signal transduction. *EMBO J* **16**: 5562-5571.
- Jovin, T., A. Chrambach y M.A. Naughton** (1964) Apparatus for preparative temperature regulated polyacrilamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* **9**: 351-364.
- Kerby, N.W., P. Rowell y W.D.P. Stewart** (1985) Ethilenediamine uptake and metabolism in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch Microbiol* **141**: 244-248.
- Kerby, N.W., S.C. Musgrave, P. Rowell, S.V. Shestakov y W.D.P. Stewart** (1986a) Photoproduction of ammonium by immobilized mutant strains of *Anabaena variabilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **24**: 42-46.
- Kerby, N.W., P. Rowell y W.D.P. Stewart** (1986b) The uptake and metabolism of methylamine by N_2 -fixing cyanobacteria. *Arch Microbiol* **143**: 353-358.
- Kleiner, D.** (1981) The transport of NH_3 and NH_4^+ across biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **639**: 41-52.
- Kumada, Y., D.R. Benson, D. Hillemann, T.J. Hosted, D.A. Rochefort, C.J. Thompson, W. Wohlleben y Y. Tateno** (1993) Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing functioning genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3009-3013.
- 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.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lambert, G.R. y G.D. Smith** (1981) The hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Biol Rev* **56**: 589-660.
- Lara, C., J.M. Romero y M.G. Guerrero** (1987) Regulated nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Bacteriol* **169**: 4376-4378.
- Lea, P.J. y B.J. Mifflin** (1975) Glutamate synthesis in blue-green algae. *Biochem Soc Trans* **3**: 381-384.
- Lea, P.J., K.W. Joy, J.L. Ramos y M.G. Guerrero** (1984) The action of 2-amino-4-(methylphosphinyl)-butanoic acid (phosphinothricin) and its 2-oxo-derivative on the metabolism of cyanobacteria and higher plants. *Phytochemistry* **23**: 1-6.
- Leason, M., D. Cunliffe, D. Parkin, P.J. Lea y B.J. Mifflin** (1982) Inhibition of pea leaf glutamine synthetase by methionine sulphoximine, phosphinothricin and other glutamate analogues. *Phytochemistry* **21**: 855-857.
- Lee, H.M., E. Flores, A. Herrero, J. Houmard y N. Tandeau de Marsac** (1998) A role for the signal transduction protein P_{II} in the control of nitrate/nitrite uptake in a cyanobacterium. *FEBS Lett* **427**: 291-295.
- Liaw, S.-H. y D. Eisenberg** (1994) Structural model for the reaction mechanism of glutamine synthetase based on five crystal structures of enzyme-substrate complexes. *Biochemistry* **33**: 675-681.
- Liaw, S.-H., J.J. Villafranca y D. Eisenberg** (1993a) A model for oxidative modification of glutamine synthetase, based on crystal structures of mutants H269N and the oxidized enzyme. *Biochemistry* **32**: 7999-8003.
- Liaw, S., C. Pan y D. Eisenberg** (1993b) Feedback inhibition of fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium* by glycine, alanine, and serine. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4996-5000.
- Liaw, S., I. Kuo y D. Eisenberg** (1995) Discovery of the ammonium substrate site on glutamine synthetase, a third cation binding site. *Prot Sci* **4**: 2358-2365.
- Logusch, E.W., D.M. Walker, J.F. McDonald y J.E. Franz** (1989) Substrate variability as a factor in enzyme inhibitor design: inhibition of ovine brain

- glutamine synthetase by α - and γ -substituted phosphinothricins. *Biochemistry* **28**: 3043-3051.
- Logusch, E.W., D.M. Walker, J.F. McDonald, J.E. Franz, J.J. Villafranca, C.L. DiIanni, J.A. Colanduoni, B. Li y J.B. Schineller** (1990) Inhibition of *Escherichia coli* glutamine synthetase by α - and γ -substituted phosphinothricins. *Biochemistry* **29**: 366-372.
- 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** (1994) Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J* **13**: 2862-2869.
- Magasanik, B. y F.C. Neidhardt** (1987) Regulation of carbon and nitrogen utilization, En *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*. (Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E. Eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 1318-1325.
- Manning, J.M., S. Moore, W.B. Rowe y A. Meister** (1969) Identification of L-methionine S-sulfoximine as the diastereoisomer of L-methionine SR-sulfoximine that inhibits glutamine synthetase. *Biochemistry* **8**: 2681
- 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.
- Markov, S.A., M.J. Bazin y D.O. Hall** (1995) The potential of using cyanobacteria in photobioreactors for hydrogen production. *Advances in Biochem Eng Biotech* **52**: 61-86.
- Markwell, M.A., S.M. Haas, L.L. Bieber y N.E. Tolbert** (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membranes and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**: 206-210.

