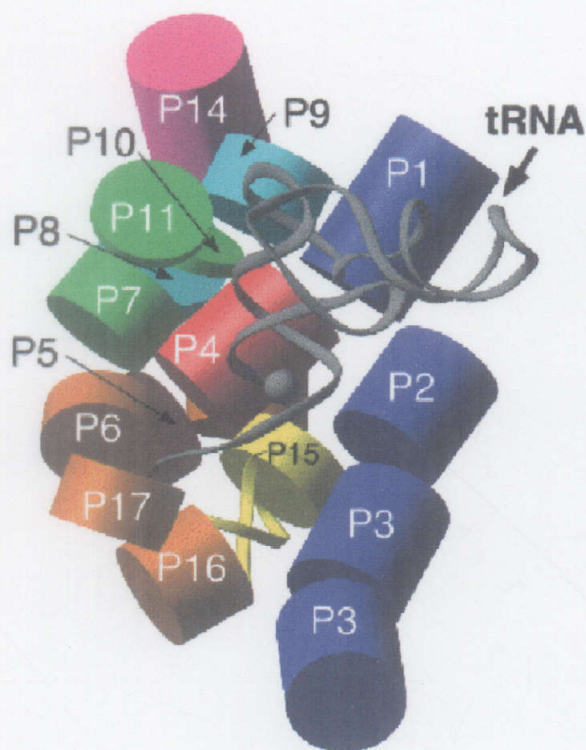


**ESTUDIO FUNCIONAL DE LA RIBONUCLEASA P  
DE LA CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp. PCC 6803**



**Alberto Pascual Bravo**  
Universidad de Sevilla, 1998

TD

2.12



UNIVERSIDAD  
de SEVILLA

RECTORADO

TD-414

Dado que es frecuente que en las Bibliotecas Universitarias se solicite la consulta o préstamo de tesis doctorales una vez que han sido leídas, y debido a que la legislación vigente no permite la consulta sin la previa autorización del autor/a, le sugerimos que, si lo estimase oportuno, cumplimente el siguiente formulario lo que permitirá a los usuarios que lo soliciten acceder a su trabajo en las dependencias habilitadas a este efecto en los Centros de esta Universidad.

Nombre del autor/a de la tesis:

D/D<sup>a</sup> Alberto Pascual Bravo .....

D.N.I. nº 31265103 F ..... Estudio  
, autor/a de la tesis doctoral titulada.....  
funcional de la ribonucleasa P de la cianobacteria... ..

**AUTORIZA la consulta de la citada tesis según la/a modalidad/es abajo indicadas:**

- consulta en sala
- reproducción parcial
- reproducción total
- préstamo interbibliotecario

Sevilla, ...15. de Marzo..... de 199<sup>9</sup>

Fdo.: Alberto Pascual Bravo

R.16.775



**ESTUDIO FUNCIONAL DE LA  
RIBONUCLEASA P DE LA  
CIANOBACTERIA**

***Synechocystis* sp. PCC 6803**

Trabajo presentado para optar al grado de  
Doctor en Biología por el licenciado

**Alberto Pascual Bravo**

Sevilla, Noviembre de 1998.

Director:

Dr. Agustín Vioque Peña  
Prof. Titular de Bioquímica y  
Biología Molecular

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
en el folio 74 número 216 del libro  
correspondiente.  
Sevilla, 23 de Noviembre de 1998

El Jefe del Negociado de Teoría,

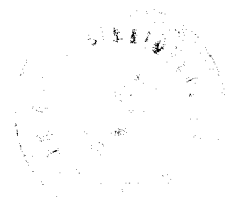
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
TAMPONES.....	XV
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. LA RIBONUCLEASA P (RNasa P) .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Composición de la RNasa P.....	4
1.1.2. Estructura del RNA P.....	5
1.1.3. Diversidad estructural de la RNasa P .....	8
1.1.3.1. La RNasa P bacteriana.....	8
1.1.3.2. La RNasa P de arqueobacterias .....	10
1.1.3.3. La RNasa P eucariótica.....	10
1.1.3.4. La RNasa P de mitocondrias .....	11
1.1.3.5 La RNasa P de cloroplastos.....	11
1.1.3.6. La RNasa P de cianobacterias.....	12
1.1.4. Reacción de la RNasa P .....	12
1.1.4.1. Estudios cinéticos y termodinámicos de la reacción RNasa P .....	12
1.1.4.2. Papel de los metales divalentes .....	13
1.1.4.3. Reconocimiento de sustrato .....	14
<b>1.2. LAS CIANOBACTERIAS .....</b>	<b>15</b>
1.2.1. Características generales.....	15
1.2.2. <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	18
<b>1.1.3. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>

<b>2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.1. Cianobacterias.....</b>	<b>23</b>
2.1.1.1. <i>Estirpes de cianobacterias utilizadas .....</i>	23
2.1.1.2. <i>Cultivos de cianobacterias en medio líquido.....</i>	23
2.1.1.3. <i>Cultivos de cianobacterias en medio sólido .....</i>	23
<b>2.1.2. <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>24</b>
2.1.2.1. <i>Estirpes de E. coli utilizadas.....</i>	24
2.1.2.2. <i>Medios y condiciones de cultivo .....</i>	24
<b>2.1.3. Método de recogida de células .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1. Inducción de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.2. Preparación de extractos celulares.....</b>	<b>26</b>
2.2.2.1. <i>Rotura con perlas de vidrio .....</i>	26
2.2.2.2. <i>Rotura con alúmina.....</i>	27
2.2.2.3. <i>Preparación de extracto del cianelo de <i>Cyanophora paradoxa</i> .....</i>	27
<b>2.2.3. Obtención del lavado ribosómico.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.4. Técnicas cromatográficas .....</b>	<b>28</b>
2.2.4.1. <i>Filtración en gel.....</i>	28
2.2.4.2. <i>Cromatografía en gel de afinidad por histidinas.....</i>	29
<b>2.2.5. Electroforesis de proteínas .....</b>	<b>29</b>
2.2.5.1. <i>Electroforesis analíticas en geles de SDS-poliacramida.....</i>	29
2.2.5.2. <i>Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida .....</i>	30
2.2.5.3. <i>Precipitación de proteína con TCA .....</i>	30
<b>2.2.6. Técnicas inmunológicas .....</b>	<b>31</b>
2.2.6.1. <i>Obtención de antisuero contra la proteína P de <i>Synechocystis</i> en conejo ...</i>	31
2.2.6.2. <i>Purificación de los anticuerpos mediante afinidad a gel de proteína A</i> <i>Sepharosa .....</i>	31
2.2.6.3. <i>Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante Western blot.</i>	31
<b>2.2.7. Eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones de</b> <b>proteínas y ácidos nucleicos .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>33</b>

<b>2.3.1. Plásmidos y genotecas utilizados .....</b>	<b>33</b>
<b>2.3.2. Aislamiento y análisis de DNA .....</b>	<b>35</b>
2.3.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	35
2.3.2.2. Aislamiento de DNA plasmídico de alta calidad de <i>E. coli</i> .....	35
2.3.2.3. Aislamiento de DNA total de cianobacterias .....	35
2.3.2.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa .....	36
2.3.2.5. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa .....	36
2.3.2.6. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA .....	37
2.3.2.7. Marcaje radioactivo de oligonucleótidos en extremo 5' .....	37
2.3.2.8. Transferencia de DNA a filtros de nylon .....	37
2.3.2.9. Detección de secuencias de DNA mediante hibridación con sondas radiactivas (Southern blot) .....	38
2.3.2.10. Detección de secuencias de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> mediante hibridación de colonias con sondas radiactivas. ....	38
2.3.2.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	39
2.3.2.12. Generación de mutantes dirigidos .....	40
2.3.2.13. Manipulaciones enzimáticas del DNA .....	42
2.3.2.14. Fraccionamiento de DNA en gradiente de sacarosa para construcción de genotecas .....	42
<b>2.3.3. Secuenciación de DNA .....</b>	<b>43</b>
2.3.3.1. Obtención de deleciones seriadas de fragmentos de DNA mediante digestión con exonucleasa III .....	43
2.3.3.2. Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea- poliacrilamida .....	44
<b>2.4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA IN VITRO .....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.1. Aislamiento de RNA total de <i>Synechocystis</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>2.4.2. Preparación de RNAs mediante transcripción <i>in vitro</i> .....</b>	<b>45</b>
2.4.2.1. Transcripción preparativa .....	45
2.4.2.2. Separación de RNA en geles desnaturalizantes de poliacrilamida .....	47
2.4.2.3. Purificación de RNA marcado con <sup>32</sup> P de geles desnaturalizantes de poliacrilamida .....	47

2.4.3. Marcaje de RNA en el extremo 5' .....	47
2.4.4. Interacción RNA-RNA .....	48
2.4.4.1. Análisis de la interacción RNA-RNA mediante la técnica de retardo en gel .....	48
2.4.4.2. Análisis de la interacción RNA-RNA mediante la técnica de interacción en filtro .....	48
2.4.5. Interacción RNA-proteína. Cálculo de constantes de disociación .....	48
2.4.5.1. Análisis de la interacción RNA-proteína mediante la técnica de retardo en gel .....	48
2.4.5.2. Análisis de la interacción RNA-proteína mediante la técnica de Northwestern .....	49
2.4.6. Extensión del cebador .....	49
2.5. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD RNasa P .....	50
2.6. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA .....	51
2.6.1. Obtención de células competentes y transformación de <i>E. coli</i> .....	51
2.7. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS .....	52
2.7.1. Determinación de proteína .....	52
2.7.3. Determinaciones espectrofotométricas .....	52
2.7.4. Medidas de pH .....	52
2.7.5. Determinación de la concentración salina .....	52
2.7.6. Cuantificación de DNA y RNA .....	52
2.7.7. Determinación de $K_m$ y $V_{max}$ .....	53
2.8. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA RNA Y PROTEÍNAS .....	53
3. RESULTADOS .....	57
3.1 CLONACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD RNasa P DE ALGUNAS CIANOBACTERIAS .....	57
3.1.1. Identificación del gen codificante del RNA P ( <i>rnpB</i> ) de <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903 .....	57

3.1.1.1. Hibridación heteróloga.....	57
3.1.1.2. Construcción de una subgenoteca de <i>Pseudanabaena</i> .....	57
3.1.1.3. Secuenciación del gen <i>rnpB</i> .....	59
<b>3.1.2. Clonación del gen codificante de la proteína P (<i>rnpA</i>) de <i>Synechocystis</i>.....</b>	<b>60</b>
3.1.2.1. Construcción de una genoteca de <i>Synechocystis</i> .....	60
3.1.2.2. Clonación mediante complementación de un mutante termosensible de <i>E. coli</i> .....	61
3.1.2.3. Mapeo del gen <i>rnpA</i> en <i>pAP200</i> y secuenciación del mismo.....	62
3.1.2.4. Análisis de la secuencia de DNA obtenida.....	63
3.1.2.5. Determinación del punto de inicio de la transcripción del gen <i>rnpA</i> de <i>Synechocystis</i> .....	63
3.1.2.6. Análisis de la secuencia de la proteína P de <i>Synechocystis</i> .....	65
<b>3.2. CARACTERIZACIÓN <i>in vitro</i> DE LA RNasa P DE <i>Synechocystis</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.1. Construcción de vectores para la transcripción <i>in vitro</i> con RNA polimerasa del fago T7 de diferentes RNAs.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2.2. Expresión en <i>E. coli</i>, purificación y obtención de anticuerpos contra la proteína P de <i>Synechocystis</i>.....</b>	<b>69</b>
3.2.2.1. Expresión del gen <i>rnpA</i> en <i>E. coli</i> .....	69
3.2.2.2. Purificación de la proteína recombinante.....	70
3.2.2.3. Obtención de anticuerpos y detección de proteínas por Western blot.....	73
<b>3.2.3. Caracterización funcional de la RNasa P de <i>Synechocystis</i>.....</b>	<b>75</b>
3.2.3.1. Efecto de la concentración de potasio y magnesio sobre la actividad RNasa P de <i>Synechocystis</i> .....	75
3.2.3.2. Efecto de la puromicina sobre la RNasa P de <i>Synechocystis</i> .....	77
<b>3.2.4. Interacción RNA(enzima)-RNA(sustrato) en la RNasa P de cianobacterias.....</b>	<b>79</b>
3.2.4.1. Estudio de la preferencia de sustrato de la RNasa P de <i>Synechocystis</i> en condiciones de recambio simple.....	80
3.2.4.2. Caracterización del mutante PJ15/16 del RNA P de <i>Synechocystis</i> .....	82
3.2.4.2.1. Mutagénesis dirigida del RNA P de <i>Synechocystis</i> .....	83
3.2.4.2.2. Actividad del RNA PJ15/16 en condiciones de recambio simple.....	84