- Marqués, S., F.J. Florencio y P. Candau** (1992a) Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur J Biochem* **206**: 69-77.
- Marqués, S., A. Mérida, P. Candau y F.J. Florencio** (1992b) Light-mediated regulation of glutamine synthetase activity in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Planta* **187**: 247-253.
- Maurizi, M.R., H.B. Pinkofsky y A. Ginsburg** (1987) ADP, chloride ion, and metal ion binding to bovine brain glutamine synthetase. *Biochemistry* **26**: 5023-5031.
- McKinney, G** (1941) Absorption of light by chlorophyll solution. *J Biol Chem* **140**: 315-322.
- Meek, T.D. y J.J. Villafranca** (1980) Kinetic mechanism of *Escherichia coli* glutamine synthetase. *Biochemistry* **19**: 5513-5519.
- 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.
- Meeks, J.C., C.P. Wolk, W. Lockau, N. Schilling, P.W. Shaffer y W.S. Chien** (1978) Pathways of assimilation of $^{13}\text{N}_2$ and $^{13}\text{NH}_4^+$ by cyanobacteria with and without heterocysts. *J Bacteriol* **134**: 125-130.
- Meister, A** (1974) Glutamine synthetase of mammals. En: *The Enzymes* Vol X. Boyer, P.D. (Ed.). Academic Press. New York. pp 699-754.
- Meister, A.** (1980) Catalytic mechanism of glutamine synthetase; Overview of glutamine metabolism. En: *Glutamine: metabolism, enzymology, and regulation of glutamine metabolism* (R. Palacios y J. Mora Eds.). New York: Academic Press. pp 1-40.
- Mérida, A** (1990) Glutamina sintetasa de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp PCC 6803: purificación, estudios de su regulación por la fuente de nitrógeno y clonación del gen *glnA*. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Mérida, A., E. Flores y F.J. Florencio** (1992) Regulation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 glutamine synthetase activity in a *Synechocystis* sp. strain PCC 6803

derivative strain bearing the *Anabaena glnA* gene and a mutated host *glnA* gene. *J Bacteriol* **174**: 650-654.

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.

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

Mérida, A., P. Candau y F.J. Florencio (1991b) *In vitro* reactivation of *in vivo* ammonium-inactivated glutamine synthetase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 780-786.

Montesinos, M.L., A. Herrero y E. Flores (1995) Amino acid transport systems required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J Bacteriol* **177**: 3150-3157.

Montesinos, M.L., A. Herrero y E. Flores (1997) Amino acid transport in taxonomically diverse cyanobacteria and identification of two genes encoding elements of a neutral amino acid permease putatively involved in recapture of leaked hydrophobic amino acids. *J Bacteriol* **179**: 853-862.

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 (1992) Purification and properties of NADP-isocitrate dehydrogenase from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur J Biochem* **203**: 99-105.

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.

Nakano, Y. C. Kato, E. Tanaka, K. Kimura y K. Horikoshi (1989) Nucleotide sequence of the glutamine synthetase gene (*glnA*) and its upstream region from *Bacillus cereus*. *J Biochem* **106**: 209-215.

- Navarro, F, S. Chavez, 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.
- Neilson, A. H. y M. Doudoroff (1973) Ammonia assimilation in blue-green algae. *Arch Mikrobiol* **89**: 15-22.
- Ohmori, M., K. Ohmori y H. Strotmann (1977) Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *Arch Microbiol* **114**: 225-229.
- Omata, T., X. Andriessse y A. Hirano (1993) Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechoccus* sp. PCC 7942. *Mol Gen Genet* **236**: 193-202.
- Orr, J. y R. Haselkorn (1981) Kinetic and inhibition studies of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J Biol Chem* **256**: 13099-13204.
- Orr, J. y R. Haselkorn (1982) Regulation of glutamine synthetase activity and synthesis in free-living and symbiotic *Anabaena* spp. *J Bacteriol* **152**: 626-635.
- Orr, J., L.M. Keefer, P. Keim, T.D. Nguyen, T. Wellems, L. Heinrikson y R. Haselkorn (1981) Purification, physical characterization and NH₂-terminal sequence of glutamine synthetase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J Biol Chem* **256**: 13091-13098.
- Pace, J. y E.E. McDermott (1952) Methionine sulphoximine and some enzymes systems involving glutamine. *Nature* **169**: 415-416.
- 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.
- Pearson, W.R. y D.J. Lipman (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 2444-2448.
- Penefsky, H.S (1977) Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **252**: 2891-2899.

- Pesole, G., M.P. Bozzetti, C. Lanave, G. Preparata y C. Saccone** (1991) Glutamine synthetase gene evolution: A good molecular clock. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 522-526.
- Petersen, C.** (1992) Control of functional mRNA stability in bacteria: multiple mechanism of nucleolytic and non-nucleolytic inactivation. *Mol Microbiol* **6**: 277-282.
- Peters, G.A. y J.C. Meeks** (1989) The *Azolla-Anabaena* symbiosis: basic biology. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 193-210.
- Polukhina, L.E., G.N. Sakhurieva y S.V. Shestakov** (1982) Ethylenediamine-resistant *Anabaena variabilis* mutants with derepressed nitrogen-fixing system. *Mikrobiologiya* **51**: 90-95.
- Prusiner, S. y E.R. Stadtman** (1973) The enzymes of glutamine metabolism. Academic Press. New York.
- 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.
- Ramos, J.L., M.G. Guerrero y M. Losada** (1982a) Photoproduction of ammonia from nitrate by *Anacystis nidulans* cells. *Biochim Biophys Acta* **679**: 323-330.
- Ramos, J.L., M.G. Guerrero y M. Losada** (1982b) Sustained photoproduction of ammonia from nitrate by *Anacystis nidulans*. *Appl Env Microbiol* **44**: 1020-1025.
- 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.). American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 302-320.
- Reyes, J.C. y F.J. Florencio** (1994) A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Bacteriol* **176**: 1260-1267.

- Reyes, J.C. y F.J. Florencio** (1995) A novel mechanism of glutamine synthetase inactivation by ammonium in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Involvement of an inactivating protein. *FEBS Lett* **367**: 45-48.
- Reyes, J.C., J.L. Crespo, M.G. García-Domínguez y F.J. Florencio** (1995) Electron transport controls glutamine synthetase activity in the facultative heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plan Physiol* **109**: 899-905.
- 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.
- Rhee, S.G., P.B. Chock y E.R. Stadtman** (1989) Regulation of Escherichia coli glutamine synthetase. En: *Advances in Enzymology*. (A. Meister, Ed.) Wiley Interscience. New York.
- Riccardi, G., E. De Rossi, G. Della Valle y O. Ciferri** (1985) Cloning of the glutamine synthetase gene from *Spirulina platensis*. *Plant Mol Biol* **4**: 133-136.
- Ried, J.L. y A. Collmer** (1987) An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange-
eviction mutagenesis. *Gene* **57**: 239-246.
- Rippka, R., 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.
- 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.
- Roszbach, S., J. Schell y F.J. de Bruijn** (1988) Cloning and analysis of *Agrobacterium tumefaciens* C58 loci involved in glutamine biosynthesis: Neither the *glnA* (GSI) nor the *glnII* (GSII) gene plays a special role in virulence. *Mol Gen Genet* **212**: 38-47.
- Ronzio, R.A. y A. Meister** (1968) *Proc Natl Acad Sci* **59**: 164

- Ronzio, R.A., W.B. Rowe y A. Meister** (1969) Studies on the mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry* **8**: 1066
- Rowe, W.B., R.A. Ronzio y A. Meister** (1969) Inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. Studies on methionine sulphoximine phosphate. *Biochemistry* **8**: 2674
- Rowe, W.B. y A. Meister** (1973) Studies on the inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfone. *Biochemistry* **12**: 1578
- Rowell, P., M.J.A.M. Sampaio, J.K. Ladha y W.D.P. Stewart** (1979) Alteration of cyanobacterial glutamine synthetase activity in vivo in response to light and NH_4^+ . *Arch Microbiol* **120**: 195-200.
- Rowell, P., S. Enticott y W.D.P. Stewart** (1977) Glutamine synthetase and nitrogenase activity in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *New Phytol* **79**: 41-54.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis** (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 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., S. Nicklen y A.R. Coulson** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Schmidt, A.** (1988) Sulfur metabolism in cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**: 572-583.
- Schopf, J.W.** (1983) Earth's Earliest Biosphere: Its origin and evolution. Princeton Univ. Press, Princeton.
- Schrautemeier, B. y H. Böhme** (1992) Coding sequence of a heterocyst ferredoxin gene (*fdxH*) isolated from the nitrogen-fixing cyanobacterium *Chalothrix* sp. PCC 7601. *Plant Mol Biol* **18**: 1005-1006.