3.2.4.2.3. Procesamiento por la RNasa P reconstituída con la subunidad RNA PJ15/16 .....	85
3.2.4.3. Determinación de la $K_m$ y $V_{max}$ de los RNAs P de <i>E. coli</i> , <i>Synechocystis</i> y del RNA PJ15/16. ....	87
3.2.4.4. Interacción RNA-RNA analiza mediante retardo en gel.....	88
3.2.4.5. Interacción RNA-RNA analizada mediante interacción en filtro .....	88
<b>3.2.5. Reconstitución de la actividad RNasa P con subunidades de diferentes organismos.....</b>	<b>89</b>
3.2.5.1. Actividad RNasa P sobre pre-tRNAs .....	90
3.2.5.2. Actividad RNasa P sobre el precursor del RNA 4.5S de <i>E. coli</i> .....	90
3.2.5.3. Inmunoprecipitación de RNasa P conteniendo diferentes subunidades proteicas .....	91
3.2.5.3. Interacción RNA P-Proteína P analizada mediante retardo en gel .....	92
<b>3.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD RNasa P DEL CIANELO DE <i>C. paradoxa</i> .</b>	<b>94</b>
3.3.1. Actividad RNasa P en extractos crudos de cianelo de <i>C. paradoxa</i> .....	94
3.3.2. Mutagénesis del RNA P de <i>C. paradoxa</i> .....	95
3.3.3. Reconstitución de la actividad RNasa P entre subunidades de <i>Synechocystis</i> y del cianelo de <i>C. paradoxa</i> .....	96
3.3.4. Identificación de una proteína de <i>C. paradoxa</i> con alta afinidad por el RNA P de <i>C. paradoxa</i> mediante la técnica de Northwestern.....	98
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>101</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>111</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>114</b>
<b>7. APÉNDICES.....</b>	<b>135</b>
<b>7.1. APÉNDICE 1. ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE LOS RNAs P UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.....</b>	<b>135</b>

**7.2. APÉNDICE 2. ESTRUCTURA SECUNDARIAS DE LOS SUSTRATOS  
DE LA RNasa P UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO ..... 141**

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Reacción catalizada por la RNasa P..... 3

Figura 2. Estructura secundaria e interacciones terciarias en el RNA P de *E. coli* .... 7

Figura 3. Esquema de la reacción catalizada por la RNasa P..... 13

Figura 4. Esquema de producción de un RNA por transcripción *in vitro* ..... 46

Figura 5. Hibridación de DNA total de *Pseudanabaena* con una sonda de *A. nidulans* que contiene el gen *rnpB* de *A. nidulans*..... 57

Figura 6. Hibridación de DNA plasmídico con una sonda de *A. nidulans* que contiene el gen *rnpB* ..... 58

Figura 7. Mapa de restricción del inserto de pAP100..... 58

Figura 8. Secuencia de DNA del gen *rnpB* de *Pseudanabaena* ..... 59

Figura 9. Estructura secundaria del RNA P de *Pseudanabaena*..... 60

Figura 10. Hibridación en condiciones estrictas de DNA de *Synechocystis* con una sonda procedente del inserto de pAP200 ..... 61

Figura 11. Mapeo de pAP200 mediante complementación de *E. coli* NHY322..... 62

Figura 12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los genes *rpmH* y *rnpA* de *Synechocystis* ..... 64

Figura 13. Determinación del punto de inicio de la transcripción del gen *rnpA* ..... 65

Figura 14. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas P de bacterias ..... 66

Figura 15. Alineamiento de perfiles de hidrofobicidad ..... 66

Figura 16. Estrategia de clonación del gen *rnpA* de *Synechocystis* en el vector pAR3040 ..... 69

Figura 17. Inducción de la proteína P de *Synechocystis* en células BL21(DE3) portadoras del plásmido PARA2..... 70

Figura 18. Perfil de elución de la cromatografía en gel de Sephadex G-50 ..... 71

Figura 19. Perfil de elución de la cromatografía en gel de afinidad por histidinas... 72

Figura 20. Purificación de la proteína P de <i>Synechocystis</i> .....	72
Figura 21. Titulación de la proteína P purificada.....	73
Figura 22. Análisis de la proteína P por Western blot.....	74
Figura 23. Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad RNasa P del RNA P de <i>Synechocystis</i> .....	76
Figura 24. Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad RNasa P de la holoenzima de <i>Synechocystis</i> .....	77
Figura 25. Efecto de la concentración de MgCl <sub>2</sub> sobre la actividad RNasa P de la holoenzima de <i>Synechocystis</i> .....	78
Figura 26. Efecto de la puomicina en el procesamiento de pre-tRNA por el RNA P de <i>Synechocystis</i> .....	78
Figura 27. Esquema de la interacción entre el RNA P y el extremo CCA-3' del pre-tRNA en <i>E. coli</i> .....	79
Figura 28. Esquema de la reacción llevada a cabo por la RNasa P.....	80
Figura 29. Procesamiento de pre-tRNA <sup>Gln</sup> con (+) y sin (-) la secuencia CCA-3' por diversos RNAs P en condiciones de recambio simple.....	81
Figura 30. Procesamiento de pre-tRNA <sup>Glu</sup> con (+) y sin (-) la secuencia CCA-3' por diversos RNAs P en condiciones de recambio simple.....	82
Figura 31. Cinéticas de procesamiento por la RNasa P de sustratos con (+) y sin (-) la secuencia CCA-3' en su extremo.....	83
Figura 32. Secuencia de nucleótidos del gen <i>rnpB</i> de <i>Synechocystis</i> silvestre y del mutante PJ15/16 .....	84
Figura 33. Procesamiento de pre-tRNA <sup>Gln</sup> con (+) y sin (-) la secuencia CCA-3' por el RNA PJ15/16 en condiciones de recambio simple.. .....	85
Figura 34. Procesamiento por la holoenzima conteniendo el RNA PJ15/16.....	86
Figura 35. Análisis de la afinidad RNA P-pre-tRNA mediante ensayo de retardo en gel .....	88
Figura 36. Análisis de la afinidad RNA P-pre-tRNA mediante ensayo de interacción en filtro .....	89
Figura 37. Actividad RNasa P con diferentes combinaciones de subunidades.....	90

Figura 38. Actividad RNasa P usando el RNA pre-4.5 S como sustrato .....	91
Figura 39. Inmunoprecipitación de la actividad RNasa P .....	92
Figura 40. Estructura secundaria de los RNAs P de <i>Synechocystis</i> y <i>Anabaena</i> , y de los mutantes de estos RNAs P en la hélice P12 (Vioque, 1997) .....	93
Figura 41. Análisis de la interacción RNA P-Proteína P mediante ensayo de retardo en gel .....	94
Figura 42. Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad RNasa P del cianelo de <i>C. paradoxa</i> .....	95
Figura 43. Modelos de estructura secundaria de los RNAs P de <i>E. coli</i> y del cianelo de <i>C. paradoxa</i> .....	96
Figura 44. Actividad de la enzima reconstituida a partir de la proteína P de <i>Synechocystis</i> y el RNA P del cianelo de <i>Cyanophora paradoxa</i> .....	97
Figura 45. Northwestern utilizando como sonda RNA P del cianelo de <i>C. paradoxa</i> .....	98

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1. Ejemplos de diversos tipos de RNAsas P ..... 4**

**Tabla 2. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo..... 24**

**Tabla 3. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo ..... 33**

**Tabla 4. Plásmidos construidos en este trabajo..... 34**

**Tabla 5. Oligonucleótidos no comerciales utilizados en este trabajo..... 40**

**Tabla 6. Moldes utilizados para la obtención de diferentes RNAs ..... 45**

**Tabla 7. Parámetros cinéticos determinados bajo condiciones de recambio múltiple ..... 87**



## ABREVIATURAS

Ap <sup>r</sup>	Resistencia a ampicilina
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
bisacrilamida	N, N'-bis-metilén-acrilamida
CCA-3'	Secuencia 5'-CCA-3' del extremo 3' de los tRNAs
Chl	Clorofila
Ci	Curio
Cm <sup>r</sup>	Resistencia a cloranfenicol
cpm	Cuentas por minuto
dATP	Deoxiadenosina-5'-trifostato
dCTP	Deoxicitidina-5'- trifosfato
DEPC	Diethylpirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Deoxinucleótido-5'-trifosfato
DTT	Ditiotreitrol
Exo III	Exonucleasa III
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
kb	Miles de pares de bases
kDa	kiloDalton
Km <sup>r</sup>	Resistencia a kanamicina
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani
ORF	Fase de lectura abierta
p/v	Relación peso/volumen
pb	Par de bases
PCC	Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
pre-tRNA <sup>Tyr</sup>	precursor de tRNA de tirosina
pre-tRNA <sup>Gln</sup>	precursor de tRNA de glutamina
pre-tRNA <sup>Glu</sup>	precursor de tRNA de glutámico

pre-tRNA <sup>Gly</sup>	precursor de tRNA de glicina
pre-tRNA <sub>±</sub> CCA	precursor de tRNA con o sin la secuencia CCA-3'
Proteína P	Subunidad proteica de la RNasa P
RNA	Acido ribonucleico
RNA P	Subunidad RNA de la RNasa P
RNasa	Ribonucleasa
SDS	Laurilsulfato sódico
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metiletilendiamina
Tet <sup>r</sup>	Resistencia a tetraciclina
Tm	Temperatura media
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
tRNA	RNA transferente
U.V.	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen

**Bases nitrogenadas**

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo

**Aminoácidos**

A	Ala	alanina	L	Leu	leucina
R	Arg	arginina	K	Lys	lisina
N	Asn	asparragina	M	Met	metionina
D	Asp	ácido aspártico	F	Phe	fenilalanina
C	Cys	cisteína	P	Pro	prolina
E	Glu	ácido glutámico	S	Ser	serina
Q	Gln	glutamina	T	Thr	treonina



*Abreviaturas*

---

<b>G</b>	<b>Gly</b>	<b>glicina</b>	<b>W</b>	<b>Trp</b>	<b>triptófano</b>
<b>H</b>	<b>His</b>	<b>histidina</b>	<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	<b>tirosina</b>
<b>I</b>	<b>Ile</b>	<b>isoleucina</b>	<b>V</b>	<b>Val</b>	<b>valina</b>

## **TAMPONES**

### Tampón de transcripción

Tris-HCl 40 mM, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 24 mM; espermidina 2 mM; Tritón X-100 0,01 % (v/v); DTT 10 mM; BSA 0,05 µg/µl; NTP 5 mM; inhibidor de RNasas (RNasin, Promega) 0,1 U/µl y polimerasa de RNA del fago T7 (0,4 U/µl).

### TBE

Tris-borato 45 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0.

### Tampón de carga de DNA

Azul de bromofenol (BFB) 0,25 % (p/v), xileno-cianol (XC) 0,25 % (p/v) y glicerol 30 % (v/v).

### Tampón de carga de RNA

EDTA 0,1 M; BFB-XC 0,4 % y urea 10,5 M.

### Tampón de carga de proteínas

Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8; glicerol 40 %; SDS 8 %; 2-mercaptoetanol 20 % (v/v) y BFB 0,05 % (p/v).

### JAS

Tris-HCl 50 mM; NH<sub>4</sub>Cl 60 mM; Acetato de magnesio 10 mM y 2-mercaptoetanol 0,2 % (v/v); pH 7,5.

### JAS\*

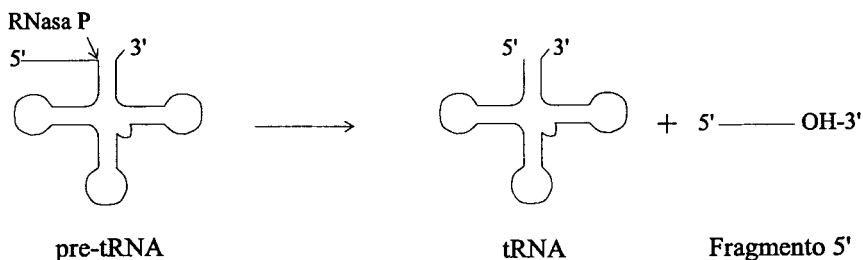
Tris-HCl 50 mM; NH<sub>4</sub>Cl 1 M; Acetato de magnesio 10 mM y 2-mercaptoetanol 0,2 % (v/v); pH 7,5.

## **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. LA RIBONUCLEASA P (RNasa P)

Los tRNAs, a pesar de su tamaño relativamente pequeño, están sujetos a complejas modificaciones posttranscripcionales durante su biosíntesis (Deutscher, 1984 y Söll y RajBhandary, 1995). Casi cada tipo de tRNA se transcribe como un precursor, con extensiones tanto en su extremo 5' como en su extremo 3'. Los genes codificantes de los tRNAs también contienen intrones con frecuencia. Estos elementos extraños deben ser excindidos de manera precisa para producir tRNAs funcionales. La maduración de los tRNAs incluye, a menudo, la adición de la secuencia CCA en el extremo 3', que es requerida para aminoacilar los tRNAs (algunos genes de tRNAs bacterianos, como los de *Escherichia coli*, codifican la secuencia CCA-3'). Finalmente, los transcritos de tRNA sufren un gran número de modificaciones en sus bases. Todo en conjunto hacen a los tRNAs la clase de RNAs con un mayor grado de modificación. Así, la síntesis de los tRNAs maduros requiere la interacción de un complejo grupo de enzimas. Esta tesis está enfocada al estudio de una de las enzimas implicadas en la ruta de maduración de los pre-tRNAs, la ribonucleasa P (RNasa P), que forma el extremo 5' maduro del tRNA (figura 1). La característica que define a la RNasa P (RNasa P; E.C. 3.1.26.5) es la hidrólisis en un sitio específico de los precursores de tRNAs.



**Figura 1. Reacción catalizada por la RNasa P.**

La rotura es endonucleolítica y, en todos los casos examinados, los productos de la maduración del pre-tRNA retienen los grupos 3'-OH y 5'-P. La actividad RNasa P

requiere iones metálicos divalentes (preferiblemente  $Mg^{2+}$ ), que poseen probablemente dos papeles, uno estructural y otro funcional en la catálisis (Yarus, 1993 y Smith, 1995).