- Schrautemeier, B. y H. Böhme (1985) A distinct ferredoxin for nitrogen fixation isolated from heterocysts of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEBS Lett* **184**: 304-308.
- Shapiro, B.M. y E.R. Stadtman (1970) Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol* **17a**: 910-922.
- Shatters, R.G., Y. Liu y M.L. Kahn (1993) Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J Biol Chem* **256**: 13091-13098.
- Smith, A.J (1982) Modes of cyanobacterial carbon metabolism. En *The biology of cyanobacteria* (N. G. Carr y B. A. Whitton, Eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp 47-85.
- Snustad, D.P., J.P. Hunsperger, B.M. Chereskin y J. Messing (1988) Maize glutamine synthetase cDNAs: Isolation by direct genetic selection in *Escherichia coli*. *Genetics* **120**: 1111-1124.
- Southern, J.A., J.R. Parker y D.R. Woods. (1986) Expression and purification of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. *J Gen Microbiol* **132**: 2827-2835.
- Southern, J.A., J.R. Parker y D.R. Woods (1987) Novel structure properties and inactivation of glutamine synthetase cloned from *Bacteroides fragilis*. *J Gen Microbiol* **133**: 2437-2446.
- Stacey, G., C. Van Baalen y F.R. Tabita (1979) Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: regulation of glutamine synthetase. *Arch Biochem Biophys* **194**: 457-467.
- Stacey, G., F.R. Tabita y C. Van Baalen (1977) Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: purification of glutamine synthetase from *Anabaena* sp. strain CA. *J Bacteriol* **132**: 596-603.
- Stadtman, E.R. y A. Ginsburg (1974) The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. En: *The Enzymes* Vol X. Boyer, P.D. (Ed.). Academic Press. New York. pp 755-807.
- Stanier, R.Y. y G. Cohen-Bazire (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann Rev Microbiol* **31**: 225-274.

Swaminathan, M.S. (1984) Rice. *Sci American* **250**(1): 62-71.

Thomas, J., J.C. Meeks, C.P. Wolk, P.W. Shaffer, S.M. Austin y W.-S. Chien (1977) Formation of glutamine from [¹³N]ammonia, [¹³N]dinitrogen, and [¹⁴C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J Bacteriol* **129**: 1545-1555.

Thompson, S.T., K.H. Cass y E. Stellwagen (1975) Blue Dextran-Sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 669-672.

Thompson, S.T. y E. Stellwagen (1976) Binding of Cibacron blue F3GA to proteins containing the dinucleotide fold. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 361-365.

Tsinoremas, N.F., A.M. Castets, M.A. Harrison, J.F. Allen y N. Tandeau de Marsac (1991) Photosynthetic electron transport controls nitrogen assimilation in cyanobacteria by means of posttranslational modification of the *glnB* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4565-4569.

Tuli, R. y J. Thomas (1981) *In vivo* regulation of glutamine synthetase by ammonium in the cyanobacterium *Anabaena* L-31. *Arch Biochem Biophys* **206**: 181-189.

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.

Turpin, D.H., S.A. Edie y D.T. Canvin (1984) *In vivo* nitrogenase regulation by ammonium and methylamine and the effect of MSX on ammonium transport in *Anabaena flos-aquae*. *Plant Physiol* **74**: 701-704.

Vasudevan, S.G., C. Gedye, N.E. Dixon, E. Cheah, P.D. Carr, P.M. Suffolk, P.D. Jeffrey y D.L. Ollis (1994) *Escherichia coli* P_{II} protein: purification, crystallization and oligomeric structure. *FEBS Lett.* **337**:255-258.

Vega-Palas M.A., F. Madueño, A. Herrero y E. Flores (1990) Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* **172**: 643-647.

- Vega-Palás, M.A., E. Flores y A. Herrero (1992) NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belong to the Crp family of bacterial regulators. *Mol Microbiol* **6**: 1853-1859.
- Wagner, S.J., S.P. Thomas, R.I. Kaufman, B.T. Nixon y S.E. Stevens Jr (1993) The *glnA* gene of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 is nonessential for ammonium assimilation. *J Bacteriol* **175**: 604-612.
- 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.
- 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 ^{13}N -labeled nitrogen gas by the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *J Biol Chem* **251**: 5027-5034.
- Wolk, C.P., A. Vonshak, P. Kehoe y J. Elhai (1984) Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1561-1565.
- Wolk, C.P., A. Ernst y J. Elhai (1994) Heterocyst metabolism and development. En *The molecular Biology of the Cyanobacteria*. D. A. Bryant, (Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp 769-823.
- Woolfolk, C.A. y E.R. Stadtman (1967) Regulation of glutamine synthetase. III. Cumulative feedback inhibition of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **118**: 736-755.
- Yamashita, M.M., R.J. Almassy, C.A. Janson, D. Cascio y D. Eisenberg (1990) Refined atomic model of glutamine synthetase at 3.5 Å resolution. *J Biol Chem* **264**: 17681-17690.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

JOSE LUIS CRISTO GONZALEZ
Los putamon fuitatos de Anisema
cralice (GSI) y Pseudomonas sp. PCC 6703
(GSIH). Mutante derivado de la cepa
SOLICITANTE "COT LADE"

por UNANIMIDAD

18

Junio

99

Heriberto

Alt

Linea de R

César Ch

Melamed

César