La actividad RNasa P ha sido identificada, y en varios casos purificada, en organismos de los tres dominios (Archea, Bacteria y Eucaria), estando presente también en mitocondrias y cloroplastos. Análisis genéticos de la RNasa P han demostrado que la actividad es esencial para las células (Schedl y Primakoff, 1973; Sakano *et al.*, 1974; Lee *et al.*, 1991 y Cherabil *et al.*, 1987).

### 1.1.1. Composición de la RNasa P

La RNasa P es una holoenzima compleja, compuesta de un RNA esencial (RNA P) y una o varias proteínas (proteína P). A pesar de existir características comunes entre todas las RNasas P, existe una alta variación a lo largo de los diferentes grupos filogenéticos. En el caso de la RNasa P bacteriana, el RNA P es activo catalíticamente en ausencia de la proteína P; por tanto, es una ribozima o una RNA-enzima (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). La catálisis por el RNA P no ha sido demostrada en RNAs P no bacterianos, a pesar de que este RNA es esencial para la actividad RNasa P (tabla 1).

**Tabla 1. Ejemplos de diversos tipos de RNasas P**

Organismo	Sensibilidad a nucleasa micrococcal	Proteínas P	RNAs P	Ribozima activo	Referencias
<b>Bacteria</b>					
<i>Escherichia coli</i>	+	14 kDa ( <i>rnpA</i> )	377 nt ( <i>rnpB</i> )	+	1
<i>Bacillus subtilis</i>	+	14 kDa	401 nt	+	1
<b>Archaea</b>					
<i>Sulfolobus acidocalcaricus</i>	-	+	315 nt	-	2
<i>Haloferax volcanii</i>	+	+	435 nt	-	3
<b>Eucariotas</b>					
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	+	100 kDa	285 nt	-	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	100, 32,9, 32, 22, 19,6, 18, 16,4, 15,8 y 15,5 kDa	369 nt	-	5
<i>Xenopus laevis</i>	+	+	320 nt	-	6
<i>Homo sapiens</i>	+	115, 38 y 30 kDa	340 nt	-	7
<i>Rattus rattus</i>	-	+	+	-	8
<i>Dictyostelium discoideum</i>	+	+	+	-	9
<b>Mitocondria</b>					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	105 kDa	490 nt	-	10

<i>Homo sapiens</i> (HeLa)	+	+	+	-	11
<b>Cloroplasto</b>					
<i>Cyanophora paradoxa</i>	+	+	351 nt	-	12
Espinaca	-	+	?	n.a.	13

n.a. no aplicable. Los nombres de los genes, excepto para *E. coli*, se han omitido para mayor claridad. (1) Guerrier-Takada *et al.*, 1983; (2) LaGrandeur *et al.*, 1993; (3) Nieuwlandt *et al.*, 1991; (4) Krupp *et al.*, 1986; (5) Lee *et al.*, 1991; (6) Doria *et al.*, 1991; (7) Bartkiewicz *et al.*, 1989; (8) Jayanthi y Van, 1992; (9) Stathopoulos *et al.*, 1995; (10) Miller y Martin, 1983; (11) Doerson *et al.*, 1985; (12) Shevelev *et al.*, 1995; (13) Wang *et al.*, 1988.

La RNasa P de arqueobacterias y eucariotas tiene una proporción mayor de proteína, en comparación con la enzima bacteriana, lo que hace suponer que la proteína(s) P de estas holoenzimas han asumido funciones más complejas. Visto así, la RNasa P bacteriana podría parecer completamente diferente a otras RNasas P e incluso se ha discutido si todas las RNasas P poseen un ancestro común. Estudios recientes, a través del análisis comparativo de secuencias de RNAs P, han mostrado que todos poseen un cuerpo estructural similar (Chen y Pace, 1997), que es además el equivalente al cuerpo estructural bacteriano, donde reside la capacidad de catálisis. Todo indica que, a pesar de la no actividad de los RNAs P no bacterianos en ausencia de proteína, la reacción enzimática está basada en el RNA P en estos sistemas.

La proteína P, en contraste, presenta una gran divergencia evolutiva, siendo actualmente poco lo que conocemos sobre la proteína(s) P de eucariotas y orgánulos.

### 1.1.2. Estructura del RNA P

Mucha información sobre la estructura del RNA P ha venido desde el análisis de las secuencias de diferentes organismos. Los genes que codifican el RNA P han sido identificados por dos vías, el escrutinio genético de factores que afectaban al procesamiento de pre-tRNAs (Sakano *et al.*, 1974; Miller y Martin, 1983 y Sakamoto *et al.*, 1983) y la hibridación de DNA genómico con RNAs extraídos de preparaciones purificadas de RNasa P (LaGrandeur *et al.*, 1993; Bartkiewicz *et al.*, 1989; Reich *et al.*, 1986; Reed *et al.*, 1982; Krupp *et al.*, 1986.; Lee y Engelke, 1989, Eder *et al.*, 1996 y Doria *et al.*, 1991). Una vez obtenidas secuencias, otros RNAs P pueden ser aislados desde organismos cercanos, mediante hibridación de DNA en condiciones poco estrictas (Brown *et al.*, 1991, Vioque, 1992 y Tranguch y Engelke, 1993), búsqueda en la base de datos (Bult *et al.*, 1996; Shareck *et al.*, 1995 y Lang *et al.*, 1997) o amplificación por PCR

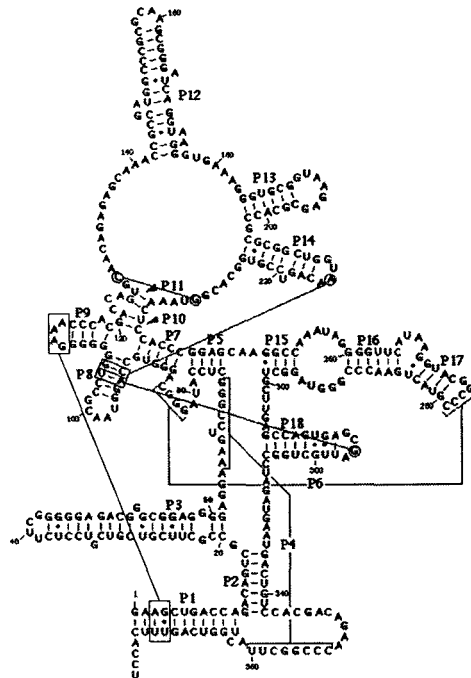
(Brown *et al.*, 1996; Altman *et al.*, 1993 y Vioque, 1997). De este modo se han obtenido secuencias de RNAs P de organismos y orgánulos que representan una buena parte del árbol evolutivo. Todas estas secuencias están compiladas en la base de datos de la RNasa P, mantenida por J. Brown (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/home.html>; Brown, 1998). Actualmente se conocen más de 190 RNAs P, de bacterias, de los dos grupos principales de arqueobacterias, de levaduras y de diferentes representantes de los vertebrados. Todas las mitocondrias analizadas hasta la fecha poseen una subunidad esencial de RNA en sus RNAsas P, sin embargo sólo se conoce la secuencia de unos pocos, principalmente de mitocondrias de hongos. EL RNA P de la mitocondria del protozoo *Reclinomonas americana* es muy similar al de bacterias (Long *et al.*, 1997). Sólo un RNA P ha sido identificado en un orgánulo fotosintético: el cianobacteria de *Cyanophora paradoxa* (Shevelev *et al.*, 1995 y Baum *et al.*, 1996) aunque existe una secuencia en el genoma del cloroplasto de *Porphyra purpurea* que ha sido identificada como posible codificante de un RNA P (Reith y Munholland, 1995). Ningún RNA P ha sido aislado desde cloroplastos de plantas superiores e intrigantemente, parece que su RNasa P es puramente proteica (Wang *et al.*, 1988 y Gegenheimer, 1996).

La determinación de la estructura secundaria del RNA P ha sido resuelta, básicamente, por una aproximación filogenética, que parece ser la aproximación más válida a la determinación de las estructuras de RNAs grandes (Woese y Pace, 1993). En este método, la estructura se infiere mediante el estudio de la covariación, o cambios concertados, entre las secuencias de nucleótidos de RNAs homólogos. En el caso más claro, pares de bases dentro de una hélice potencial deberían estar mantenidos a pesar de que existan variaciones en la secuencia primaria de los RNAs. Como regla, se considera demostrada una estructura cuando se documentan dos ejemplos, al menos, de covariación en esa estructura.

En bacterias se conoce bien la estructura secundaria del RNA P (Brown *et al.*, 1996), como ejemplo se muestran las estructuras de los RNAs P de *E. coli* y *B. subtilis* (apéndice 1), dos RNAs P diferentes que permiten apreciar que a pesar de la variación en algunas estructuras, existe un cuerpo central del RNA, que representa aproximadamente la mitad de la longitud total de un RNA P típico (Siegel *et al.*, 1996).

Los RNAs P de arqueobacterias son muy parecidos al bacteriano. El parecido se extiende al nivel de la secuencia y existen varias estructuras conservadas (por ejemplo, J3/4, J2/4, J18/2 y J5/15) entre los dos grupos filogenéticos. Debido a este gran parecido se consideran a los RNAs P de estos grupos como homólogos. Sin embargo, a pesar del parecido, no ha sido demostrado que el RNA P de arqueobacterias posea actividad catalítica en ausencia de proteínas.

Los RNAs P eucariotas poseen una mayor variabilidad en secuencia y en estructura, siendo difícil alinear y comparar secuencias incluso entre grupos relacionados. Se ha podido, sin embargo, obtener un modelo de estructura secundaria de estos RNAs e identificar dominios conservados con el consenso bacteriano (P2, P3, P4 y P10/11).



**Figura 2. Estructura seundaria e interacciones terciarias en el RNA P de *E. coli*.**

En resumen, existen 21 nucleótidos conservados entre todas las RNAs P, localizándose 11 de ellos en una región adyacente a la hélice P4. Es predecible, a partir de estos datos, que esta zona posea los nucleótidos implicados en la catálisis. Mutagénesis de estos



nucleótidos han apoyado los datos obtenidos del estudio de secuencias (Frank *et al.*, 1996 y Hardt y Hartmann, 1996).

Actualmente no existen estudios por difracción de rayos X o resonancia magnética nuclear de los RNAs P. Se han identificado posibles interacciones terciarias mediante estudios de covariación, como los contactos entre los “tetraloops” de las hélices P14 y P18 y pares de bases de la hélice P8 (figura 2) (Brown *et al.*, 1996). Por la misma aproximación se han sugerido otras interacciones terciarias, entre P1 y el lazo de la hélice P9 (Massire *et al.*, 1997), entre los nucleótidos 122 y 236 de la hélice P11 (Tallsjö *et al.*, 1993) y, en el RNA P de bacterias Gram-positivas, una interacción entre la hélice P10 y el “tetraloop” del lazo L12 (Tanner y Cech, 1995).

Se han propuesto dos modelos de estructura terciaria del RNA P de *E. coli* (Chen *et al.*, 1998 y Massire *et al.*, 1998) con la suma de los datos obtenidos por análisis de secuencias, mutagénesis de nucleótidos, interferencia a la modificación química, “cross-linking” y modelado molecular.

### 1.1.3. Diversidad estructural de la RNasa P

A pesar de la poca abundancia de la RNasa P en las células, la enzima ha sido purificada al menos parcialmente en un gran número de organismos y orgánulos. Las características bioquímicas de una parte de estas holoenzimas están reflejadas en la tabla 1. Los resultados de ensayos básicos, como gradientes de densidad y resistencia a la digestión por nucleasa micrococcal, han revelado que la RNasa P varía mucho en su composición de unos organismos a otros. Debido a que el RNA no varía apreciablemente en tamaño de un organismo a otro, la proteína(s) P debe ser la fuente de diversidad en la composición de la enzima.

#### 1.1.3.1. La RNasa P bacteriana

En general, las RNasas P bacterianas tienen una densidad de aproximadamente 1,7 g/ml en CsCl, lo que indica que la subunidad RNA aporta gran parte de la masa de la enzima (Stark *et al.*, 1978 y Gardiner y Pace 1980). Las proteínas P de bacterias son pequeñas (14 kDa) en comparación con el RNA P (>100 kDa). El gen que codifica la proteína P de *E. coli*, *rnpA*, fue identificado mediante un escrutinio de factores envueltos

en procesamiento de pre-tRNA (Schedl y Primakoff, 1973) y fue clonado y secuenciado (Hansen *et al.*, 1985). Se han identificado genes homólogos de varios organismos (Ogasawara *et al.*, 1985; Brown y Pace, 1992 y Vioque y Kirsebom, 1996). Así el gen *rnpA* de *Streptomyces* se identificó mediante complementación de una estirpe termosensible de *E. coli*, debido a una mutación en el gen *rnpA* (Morse y Schmidt, 1992). En otros casos la identificación del gen *rnpA* se ha producido de forma fortuita, debido a que, normalmente, se encuentra situado en las cercanías del gen *dnaA* (Calcutt y Schmidt, 1992; Fujita *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 1985; Lai y Bumann, 1992; Miyata *et al.*, 1993; Skovgaard, 1990; Suhan *et al.*, 1994 y Ogasawara y Yoshikawa, 1992). También se han identificado genes *rnpA* a partir de los genomioms secuenciados de algunos organismos (Fleischmann *et al.*, 1995 y Fraser *et al.*, 1995).

La proteína P es requerida para la actividad tanto *in vivo* como *in vitro* bajo condiciones fisiológicas, pero su función se puede sustituir por alta fuerza iónica (por ejemplo, 1 M de KCl); de este modo, la proteína no es esencial para la catálisis (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Guerrier-Takada *et al.*, 1984 y Gardiner *et al.*, 1985).

Debido a que la proteína P se puede sustituir por alta fuerza iónica, se ha postulado que una de las funciones de la proteína P, que es muy básica, es apantallar las repulsiones electrostáticas que surgen en la interacción entre la ribozima y el sustrato (polianiones) (Reich, *et al.*, 1988).

Por otro lado, la proteína P parece tener un papel en el reconocimiento de algunos sustratos, haciendo a la RNasa P más versátil en este aspecto. Este incremento en la versatilidad del reconocimiento de sustrato ha sido mostrada por una aproximación completamente diferente, la evolución *in vitro* de sustratos (Liu y Altman, 1994). La selección de sustratos de la RNasa P desde secuencias aleatorias en ausencia de la proteína P resultó en sustratos del tipo pre-tRNAs, mientras que en presencia de la proteína P se seleccionaron sustratos de tipo pre-tRNA y RNA 4.5S (ver apéndice 2).

Otra función asignada a la proteína P ha sido facilitar la liberación del producto, el paso limitante de la reacción RNasa P (Tallsjö y Kirsebom, 1993).

Dentro de la secuencia de la proteína P se encuentra una zona altamente conservada, denominada motivo RNRLKR, además de diferentes aminoácidos básicos e hidrofóbicos, que han sido implicados en la unión al RNA P y la estabilización de la estructura de la

proteína P. A pesar de la baja conservación en secuencia, la estructura secundaria prevista es similar para todas ellas (Gopalan *et al.*, 1997).

Recientemente se ha determinado la estructura tridimensional de la proteína P de *B. subtilis* (Stams *et al.*, 1998). La estructura presenta una topología  $\alpha\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha$  y tres regiones de unión a RNA son evidentes, dos de las cuales son consistentes con los datos previos de mutagénesis y bioquímicos. La primera zona de unión al RNA posee un rasgo topológico inusual, una unión girada a la izquierda entre  $\beta_3$ - $\alpha_B$ - $\beta_4$ . La secuencia consenso de la proteína P de bacterias, RNRLKR, está contenida dentro de esta  $\alpha$  hélice y del lazo de unión. El resto de las proteínas P conocidas hasta la fecha pueden plegarse teóricamente de manera similar de acuerdo con programas de predicción de estructura secundaria.

#### 1.1.3.2. La RNasa P de arqueobacterias

Se han aislado RNasas P de dos especies de arqueobacterias, *Sulfolobus acidocaldarius* y *Haloferax volcanii*. Las características bioquímicas de las dos RNasas P son muy diferentes. La holoenzima de *S. acidocaldarius* parece estructuralmente más compleja por sus características bioquímicas y se cree que es la más cercana al ancestro de las RNasas P eucariotas.

#### 1.1.3.3. La RNasa P eucariótica

Se han purificado parcialmente RNasas P de levaduras y vertebrados. La densidad en  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  es de 1,28-1,4 g/ml, menor de la densidad de la enzima de bacterias pero intermedia entre las densidades de proteína y RNA. Estos datos sugieren una ribonucleoproteína en la cual la proteína contribuye más a la masa de lo que lo hacía en la enzima de bacterias.

Actualmente se conoce la composición (a partir de fracciones parcialmente purificadas) de la RNasa P de *Schizosaccharomyces pombe* (Zimmerly *et al.*, 1993), *Saccharomyces cerevisiae* (Chamberlain *et al.*, 1998) y algunos de los componentes de la RNasa P humana (Eder *et al.*, 1997). Sin embargo, la actividad no se ha reconstituido *in vitro* con las diferentes subunidades hasta este momento.

#### 1.1.3.4. La RNasa P de mitocondrias

La RNasa P de mitocondrias mejor caracterizada hasta la fecha es la de *S. cerevisiae*. La holoenzima de la mitocondria de este organismo posee una densidad en Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 1,28 g/ml, pero posee un componente RNA como se ha demostrado por análisis genético (Miller y Martin, 1983 y Martin y Underbrink-Lyon, 1981) y sensibilidad a ribonucleasa (tabla 1; Hollingsworth y Martin, 1986). Se ha identificado una proteína de 105 kDa codificada por un gen nuclear, que no presenta homología con la proteína P de bacterias o con las proteínas identificadas en la RNasa P de levaduras (Morales *et al.*, 1992).

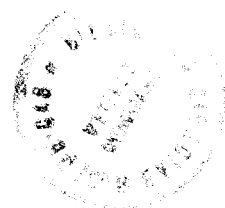
#### 1.1.3.5 La RNasa P de cloroplastos

Se han analizado los cloroplastos de espinaca determinándose la densidad de una fracción RNasa P parcialmente purificada en CsCl, siendo de 1,28 mg/ml. Detallados análisis de la actividad la han demostrado insensible a nucleasa micrococcal (Wang *et al.*, 1988). Ambos resultados sugieren la ausencia de un componente RNA en la enzima. Además, la enzima se ha purificado extensivamente sin poderse detectar la presencia de algún RNA.

Se ha localizado, sin embargo, la presencia de un RNA P en el cloroplasto (cianelo) de *Cyanophora paradoxa* (Shevelev *et al.*, 1995 y Baum *et al.*, 1996), que copurifica con la RNasa P del orgánulo. Este organismo parece haber obtenido su cianelo hace relativamente poco tiempo, debido a que posee características cercanas a las cianobacterias (conserva en su pared una capa de péptidoglicanos), aunque ha cedido al núcleo más del 90 % de sus genes (Löffelhardt *et al.*, 1997).

El RNA P posee una estructura similar al RNA P de bacterias con algunas variaciones, debido al alto contenido en A y T del genomio del cianelo y a la ausencia de algunas de las interacciones terciarias descritas para el RNA P de bacterias. Este RNA P no lleva a cabo la reacción enzimática en ausencia de proteínas en las condiciones probadas hasta la fecha. No se conoce nada sobre la proteína(s) que puedan estar implicadas en la actividad.

Existe también una secuencia en el genomio del cloroplasto del alga roja *Porphyra purpurea* que ha sido identificada como posible codificante de un RNA P (Reith y Munholland, 1996).



#### 1.1.3.6. La RNasa P de cianobacterias

Los únicos datos sobre la RNasa P de cianobacterias al comienzo de este trabajo eran varias secuencias de RNAs P (Banta *et al.*, 1992 y Vioque, 1992). Durante el desarrollo de esta tesis se han obtenido más secuencias de RNAs P de cianobacterias (Vioque, 1997; Hess, *et al.*, 1998 y Fingerhut y Schön, 1998). Todo en conjunto ha permitido establecer las diferencias existentes entre este RNA P y el de *E. coli* y otras bacterias. Así, el lazo J15/16 no presenta, salvo excepciones, la secuencia 5'-GGU-3' muy conservada en bacterias y funcionalmente muy importante para la interacción con el sustrato. La ausencia de la secuencia 5'-GGU-3' se da también en los RNAs P de los cloroplastos de *C. paradoxa* y *P. purpurea*. Además, todas las estirpes formadoras de heterocistos presentan repeticiones de secuencias con repeticiones cortas en tandem (STRR) insertas en la hélice P12 (Vioque, 1997).

A la fecha de inicio de esta tesis no se conocía nada sobre el componente proteico o la holoenzima completa de este grupo de bacterias.

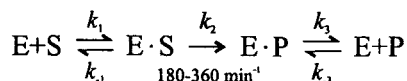
#### 1.1.4. Reacción de la RNasa P

##### 1.1.4.1. Estudios cinéticos y termodinámicos de la reacción RNasa P

El mecanismo catalítico de la RNasa P sólo se ha estudiado con cierto detalle en el sistema bacteriano.

La reacción catalizada por la RNasa P bacteriana consiste básicamente en tres pasos: unión del pre-tRNA a la enzima, rotura de un enlace fosfodiéster y disociación de los dos productos (tRNA maduro y fragmento 5'). La reacción se esquematiza en la figura 3.

Las constantes de los diversos pasos de la reacción han sido medidas para la enzima de *E. coli*, *B. subtilis* y *T. thermophilus* con una combinación de análisis en condiciones de recambio simple y múltiple (Smith *et al.*, 1992; Smith y Pace, 1993; Beebe y Fierke, 1994; Hardt *et al.*, 1995 y Tallsjö y Kirsebom, 1993). En condiciones de estado estacionario y en presencia de exceso de sustrato, la  $k_{cat}$  es determinada por la tasa de liberación del producto ( $k_3$ ) (Beebe y Fierke, 1994; Reich *et al.*, 1988 y Tallsjö y Kirsebom, 1993). La tasa de hidrólisis de sustrato debe ser medida en condiciones de



**Figura 3. Esquema de la reacción catalizada por la RNasa P.** Los valores de  $k_2$  hacen referencia a los calculados para *E. coli* (Smith y Pace, 1993) y *B. subtilis* (Beebe y Fierke, 1994), respectivamente.

recambio simple ( $[E] \gg [S]$ ). Bajo estas condiciones, la maduración del sustrato ocurre con una tasa constante de primer orden ( $k_2$ ), en el rango de 180-360  $\text{min}^{-1}$  para la enzima de *E. coli* (Smith y Pace, 1993) y *B. subtilis* (Beebe y Fierke, 1994), respectivamente. En comparación, la  $k_{\text{cat}}$  del estado estacionario es aproximadamente 100 veces más lenta, siendo por tanto la liberación del producto el paso limitante de la reacción. Finalmente, las tasas de asociación de sustratos y enzima son un orden de magnitud más lenta que las esperadas por simple difusión, sugiriendo que existen barreras conformacionales que deben ser superadas durante el paso de unión de la reacción.

La afinidad del RNA P por tRNA ha sido medida por diferentes técnicas, obteniéndose una  $k_d$  para el RNA P de *B. subtilis* de 3 nM. La secuencia 5' posee una afinidad dos órdenes de magnitud menor por el RNA P, por lo que se disocia rápidamente de la enzima tras la catálisis (Beebe y Fierke, 1994). La enzima y el sustrato se unen de manera no cooperativa con una estequiometría de 1:1 (Beebe y Fierke, 1994; Hardt *et al.*, 1995 y Hardt *et al.*, 1993).

#### 1.1.4.2. Papel de los metales divalentes

A pesar de que la RNasa P requiere iones metálicos divalentes (preferiblemente  $\text{Mg}^{2+}$ ) para la catálisis, los pre-tRNAs pueden unirse al RNA P en ausencia de iones metálicos (Smith *et al.*, 1993). Se ha demostrado que la estructura del RNA P alrededor del punto de maduración del pre-tRNA es igual en presencia y ausencia de estos iones divalentes (Smith *et al.*, 1993). A pesar de que el  $\text{Mg}^{2+}$  no es necesario para la unión del sustrato, el plegamiento del RNA P de *B. subtilis* es dependiente de forma cooperativa de la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  y al menos tres iones  $\text{Mg}^{2+}$  contribuyen a este plegamiento (Pan, 1995 y Zarrinkar *et al.*, 1996).

El requerimiento de estos iones para la catálisis es absoluto. La enzima de *E. coli* posee un coeficiente de Hill = 3,2 (Smith y Pace, 1992 y Warnecke *et al.*, 1996). El  $Mg^{2+}$  puede ser sustituido por  $Mn^{2+}$  con sólo una leve bajada en la eficiencia catalítica, mientras que la sustitución por  $Ca^{2+}$  provoca un descenso de  $10^4$  veces en la  $k_2$  (Smith y Pace, 1993). No se conocen otros iones que puedan estimular la actividad de la enzima.

El alto grado de especificidad de la RNasa P por los iones metálicos sugiere que el complejo ribozima-sustrato forma un bolsillo de unión a iones metálicos que constituye una parte del sitio activo de la enzima.

#### 1.1.4.3. Reconocimiento de sustrato

Todos los tRNAs de una célula o un orgánulo en particular son procesados por la misma RNasa P, que debe ser capaz de reconocer las características comunes a todos los tipos de pre-tRNAs. Los estudios realizados hasta el momento indican que la estructura terciaria del tRNA maduro contiene los determinantes para el reconocimiento por la RNasa P. Diversas evidencias indican que la secuencia 5' de los pre-tRNAs no influye en el proceso de reconocimiento. Primero, la comparación de secuencias no muestra ninguna estructura o elemento de secuencia común a todos los extremos 5' de todos los pre-tRNAs (Chang y Carbon, 1975; Guthrie, 1975; Engelke *et al.*, 1985; Goodman *et al.*, 1977; y Mao *et al.*, 1980). Segundo, sustratos con extremos 5' artificiales, algunos con sólo un nucleótido, son procesados eficientemente (Smith y Pace, 1993; Kline *et al.*, 1981 y Surratt *et al.*, 1990). Finalmente, el tRNA maduro es un fuerte inhibidor competitivo de la reacción catalizada por el RNA P (la  $K_i$  del tRNA maduro es similar a la  $K_m$  del pre-tRNA), lo que indica que la secuencia 5' no contribuye sustancialmente a la energía de enlace del sustrato (Smith *et al.*, 1992; Beebe y Fierke, 1994 y Reich *et al.*, 1988). Así, el tRNA maduro debe poseer todos los determinantes que son reconocidos por el RNA P.

Estudios con sustratos más pequeños han demostrado que una mini-hélice consistente en los brazos T y aceptor (incluyendo la secuencia 5') es madurada por la RNasa P, con una  $K_m$  100 veces mayor que el sustrato completo (McClain *et al.*, 1987; Schlegel *et al.*, 1994 y Hardt *et al.*, 1993). La pérdida de la energía de enlace podría ser debida a la ausencia de los brazos D y anticodón o a la pérdida de estructura del lazo T, que está normalmente fijada en el espacio por interacciones con el lazo D. Experimentos

posteriores han determinado que la RNasa P ocupa una parte del sustrato que cubre parte de los brazos aceptores y T (Perreault y Altman, 1992; Kahle *et al.*, 1990 y Thurlow *et al.*, 1991).

Aparte de la estructura formada por los brazos T y aceptor, la secuencia CCA-3' encontrada en todos los tRNAs es un rasgo reconocido por las RNasas P bacterianas analizadas (Oh y Pace, 1994; Hardt *et al.*, 1995; Surratt *et al.*, 1990; McClain *et al.*, 1987; Seidman y McClain, 1975; Schmidt *et al.*, 1976; Guerrier-Takada *et al.*, 1984; Green y Vold, 1988 y Kirsebom y Svard, 1994). Estirpes de *E. coli* deficientes en la nucleotidil transferasa, la enzima requerida para la adición de la secuencia CCA-3' (estirpes *cca*) acumulan pre-tRNAs inmaduros en su 5', sugiriendo que la RNasa P requiere el CCA-3' para su actividad óptima *in vivo* (Seidman y McClain, 1975). *In vitro*, una secuencia CCA-3' intacta mejora la eficiencia en la maduración del extremo 5' por la RNasa P bacteriana, pero no es absolutamente requerida para la actividad. En la reacción catalizada por el RNA P en ausencia de proteína, la estructura CCA-3' modifica tanto la unión del sustrato (efectos en la  $K_m$ ) (Oh y Pace, 1994; Hardt *et al.*, 1995 y Thurlow *et al.*, 1991) como la catálisis (efectos en la  $k_2$ ).

Diferentes experimentos han localizado la zona de unión del CCA-3' en el lazo que une las hélices P15 y P16 (J15/16) del RNA P (Oh y Pace, 1994; Thurlow *et al.*, 1991 y Easterwood y Harvey, 1997). La proteína P atenúa fuertemente *in vivo* los efectos negativos observados *in vitro* de la delección en el extremo CCA-3' sobre la actividad RNasa P (Oh y Pace, 1994 y Guerrier-Takada *et al.*, 1984).

## 1.2. LAS CIANOBACTERIAS

### 1.2.1. Características generales

Las cianobacterias constituyen un grupo de procariotas cuya característica más destacable es la capacidad para desarrollar fotosíntesis oxigénica similar a la de plantas y algas. Aunque en general contienen sólo clorofila *a* (Stanier y Cohen-Bazire, 1977) en algunos casos presentan también clorofila *b* (proclorofitas).

Las cianobacterias son un grupo antiguo y extraordinariamente diverso en morfología, metabolismo y hábitat. Los primeros fósiles atribuidos a cianobacterias datan del



Precámbrico, existiendo además datos geoquímicos que permiten postular un papel esencial de estos microorganismos en el paso de la atmósfera terrestre desde un estado reductor primitivo al actual estado oxidante (Hayes, 1983; Schopf *et al.*, 1983; Walter, 1987). Aparecen en casi todos los ecosistemas examinados y esta amplia distribución refleja una gran variedad de especies con diversas propiedades morfológicas y fisiológicas. Su diversidad genética queda reflejada en el contenido de pares de bases guanina-citosina (G+C) cuyo porcentaje cubre todo el rango de valores encontrados para procariotas, mientras que el tamaño del genomio de las formas más complejas sobrepasa al de cualquier otro grupo de bacterias (Herdman *et al.* 1979). Muchas especies cianobacterianas son poliploides presentando entre 10 y 15 copias del genomio haploide por célula (Herdman *et al.*, 1979; Labarre *et al.*, 1989) y casi todas poseen también plásmidos, cuyo papel fisiológico así como la mayoría de funciones que codifican se desconocen (Tandeau de Marsac y Houmard, 1987).

Las cianobacterias presentan una pared celular típica de bacterias Gram negativas (Woese, 1987) y constituyen un filo de eubacterias situado en la radiación de las mismas cerca de bacterias gram positivas y bacterias purpúreas (Woese, 1987; Schleifer y Ludwig, 1989). Desde el punto de vista evolutivo las cianobacterias se consideran, casi con total certeza, descendientes del linaje procariótico primitivo que dio lugar a los cloroplastos (Bonen y Doolittle, 1975; Giovannoni *et al.*, 1988; Douglas y Turner, 1991) apoyando así la teoría endosimbionte (Gray, 1989).

En cuanto a taxonomía interna, en un principio se clasificaron atendiendo a caracteres morfológicos fundamentalmente reconociéndose dos grandes grupos: cianobacterias unicelulares y cianobacterias filamentosas (Rippka *et al.*, 1979). Dentro del grupo de cianobacterias unicelulares se encuentran la sección I, de reproducción por división binaria o gemación y la sección II, de reproducción por fisión múltiple. El grupo de cianobacterias filamentosas engloba a la sección III, no formadoras de heterocistos (células especializadas en la fijación de dinitrógeno); la sección IV, formadoras de heterocistos sin ramificaciones verdaderas y la sección V, formadoras de heterocistos y con ramificaciones verdaderas. De esta clasificación sólo las secciones II, IV y V son grupos coherentes desde el punto de vista filogenético como se ha podido determinar con el análisis de secuencias de RNA ribosómico 16S (Giovannoni *et al.*, 1988). En la

actualidad, la taxonomía de las cianobacterias se encuentra en plena evolución y se está apoyando en estudios de marcadores quimiotaxonómicos (ácidos grasos, carotenoides, etc.) y en análisis de macromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) que puedan reflejar mejor las relaciones evolutivas existentes entre las distintas especies cianobacterianas (Wilmotte, 1994).

El aparato fotosintético de las cianobacterias se localiza en un sistema de membranas denominadas tilacoidales y se organiza de manera similar al del cloroplasto. Así, está estructurado en dos fotosistemas (PSI y PSII) conectados por una cadena de transportadores de electrones que los conducen desde el H<sub>2</sub>O como donador primario hasta el aceptor terminal que es la ferredoxina (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Algunas estirpes de cianobacterias pueden utilizar también H<sub>2</sub>S como donador de electrones, desarrollando en este caso fotosíntesis anoxigénica (Schmidt, 1988). En cuanto a la composición de pigmentos fotosintéticos las cianobacterias además de clorofila *a*, poseen ficobilinas como pigmentos antena (Sherman *et al.*, 1987) que también aparecen en algas rojas (Wolfe *et al.*, 1994) y carotenoides, los cuales se localizan en los complejos antena, en los centros de reacción de los fotosistemas (Goodwin, 1980; Britton, 1993) y también en la membrana externa (Hirschberg y Chamovitz, 1994).

En su gran mayoría las cianobacterias son autótrofas estrictas, sin embargo existen estirpes capaces de crecer heterotróficamente utilizando compuestos orgánicos reducidos como fuente de carbono y energía, bien en oscuridad (quimioheterotrofia), bien en presencia de luz (fotoheterotrofia) y, por último, hay cianobacterias que pueden crecer mixotróficamente, esto es, utilizando azúcares y realizando fotosíntesis de manera simultánea (Rippka *et al.* 1979).

La fijación de CO<sub>2</sub>, al igual que en plantas, se lleva a cabo a través del ciclo reductivo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Dentro del metabolismo del carbono presentan la peculiaridad de poseer un ciclo de Krebs incompleto carente de las enzimas 2-oxoglutarato deshidrogenasa y succinil-CoA reductasa (Pearce *et al.*, 1969), de manera que funciona como ruta biosintética y limita el número de sustratos orgánicos utilizables por estos procariontes (Stanier y Cohen-Bazire, 1977; Smith, 1982). La degradación de azúcares se lleva a cabo a través de una ruta alternativa que es la ruta

oxidativa de las pentosas fosfato (Smith, 1982). Como fuente de nitrógeno las cianobacterias generalmente usan nitrato, nitrito y amonio (Guerrero y Lara, 1987), aunque algunas especies pueden utilizar también urea y determinados aminoácidos (Flores y Herrero, 1994; Montesinos *et al.*, 1995) o bien pueden fijar dinitrógeno en condiciones de aerobiosis (Stewart, 1980). En este último caso, para proteger al complejo de la nitrogenasa de la inactivación irreversible por O<sub>2</sub> algunas especies filamentosas han separado espacialmente los procesos de fotosíntesis y fijación de N<sub>2</sub>. Así, este último se realiza en unas células diferenciadas especiales denominadas heterocistos que se desarrollan en condiciones en que el nitrógeno combinado es limitante (Wolk, 1982). En los casos de cianobacterias fijadoras de N<sub>2</sub> que no diferencian heterocistos, parece que la estrategia más común de protección de la nitrogenasa es la separación temporal entre la fotosíntesis y la fijación de N<sub>2</sub> además de un incremento en el metabolismo respiratorio para crear un ambiente microaeróbico (Fay, 1992).

Muchas cianobacterias unicelulares son transformables de manera natural e incorporan el DNA exógeno a su genomio de manera estable por recombinación homóloga (Porter, 1986). La transformación unida al desarrollo de otras técnicas de transferencia genética como la conjugación (Wolk *et al.*, 1984; Flores y Wolk, 1985) o la electroporación (Thiel y Poo, 1989), han hecho de las cianobacterias organismos ideales para el estudio de la fotosíntesis desde el punto de vista molecular.

### **1.2.2. *Synechocystis* sp. PCC 6803**

*Synechocystis* sp. PCC 6803 es una cianobacteria unicelular, poliploide, móvil y no fijadora de dinitrógeno, que pertenece a la sección I de la clasificación de Rippka *et al.* (1979). Inicialmente descrita como fotoheterótrofa (Rippka, 1972), posteriormente se ha visto que puede crecer en presencia de glucosa sin iluminación continua siendo suficiente un pulso de luz blanca cada 24 horas (Anderson y McIntosh, 1991). A esta forma de crecimiento se le ha llamado "crecimiento heterotrófico activado por luz" y parece ser independiente de la actividad de cualquiera de los dos fotosistemas (Anderson y McIntosh, 1991).

*Synechocystis* sp. PCC 6803 es competente de manera natural (Grigorieva y Shestakov, 1982) y puede ser transformada con DNA exógeno. La transformación en ésta al igual que en otras cianobacterias, es dependiente de la concentración de DNA exógeno presentando una cinética que se satura con una concentración de DNA de 50 mg/ml (Grigorieva y Shestakov, 1982; Porter, 1986). *Synechocystis* sp. PCC 6803 posee un sistema de recombinación homóloga que permite la sustitución de genes por copias mutadas y, además, posee varios plásmidos residentes que han permitido el desarrollo de distintos sistemas de transferencia de material genético. Utilizando secuencias de estos plásmidos se han construido vectores de clonación que permiten la integración de DNA exógeno por recombinación entre el vector y el plásmido residente (Chauvat *et al.*, 1986), vectores autorreplicativos (Chauvat *et al.*, 1988), vectores para el estudio de promotores (Ferino y Chauvat, 1989) y plásmidos conjugativos entre *Synechocystis* y *Synechococcus* (Marraccini *et al.*, 1993).

Las características de crecimiento de *Synechocystis* sp. PCC 6803 han posibilitado la obtención de mutantes deficientes en fotosíntesis, facilitando el estudio de este proceso. Así, la capacidad de crecimiento fotoheterótrofo ha permitido obtener mutantes afectados en el PSII (Vermaas *et al.*, 1986; Jansson *et al.*, 1987; Debus *et al.*, 1988a; Debus *et al.*, 1988b; Vermaas *et al.*, 1988; Williams, 1988; Chauvat *et al.*, 1989), fotosistema no requerido para este tipo de crecimiento (Rippka, 1972). También se han obtenido mutantes que afectan a la actividad del PSI y a la de ambos fotosistemas simultáneamente que son viables en condiciones de crecimiento heterotrófico activado por luz (Smart *et al.*, 1991; Smart y McIntosh, 1993; Smart *et al.*, 1994).

El genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 ha sido recientemente secuenciado en su totalidad (Kaneko *et al.*, 1996) facilitando así la clonación de nuevos genes que puedan ser de interés en el estudio de esta cianobacteria a nivel molecular.

### **1.1.3. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO**

El primer objetivo de este trabajo ha sido obtener los genes y purificar los componentes de la RNasa P de alguna cianobacteria, de manera que pudieramos disponer de un sistema de estudio de la RNasa P cianobacteriana con las dos subunidades y los sustratos procedentes del mismo organismo.

El segundo objetivo ha sido el análisis bioquímico de la RNasa P de *Synechocystis* sp. PCC 6803, centrándonos especialmente en las peculiaridades que presenta en cuanto al reconocimiento de su sustrato.

Como objetivo final nos planteamos estudiar la RNasa P de algún orgánulo fotosintético, para lo que se seleccionó el cianelo de *Cyanophora paradoxa*, debido a que era ya conocida la subunidad RNA P (Shevelev *et al.*, 1995 y Baum *et al.*, 1996) y a que el cianelo se considera una forma primitiva de cloroplasto, más próxima evolutivamente a la cianobacteria endosimbionte original que otros cloroplastos (Löffelhardt *et al.*, 1997). Nos planteamos estudiar las características estructurales que hacen no catalítico el RNA P de este organismo y qué tipo de proteínas componen su RNasa P.

Algunos de los resultados que aquí se presentan han sido publicados o están en vías de publicación:

**Pascual, A. y Vioque, A.** (1994) Sequence and structure of the RNA subunit of RNase P from the cyanobacterium *Pseudanabaena* sp. PCC 6903. *Biochem. biophys. Acta*, **1218**, 463-465.

**Pascual, A. y Vioque, A.** (1996) Cloning, purification and characterization of the protein subunit of ribonuclease P from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* **241**, 17-24.

**Pascual, A. y Vioque, A.** Functional reconstitution of RNasa P activity from a plastid RNA subunit and a bacterial protein subunit. Enviado a *FEBS Lett.*

**Pascual, A. y Vioque, A.** Enzyme-substrate interactions in the cyanobacterial RNase P are perturbed by 3'-RCCA in substrate. Enviado a *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*

## **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 utilizadas*

Las cianobacterias utilizadas en este trabajo han sido *Synechocystis* sp. PCC 6803, perteneciente a la sección I de la clasificación taxonómica definida por Rippka (Rippka *et al.*, 1979) y *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, incluida en la sección III de la misma clasificación.

##### 2.1.1.2. *Cultivos de cianobacterias en medio líquido*

Para el cultivo en medio líquido de cianobacterias se utilizó el medio BG11 descrito por Rippka *et al.* (1979). El medio se compone de: NaHCO<sub>3</sub> 12 mM; NaNO<sub>3</sub> 17,6 mM; MgSO<sub>4</sub> 0,3 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,24 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 mM; ácido cítrico 28,5 μM; citrato férrico amónico (17 % Fe) 6 mg/ml; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 16 μM; ZnSO<sub>4</sub> 0,8 μM; CuSO<sub>4</sub> 0,3 μM y CoCl<sub>2</sub> 0,2 μM.

El medio se preparó concentrado 100 veces, conteniendo todos los componentes excepto el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, el NaHCO<sub>3</sub> y el NaNO<sub>3</sub> que se añadieron antes de la esterilización en el autoclave.

Para los cultivos en medio líquido que se utilizaron como preinóculos y para las extracciones de DNA, se usaron matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con volúmenes de entre 25 y 100 ml de medio e inoculados con biomasa procedente de cultivos en medio sólido. Posteriormente fueron incubados en agitadores orbitales termostatzados a 30 °C, con iluminación continua de luz blanca e intensidad luminosa entre 25 y 30 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> y agitación constante de 100 rpm en incubadores orbitales Gallenkamp (Gran Bretaña).

##### 2.1.1.3. *Cultivos de cianobacterias en medio sólido*

Para el cultivo en medio sólido se utilizó el medio BG11 descrito en el apartado anterior con la adición de Bacto-agar (Difco, EE.UU.) al 1 % (p/v). El agar se esterilizó

por separado del resto del medio y se mezcló con el mismo antes de verterlo en las placas de Petri. Las placas se incubaron en una cámara termostatzada a 30 °C bajo iluminación continua de luz blanca e intensidad luminosa de entre 25 y 30  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

## 2.1.2. *Escherichia coli*

### 2.1.2.1. Estirpes de *E. coli* utilizadas

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y sus características más destacables se enumeran en la tabla 2.

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

Estirpe	Características relevantes	Referencias
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (mK <sup>+</sup> ,rK <sup>-</sup> ), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( <i>f80d-lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> )	Hanahan, 1983
BMH71-18	<i>thi</i> , <i>supE</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>mutS</i> ::Tn10, F <sup>'</sup> [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> ]	"U.S.E. mutagenesis Kit", Pharmacia-Amersham-Biotech
XL-1Blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>endA11</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> <sup>-</sup> , F <sup>'</sup> [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> , Tn10( <i>tet</i> <sup>r</sup> )]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
BL21(DE3)	<i>hsdS gal</i> ( $\lambda$ <i>CIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7</i> , gene 1)	Studier y Moffatt, 1986
NYH322	$\Delta$ ( <i>proBlac</i> ), <i>ara</i> , <i>gyrA</i> , <i>thi</i> , <i>zic-501</i> ::Tn10, <i>rnpA49</i>	Kirsebom <i>et al.</i> , 1988
MC1061	<i>hsdR</i> , <i>mcrB</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>araABC</i> , <i>leu7679</i> ), $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>thi</i>	Meissner <i>et al.</i> , 1987

### 2.1.2.2. Medios y condiciones de cultivo

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

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

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.



El medio  $\phi$ -broth (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
MgSO <sub>4</sub>	16 mM
KCl	10 mM

El medio se esterilizó en autoclave como se ha descrito anteriormente.

El medio mínimo (M9), usado en los experimentos de inducción de proteínas, fue el siguiente:

Concentrado 5x:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	64 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g/l
NaCl	2,5 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	5 g/l

Medio completo:

Concentrado 5x	200 ml/l
CaCl <sub>2</sub> 1M	0,1 ml/l
MgSO <sub>4</sub> 1M	1 ml/l
Glucosa 20 %	10 ml/l
Vitamina B1 (1 mg/ml)	1 ml/l

El concentrado 5x, el CaCl<sub>2</sub> y el MgSO<sub>4</sub> se esterilizaron separadamente en el autoclave y se mezclaron una vez fríos. La glucosa y la vitamina B1 se esterilizaron por filtración. El medio en forma sólida se preparó añadiendo agar 1,5 % (p/v).

Los antibióticos, esterilizados por filtración, se añadían en caso necesario a una concentración de:

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

Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en tubos o matraces Erlenmeyer de volumen quíntuple al del cultivo, a 37 °C y con agitación orbital continua a 200 rpm en aparatos New Brunswick Scientific (EE.UU.) modelo G25. Los cultivos sólidos se realizaron en cajas de Petri que se incubaron a 37 °C ó, cuando el experimento lo requiera, a 42 °C.

### **2.1.3. Método de recogida de células**

Para la recogida de células los cultivos se centrifugaron a 7.000 g, durante 10 min en centrífugas refrigeradas Sorvall (EE.UU.) modelo RC5-C, equipadas con rotores GSA, SS-34 y SE-12. Las centrifugaciones de volumen inferior a 1,5 ml se realizaron en una centrífuga Eppendorf (Alemania) modelo 5415C a 10.000 g, durante 10 min. La recogida de células para las determinaciones específicas se detallará en cada caso.

## **2.2. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS**

### **2.2.1. Inducción de proteínas recombinantes en *E. coli***

Se utilizó un sistema inducible por IPTG en la cepa BL21 (DE3), conteniendo en plásmido el alelo super-represor *lacI<sup>q</sup>*, para evitar los problemas derivados de la expresión basal del sistema. Esta cepa fue transformada con el plásmido apropiado y la mezcla de transformación se inoculó en medio mínimo M9. El cultivo se incubó hasta alcanzar una absorbancia a 550 nm de 0,5 momento en el cual se adicionó el inductor a una concentración final de 2 mM. Tras tres horas más de incubación a 37 °C los cultivos se recogieron por centrifugación. El volumen de cultivo varió entre los 50 ml usados para la obtención de las condiciones óptimas de inducción y los 2 L empleados para purificar las proteínas. La presencia de una proteína inducida se comprobó mediante electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida de una parte del cultivo.

### **2.2.2. Preparación de extractos celulares**

Los extractos crudos de cianobacterias o de *E. coli* se obtuvieron siguiendo dos procedimientos, según la cantidad de extracto requerido así como el volumen de cultivo utilizado para obtenerlo. Extractos crudos del cianelo del alga eucariota *Cyanophora paradoxa* fueron obtenidos desde cultivos congelados, cedidos amablemente por el laboratorio del profesor W. Löffelhardt, Universidad de Viena.

#### **2.2.2.1. Rotura con perlas de vidrio**

En caso de requerir pequeñas cantidades, los extractos celulares se prepararon mediante rotura con perlas de vidrio. Para ello, un volumen de 1 ó 2 ml de cultivo se

centrifugó en tubos Eppendorf resuspendiendo el precipitado de células en un volumen adecuado de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, conteniendo  $MgCl_2$  0,2 M. A esta suspensión se añadió una cantidad equivalente a 50  $\mu$ l de perlas de vidrio (0,25-0,30 mm de diámetro, Sigma, EE.UU.) por cada 100  $\mu$ l de tampón.

Esta suspensión celular se sometió a dos períodos de 15 s de agitación vigorosa en agitador automático, alternados con periodos de 30 s en hielo. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 min a 12.000 g y 4 °C, constituyendo el sobrenadante el extracto crudo libre de células.

#### 2.2.2.2. Rotura con alúmina

Las células se recogieron según el apartado 2.1.3. y se congelaron a -20 °C. El precipitado se separó del tubo en una sola pieza con una espátula y se depositó en un mortero enfriado previamente a -20 °C. Se añadió el doble del peso del precipitado de alúmina (Sigma). Se desmenuzó con la maza hasta apreciar un cambio en la viscosidad de las células. El extracto se recogió con el tampón apropiado para cada experimento y se centrifugó en rotor SS34 a 30.000 g durante 45 min, constituyendo el sobrenadante el extracto libre de células. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo y la centrifugación se realizó a 4 °C.

#### 2.2.2.3. Preparación de extracto del cianelo de *Cyanophora paradoxa*

El proceso estándar consistió en la rotura de la célula con un tratamiento con Tritón X-100 al 1% en TE. Este tratamiento no afecta a la integridad del cianelo. Tras dos lavados con el mismo tampón se rompió el cianelo con perlas de vidrio como se ha descrito excepto que el tampón usado para la rotura fue Tris-HCl 50 mM, pH8,0;  $MgCl_2$  10 mM; KCl 20 mM; EDTA 2 mM; PMSF 0,2 mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM.

#### 2.2.3. Obtención del lavado ribosómico

La proteína recombinante se sobreexpresó en la cepa de *E. coli* BL-21(DE3) según se describe en el apartado 2.2.1. Las células se recogieron según el apartado 2.1.3. El

precipitado celular se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se procedió a la rotura de las células con alúmina (2.2.2.2.).

El extracto fue resuspendido en 5 ml de tampón JAS (Tris-HCl 50 mM;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  60 mM;  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  10 mM y 2-mercaptoetanol 0,2 % (v/v); pH 7,5). Para evitar la proteólisis se adicionó PMSF a una concentración final de 20  $\mu\text{M}$ , preparado inmediatamente antes de ser usado en 2-propanol. Se añadió DNasa I (libre de RNasas) suministrada por Boehringer Mannheim (Alemania) a una concentración final de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubó durante 30 min con agitación ocasional. El extracto se centrifugó a 8.000 rpm en tubos Corex de 15 ml en un rotor SS34 durante 10 min, a temperatura constante de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para eliminar la alúmina. El sobrenadante obtenido se centrifugó en el mismo rotor a 15.500 rpm (30.000 g) durante 45 min para eliminar restos celulares. El sobrenadante de la última centrifugación constituyó el extracto libre de células denominado S30.

El extracto S30 se centrifugó durante 2 horas a 100.000 g en un rotor SW60 para obtener los ribosomas y las enzimas asociadas. El precipitado se resuspendió usando una varilla de vidrio siliconizada en 1 ml de JAS conteniendo  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 M (JAS\*) y se incubó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas en agitación leve. Transcurrido este tiempo se centrifugó de nuevo a 100.000 g durante 2 horas en un rotor SW60. Se descartó el precipitado, constituyendo el sobrenadante el lavado ribosómico (S100).

## **2.2.4. Técnicas cromatográficas**

### *2.2.4.1. Filtración en gel*

Se utilizó una columna de vidrio Bio-Rad (EE.UU), modelo Econo-Column Standard, conteniendo un lecho de 1,5 x 50 cm de G-50 Fine (Pharmacia-Biotech, Suecia). La columna se equilibró con cinco volúmenes de tampón JAS\*. La muestra, 1 ml, se aplicó directamente con una pipeta sobre el lecho. Una vez introducida la muestra, la cromatografía se realizó con el mismo tampón a un flujo aproximado de 22 ml/h, proporcionado por una bomba peristáltica LKB 10.200 (Pharmacia-Biotech) conectada a la salida de la columna. Se recogieron fracciones de 0,5 ml con un colector Pharmacia-Biotech modelo Frac-100.

#### 2.2.4.2. *Cromatografía en gel de afinidad por histidinas*

La técnica se realizó en una columna Bio-Rad, modelo Econo-Column Standard, de 0,7 cm de diámetro y 4 cm de altura. La resina His-Bind de Novagen (EE.UU.) se lavó con dos volúmenes de H<sub>2</sub>O, cinco volúmenes de NiSO<sub>4</sub> 50 mM y se equilibró con cinco volúmenes de tampón JAS\*. Tras la aplicación de la muestra, la columna se lavó con diez volúmenes de JAS\*, diez volúmenes de JAS\* conteniendo 7 M de urea y se eluyó la muestra con dos volúmenes de JAS\*-7 M urea conteniendo 300 mM de imidazol. El flujo fue de 39 ml/h y la recogida de fracciones se realizó como en el apartado anterior.

### 2.2.5. **Electroforesis de proteínas**

#### 2.2.5.1. *Electroforesis analíticas en geles de SDS-poliacramida*

Las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970), usando geles al 12 % de acrilamida; se utilizó un aparato Mini-Protean II de Bio-Rad y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los geles contenían acrilamida a una concentración del 12 % (acrilamida 29,2 %, % bis-acrilamida 0,8), Tris-HCl 375 mM, pH 8,8 y SDS 0,01 % (p/v). Los gases disueltos se eliminaron mediante vacío y posteriormente se añadieron TEMED 0,1 % (v/v) y APS 0,1 % (p/v) para desencadenar la polimerización, que se realizó a temperatura ambiente entre dos placas de vidrio de 10,2 x 7,3 cm y 10,2 x 8,3 cm dispuestas paralelamente dejando un espacio de 0,75 mm entre ellas y montadas según las instrucciones del fabricante. El espacio delimitado por las placas se llenó hasta aproximadamente 5 cm del extremo inferior, cubriéndose el menisco con una capa (1-2 cm de altura) de gel de empaquetamiento que contenía poliacrilamida 6 %, Tris-HCl 375 mM, pH 6,8 y SDS 0,01 % (p/v). Inmediatamente antes de la polimerización se introdujo en la parte superior del gel un peine de teflón de 0,75 mm de grosor, de diez dientes de 5 mm de ancho, 13 mm de altura, separados entre sí 3 mm para formar los pocillos. El peine se retiró una vez que el gel había polimerizado, lavándose los pocillos con abundante agua destilada.

Las muestras se mezclaron con medio volumen de una solución de tampón de carga de proteínas, tras lo que se calentaron a 100 °C durante 5 min. La electroforesis se desarrolló

a temperatura ambiente. El voltaje aplicado fue de 200 V que se mantuvo hasta que el colorante alcanzó la parte inferior de la placa. El tampón de electroforesis usado fue Tris 25 mM; Glicina 192 mM, pH 8,3 y SDS 0,1 % (p/v).

Como patrones se utilizaron las siguientes proteínas, suministradas por Bio-Rad, fosforilasa B de músculo de conejo (97,4 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa), ovoalbúmina de gallina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31,0 kDa), inhibidor de tripsinógeno de semilla de soja (21,5 kDa) y lisozima de huevo de gallina (14,4 kDa). Para la determinación de las masas moleculares, se representaba en ordenadas el logaritmo decimal de los valores de masa molecular de las proteínas patrones y en abscisas la movilidad electroforética relativa de cada una respecto al frente de electroforesis.

#### *2.2.5.2. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida*

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se localizaron tiñéndolas mediante inmersión de los geles en una solución de azul de Coomassie R-250 (Sigma) 0,1 % (p/v), ácido acético 10 % (v/v) y metanol 40 % (v/v). Tras una hora de tinción a temperatura ambiente, los geles se lavaron repetidas veces con una solución de ácido acético 10 % (v/v) y metanol 40 % (v/v). Las proteínas se visualizaron como bandas de color azul en el gel de poliacrilamida. Los geles una vez teñidos se conservaron en ácido acético 7 % (v/v).

#### *2.2.5.3. Precipitación de proteína con TCA*

La precipitación de pequeños volúmenes de proteína para su análisis en SDS-PAGE se realizaba en tubos Eppendorf añadiendo 1/10 de volumen de una solución de TCA 100 % (p/v) en agua destilada. La mezcla se agitaba vigorosamente y se incubaba 10 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugaba a 12.000 rpm durante 15 min. El precipitado se lavaba y centrifugaba sucesivamente con 0,7 ml de etanol:éter dietílico (1:1, v/v) y etanol:éter dietílico (1:3, v/v) a -20 °C. El precipitado resultante se dejaba secar y era resuspendido para su uso en el tampón deseado.

## 2.2.6. Técnicas inmunológicas

### 2.2.6.1. Obtención de antisuero contra la proteína P de *Synechocystis* en conejo

Se sometieron a electroforesis desnaturalizante, aproximadamente 2 mg de proteína P purificada hasta homogeneidad. La fracción del gel que contenía la proteína se recortó y se pulverizó mediante congelación con nitrógeno líquido y trituración en un mortero. Este polvo se mezcló con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, hasta conseguir una pasta densa que a su vez se mezcló con una cantidad igual en volumen de adyuvante incompleto de Freund. Se homogeneizó la suspensión hasta conseguir una emulsión uniforme y se inyectó, de forma subcutánea, en cuatro puntos del cuerpo de un conejo macho, albino y de raza New Zeland. Transcurridos 21 días de esta primera inyección se realizaron dos nuevas inyecciones subcutáneas con 0,5 mg cada una de proteína purificada y preparada de la misma forma que se ha descrito previamente. A los 10 días de la última inyección de antígeno se realizó la extracción de sangre al conejo. Tras la coagulación y centrifugación de la sangre a 12.000 g, durante 15 min, se obtuvieron 20 ml de suero inmune.

### 2.2.6.2. Purificación de los anticuerpos mediante afinidad a gel de proteína A Sepharosa

El suero, preparado de la manera descrita en el apartado anterior, se purificó mediante FPLC. Se equilibró una columna de 1 ml de proteína A Sepharosa (Sigma) con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,0, a un flujo de 1 ml/min. Se introdujo el suero, se lavó la columna con el mismo tampón y se eluyeron los anticuerpos con citrato sódico 100 mM, pH 3,0, recogiendo fracciones de 0,5 ml en tubos en los que previamente se habían depositado 50  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M, pH 7,5. A la muestra resultante se le repitió el proceso. Los anticuerpos obtenidos mostraban homogeneidad electroforética.

### 2.2.6.3. Detección de proteínas en geles de poliacrilamida mediante Western blot

Muestras sometidas a electroforesis se detectaron mediante inmunorreacción con anticuerpos obtenidos como se describe en el apartado 2.2.6.1. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transferían a membranas de nitrocelulosa Bio-Rad de 0,45

µm de diámetro de poro, en un aparato Mini Trans-blot suministrado por Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante. La transferencia se llevó a cabo a temperatura ambiente durante dos horas a 250 mA de intensidad constante y utilizando como tampón de electrodo una solución de Tris 25 mM; glicina 192 mM, pH 8,3; y metanol al 20% (v/v). El proceso de transferencia se comprobó mediante el empleo de patrones de masa molecular preteñidos en la electroforesis. Seguidamente, la membrana se incubó durante dos horas en una solución bloqueante de leche desnatada en polvo Molico-Sveltesse de Nestlé (España) al 5 % (p/v) y azida sódica al 0,02 % (p/v) en tampón TBS (Tris-HCl 15 mM, pH 7,4 y 0,2 M de NaCl). A continuación se incubó la membrana con el antisuero diluido de forma adecuada en solución de bloqueo durante 15 h a temperatura ambiente y agitación constante. Se sometió la membrana a cuatro lavados de 15 min cada uno en tampón TBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (v/v) y se incubó la misma con una solución de anticuerpos (inmunoglobulina G) de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo, conjugados con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim) diluidos (1:1.000) en solución de lavado durante dos horas a temperatura ambiente y agitación constante. Se repitió el proceso de lavado descrito anteriormente tras lo que se reveló la actividad fosfatasa siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la detección de proteínas en extractos crudos de *Synechocystis* o *Anabaena* se recogieron 50 ml de un cultivo en fase exponencial y se rompieron con alúmina (2.2.2.2.). El extracto crudo resultante se extrajo con metanol para eliminar pigmentos y se cargaron para la electroforesis entre 10 y 30 µg de proteína por carril.

#### **2.2.7. Eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones de proteínas y ácidos nucleicos**

Las sales y moléculas pequeñas se eliminaron de las preparaciones proteicas mediante diálisis, utilizando tubos de celulosa regenerada Sigma de límite de exclusión de 6-8 kDa. Las membranas se lavaron exhaustivamente con agua destilada antes de su uso.

En el caso de las preparaciones de DNA se siguió el método de Orly y Selinger descrito por Penefsky (1977); jeringas de plástico de 2 ml, en cuyo extremo inferior se había colocado un círculo de papel de filtro, se llenaban con Sephadex G-25 o G-50 (Pharmacia-Biotech) hinchado y equilibrado con varios volúmenes del tampón en el que



se quería dejar las muestras. Las jeringas (medidas en tubos de centrífuga) se centrifugaban a 2000 rpm durante 2 min en una centrífuga de mesa Labofuge marca HERAEUS (Alemania) para eliminar el exceso de tampón en el gel. Un volumen de muestra de diez a veinte veces menor que el del lecho se aplicaba sobre la superficie del mismo y se centrifugaba de nuevo a la misma velocidad durante otros 2 min recogiendo en el tubo de centrífuga la muestra ya filtrada, en un volumen similar al original.

Alternativamente, en vez de jeringas se usaron como soporte del gel tubos Eppendorf a los que se les realizó un agujero en el fondo y se les colocó perlas de vidrio en el fondo para evitar que el gel se saliera durante la centrifugación.

Para muestras de RNA se utilizarán columnas de G-50 proporcionadas por Boehringer Mannheim según las instrucciones del fabricante.

## 2.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA *IN VITRO*

### 2.3.1. Plásmidos y genotecas utilizados

En la tabla 3 se relacionan los plásmidos utilizados no construidos en este trabajo, así como sus características más notables. El plásmido pBluescript II SK(+) fue el vector utilizado en las clonaciones estándar, el plásmido pGEM-T (Promega) fue el usado para clonar productos de PCR y el plásmido pUC19 el elegido para expresar RNAs desde el promotor del fago T7.

**Tabla 3. Plásmidos utilizados no construidos en este trabajo**

Plásmido	Características relevantes	Referencias
pBluescriptII SK(+)	Ap <sup>r</sup> , <i>oriF1</i> , <i>colE1</i> , <i>ori</i> , <i>lacZ</i>	Stratagene
pJA2	Contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>E. coli</i> bajo el control del promotor del fago T7 en pUC19	Vioque <i>et al.</i> , 1988
Ani4	Contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Anacystis nidulans</i>	Banta <i>et al.</i> , 1992
pAV1100	Contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Synechocystis</i> en pBS	Vioque, 1992
pARE7	Permite la sobreexpresión de la proteína P de <i>E. coli</i> para su purificación	Vioque <i>et al.</i> , 1988
pT76903	Contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Pseudanabaena</i> en pUC19, bajo control del promotor del fago T7	Tous y Vioque, no publicado.
pT77120	Contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Anabaena</i> bajo el control del promotor del fago T7 en pUC19	Vioque, 1997
pT77120Δ12	Plásmido idéntico al anterior con una delección en la hélice P12 del RNA que codifica	Vioque, 1997

pT76803Δ12	Contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Synechocystis</i> en pUC19 bajo el control del promotor del fago T7, con una delección en la hélice P12	Vioque, 1997
p4.5S	Contiene el gen del precursor del RNA 4.5S de <i>E. coli</i> , en pUC19, bajo control del promotor del fago T7	Peck-Miller y Altman, 1990
pTyrSU3+	Contiene el gen del precursor del tRNA de tirosina de <i>E. coli</i> , en pUC19, bajo control del promotor del fago T7	Vioque <i>et al.</i> , 1988
pUC19	Plásmido que no contiene el promotor del fago T7	Messing, 1983
pIZ227	Plásmido con los genes <i>lysE</i> y <i>lacI<sup>q</sup></i>	Fernando Govantes, no publicado
pGEM-T	Plásmido linearizado con extremos "T" protuberantes	Promega

En la tabla 4 se relacionan los plásmidos construidos en este trabajo.

**Tabla 4. Plásmidos construidos en este trabajo**

Plásmido	Características relevantes
pAP100	Plásmido aislado de una subgenoteca de <i>Pseudanabaena</i> , que contiene el gen codificante de la subunidad RNA de la RNasa P de este organismo
pAP200	Plásmido aislado de una genoteca de <i>Synechocystis</i> . Contiene el gen <i>rnpA</i> de este organismo
pT76803	Plásmido que contiene el gen <i>rnpB</i> de <i>Synechocystis</i> bajo control del promotor del fago T7
pT76803J15/16	Mismo plásmido que el anterior en el que la secuencia 5'-G330G331U332-3' <sup>(1)</sup> se ha sustituido por CCA
pT7CYPAR	Plásmido conteniendo el gen <i>rnpB</i> del cianelo de <i>Cyanophora paradoxa</i> bajo control del promotor del fago T7
pT7CYL14	Mismo plásmido que el anterior donde los nucleótidos U184 y A186 han sido cambiados a G184 y G186 respectivamente <sup>(1)</sup>
pT7GLN	Plásmido conteniendo el gen para el precursor del tRNA <sup>Gln</sup> bajo control del promotor del fago T7
pT7GLU	Plásmido conteniendo el gen para el precursor del tRNA <sup>Glu</sup> bajo control del promotor del fago T7
pARA2	Permite la sobreexpresión de la proteína P de <i>Synechocystis</i> para su purificación

<sup>(1)</sup> Los números hacen referencia a la secuencia de nucleótidos del RNA P que codifica el plásmido.

Las genotecas que se han empleado en este trabajo están construidas en el vector pBluescriptII SK(+), utilizando la estirpe de *E. coli* MC1061. La estirpe MC1061 carece del sistema de restricción *mcr*, capaz de degradar DNA que esté metilado en los residuos de citosina (Raleigh *et al.*, 1988).

## 2.3.2. Aislamiento y análisis de DNA

### 2.3.2.1. Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se empleó un método de lisis por hervido. Originalmente descrito por Holmes y Quigley (1981), consiste en la lisis de las células mediante hervido en presencia de Tritón X-100 y se realizó según Sambrook *et al.* (1989). El aislamiento de DNA plasmídico para experimentos de digestión con exonucleasa III (2.3.3.1.) se llevó a cabo mediante este método seguido de su purificación mediante filtración en columnas de G-50 (apartado 2.2.7.).

### 2.3.2.2. Aislamiento de DNA plasmídico de alta calidad de *E. coli*

Los cultivos de *E. coli* conteniendo el plásmido deseado se recogieron por centrifugación (2.1.3.). Las células se lisaron mediante adición de SDS y NaOH (método de Birnboim y Doly., 1979), se eliminó el DNA cromosómico mediante precipitación con acetato potásico 1,6 M y se recuperó el DNA plasmídico, tras tratamiento con RNasa (1 µg/100 µl, libre de DNasas), mediante precipitación en presencia de PEG 6 % y NaCl 1,5 M. Las muestras se desproteinizaron con fenol, fenol:cloroformo (1:1) y cloroformo y se concentraron mediante precipitación con etanol y acetato sódico.

### 2.3.2.3. Aislamiento de DNA total de cianobacterias

Para el aislamiento de DNA total de cianobacterias se empleó un método descrito por Cai y Wolk (1990), basado en la rotura de las células con perlas de vidrio. Células procedentes de 50 ml de cultivo se recogieron por centrifugación (2.1.3.) y se resuspendieron en 400 µl de tampón T0,1E (Tris-HCl 10 mM y EDTA 0,1 mM, pH 8,0). A la suspensión celular se le añadieron 150 µl de perlas de vidrio estériles (0,25-0,3 mm de diámetro, Sigma), 20 µl de una solución de SDS 10 % y 450 µl de una mezcla fenol:cloroformo 1:1 (v/v). La solución se sometió a continuación a 10 ciclos de 1 min de agitación vigorosa intercalados con ciclos de 1 min de incubación en hielo. El lisado se centrifugó (12.000 x g, 15 min, 4 °C) y se sometió el sobrenadante a varias extracciones con fenol:cloroformo 1:1 (v/v). El DNA se precipitó finalmente con 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, en presencia de acetato sódico a una concentración final de 0,3 M

(pH 5,2). El precipitado se secó al vacío y se resuspendió en un volumen adecuado de tampón T0,1E. Cuando se quiso eliminar el contenido de RNA se realizó un tratamiento con RNasa A de páncreas bovino (Boehringer Mannheim), a una concentración final de 20 µg/ml seguido de extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol.

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.

#### *2.3.2.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa*

Se llevó a cabo según Sambrook et al. (1989), utilizando geles de agarosa al 0,7-2 % (p/v) preparados en tampón TBE que contenía bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml. Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos DNA SUB CELL™ suministrados por Bio-Rad. A cada muestra se añadió 1/10 del volumen de tampón de carga de DNA.

Para determinar el tamaño de los fragmentos sometidos a electroforesis se emplearon como marcadores los fragmentos provenientes de la digestión del fago λ con *HindIII* o con *HindIII* y *EcoRI*. También se utilizaron marcadores proporcionados por Gibco-BRL, que presentan una escalera de 1 kb o bien de 123 pb.

Tras la electroforesis, los geles se sometieron a iluminación con luz ultravioleta de 312 nm, utilizándose para ello un transiluminador LKB (Suecia) modelo Macro Vue y se fotografiaron con un equipo UVP Imagestore GDS-5000 (EE.UU.).

#### *2.3.2.5. Extracción de fragmentos de DNA de geles de agarosa*

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

#### 2.3.2.6. *Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA*

Los fragmentos de DNA que se iban a utilizar como sondas en las hibridaciones se obtenían mediante restricción de los plásmidos adecuados y se purificaban mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción de las bandas correspondientes como se describe en los apartados 2.3.2.4. y 2.3.2.5. Aproximadamente 100 ng de dichos fragmentos se marcaban radiactivamente utilizando 20-30  $\mu\text{Ci}$  de  $5'[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (3.000 mCi/mmol) suministrado por New England Nuclear (Gran Bretaña). Se empleó para ello un equipo de marcaje "DNA labeling kit (-dCTP)" suministrado por Pharmacia-Biotech de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En todos los casos el exceso de nucleótidos no incorporados se eliminaba mediante filtración de las muestras a través de columnas de Sephadex G-50 (apartado 2.2.7.). La calidad del marcaje se estimó cuantificando 1  $\mu\text{l}$  de la muestra obtenida en un contador de centelleo Beckman LS 2800.

#### 2.3.2.7. *Marcaje radioactivo de oligonucleótidos en extremo 5'*

Entre 10 y 50 pmoles de oligonucleótido se marcaron con 50  $\mu\text{Ci}$  de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (>5.000 mCi/mmol) suministrado por Amersham. Para la reacción se utilizó la enzima polinucleótido kinasa del fago T4 (United States Biochemical, EE.UU.). La reacción se realizó en presencia del tampón suministrado por la casa comercial y 3-6 U de la enzima. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y el DNA marcado se separó del nucleótido no incorporado mediante filtración en columnas de G-25 (2.2.7.). La calidad del marcaje se estimó cuantificando 1  $\mu\text{l}$  de la muestra obtenida en un contador de centelleo Beckman LS 2800. En el caso del uso de esta técnica para reacciones de extensión del cebador, los oligonucleótidos marcados se purificaron de un gel de poliacrilamida-urea al 20 %, como se describe en los apartados 2.4.2.3. y 2.4.2.4. para muestras de RNA.

#### 2.3.2.8. *Transferencia de DNA a filtros de nylon*

Una vez realizada la electroforesis de DNA en gel de agarosa, se sumergió el gel durante 15 min con agitación suave en una solución HCl 0,25 N para depurinizar parcialmente el DNA, tras lo cual se lavó con agua destilada y se incubó durante una hora en una solución desnaturalizante de NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M, en agitación suave. Se

procedió a continuación a la transferencia del DNA a filtros de nylon Zeta-Probe suministrados por Bio-Rad 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.

#### *2.3.2.9. 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, éste se sometió al proceso descrito en el apartado anterior para transferirlo a un filtro de nylon.

Los filtros se prehibridaron durante 2-4 horas con una solución compuesta por tampón fosfato potásico 25 mM pH 7, SSC 5x (el tampón SSC 1x contiene NaCl 0,15 M y citrato sódico 15 mM, pH 7,0), Denhardt 5x (Denhardt 1x contiene ficoll 0,2 g/l tipo 400; polivinilpirrolidona 0,2 g/l y seroalbúmina bovina 0,2 g/l), DNA de esperma de salmón 50 µg/ml y SDS 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 65 °C.

Una vez hibridados los filtros, se lavaron con agitación moderada a temperatura ambiente dos veces con SSC 2x, SDS 0,1 % (5 min) y una vez a 65 °C con la misma solución durante 1h. Tras los lavados los filtros se sometieron a autorradiografía a -70 °C con películas Kodak (EE.UU.) modelo X-OMAT S o modelo X-OMAT LS, utilizándose para ello una carcasa de exposición Sigma 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.

#### *2.3.2.10. Detección de secuencias de DNA plasmídico de E. coli mediante hibridación de colonias con sondas radiactivas.*

La hibridación *in situ* del DNA de colonias de *E. coli* se llevó a cabo según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Se realizaron picaduras de las colonias que se deseaban

analizar en filtros de nitrocelulosa circulares (Millipore, EE.UU.) colocados en cajas de Petri conteniendo LB. Una vez incubados a 37 °C durante 12 h, los filtros se transfirieron placas de LB Ampicilina y se incubaron durante 8 h. A continuación se sometieron a un tratamiento de 3 min con una solución de SDS al 10 % colocándolos sobre papel Watman 3MM (Millipore, EE.UU.) embebido en dicha solución. A continuación se realizó un tratamiento de 5 min por el mismo procedimiento con una solución desnaturizante 0,5 N NaOH y 1,5 M NaCl seguido de neutralización de 5 min en 0,5 M Tris/HCl y 1,5 M NaCl y equilibrado en SSC 2x durante 5 min. Los filtros se secaron durante 30 min a temperatura ambiente y se hornearon 1,5 h a 80 °C.

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

#### 2.3.2.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl, conteniendo Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 50 pmol de cada oligonucleótido, 1,5 ng del DNA molde y 2,5 U de Taq DNA polimerasa suministrada por Boehringer. A esta mezcla se le añadió un volumen igual de aceite mineral Sigma para evitar la evaporación. La amplificación se realizó en un aparato Mastercycler 5330 de Eppendorf y consistió en un primer ciclo de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 1 min de desnaturización a 94 °C, 1 min de renaturalización a una temperatura variable, normalmente 2 grados menor que la temperatura media más baja de los dos oligonuceótidos a usar ( $T_m = 69,3 \text{ °C} + 0,41 \times (\text{Porcentaje de GC}) - 650 / \text{número de bases del oligonucleótido}$ ) y 1 min de polimerización a 72 °C. Posteriormente se realizó una incubación final de 7 min a 72 °C. En el caso de utilizar oligonucleótidos con zonas

no homólogas a la región que se deseaba amplificar (como secuencias dianas de enzimas de restricción, promotor del fago T7, etc) se realizaron 10 ciclos a una temperatura de hibridación igual a la T<sub>m</sub> de la zona homóloga y 20 ciclos a una temperatura igual a la T<sub>m</sub> del oligonucleótido completo.

El resultado de la PCR se analizó en gel de agarosa según se describe (2.3.2.4.).

En la tabla 5 se presentan todos los oligonucleótidos utilizados para este trabajo.

**Tabla 5. Oligonucleótidos no comerciales utilizados en este trabajo**

Nombre	Secuencia	Características relevantes
PEI	5'-ACGCATTCTGGCCCGAAACCGG-3'	Secuencia complementaria a una secuencia interna del gen <i>rpmH</i> de <i>Synechocystis</i>
5'GLN	5'-CGACGGGATCCTAAATACGACTCACTATAGGT TAATCAATGGGGTG-3'	Diana de <i>Bam</i> HI, promotor del fago T7 y extremo 5' del gen de <i>Synechocystis trnQ</i> (Mayes <i>et al.</i> , 1993)
3'GLN	5'-GTCCCAAGCTTGGATGGACGCCTGGCTGGGGT GCTAGGATTCG-3'	Secuencia complementaria al extremo 3' del gen <i>trnQ</i> de <i>Synechocystis</i> y secuencias diana de <i>Fok</i> I, <i>Mva</i> I y <i>Hind</i> III
5'GLU	5'-CGACGGGATCCTAAATACGACTCACTATAGTC TGAAATAACGAACG-3'	Diana de <i>Bam</i> HI, promotor del fago T7 y extremo 5' del gen de <i>Synechocystis trnE</i> (Neil y Söll, 1990)
3'GLU	5'-GTCCCAAGCTTGGATGGACGCCTGGTACCCCC AAGGGAA-3'	Secuencia complementaria al extremo 3' del gen <i>trnE</i> de <i>Synechocystis</i> y secuencias diana de <i>Fok</i> I, <i>Mva</i> I y <i>Hind</i> III
5'RP6803	5'-GGAATTCTAATACGACTCACTATAGAGAGTTA GGGAGG-3'	Diana para <i>Eco</i> RI, promotor del fago T7 y secuencia complementaria al extremo 5' del gen <i>mpB</i> de <i>Synechocystis</i> (Vioque, 1992)
3'RP6803	5'-CCCAAGCTTTAAAAAAGAGAGTTAGTC-3'	Secuencia complementaria al extremo 3' del gen <i>mpB</i> de <i>Synechocystis</i> y secuencias dianas de <i>Dra</i> I y <i>Hind</i> III
5'RPCYPAR	5'-CCCGGAATTCTAATACGACTCACTATAGAAAC GAATTTAATTAATG-3'	Diana para <i>Eco</i> RI, promotor del fago T7 y secuencia complementaria al extremo 5' del gen <i>mpB</i> de <i>C. paradoxa</i> (Baum <i>et al.</i> , 1996)
3'RPCYPAR	5'-CCCAAGCTTTAAACGAACCTAATTTTAAGC-3'	Secuencia complementaria al extremo 3' del gen <i>mpB</i> de <i>C. paradoxa</i> y secuencias dianas de <i>Dra</i> I y <i>Hind</i> III
6803CCA3	5'-CCTGCCCATGATTCCAGGAACCGCTTGAGGA ATTTGG-3'	Secuencia de nucleótidos 316-353 del RNA P de <i>Synechocystis</i> , conteniendo los cambios G330 a C330, G331 a C331 y U332 a A332
CYPARL14	5'-GCAAACCAGTTAGATTGCGAAATCTATACTTA GTAAACC-3'	Secuencia de nucleótidos 168-206 del RNA P del cianelo de <i>C. paradoxa</i> , conteniendo los cambios U174 a G174 y A176 a G176
PRT1	5'-AAAAGAGAGTTAGTCGTAAGCC-3'	Secuencia complementaria a los nucleótidos 413-434 del RNA P de <i>Synechocystis</i>

### 2.3.2.12. Generación de mutantes dirigidos

Para la realización de las distintas mutagénesis dirigidas, se utilizó el sistema "U.S.E. Mutagenesis Kit" de Pharmacia-Biotech. Este método se basa en la eliminación de un sitio único de restricción del plásmido usado, según el procedimiento descrito por Deng y



Nickoloff (1992). Para ello, se utiliza un oligonucleótido portando la mutación diseñada, con el fin de introducir ésta en una secuencia conocida del DNA y un segundo oligonucleótido que elimina un único sitio de restricción no esencial en el plásmido, que sirve como base para la selección de los plásmidos mutados. Puesto que ambos oligonucleótidos hibridan con la misma cadena del DNA plasmídico, es posible sintetizar una nueva cadena de DNA conteniendo las dos mutaciones.

Los plásmidos usados en los experimentos de mutagénesis se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3.2.2.

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

Una alícuota de 25 pmoles del oligonucleótido anterior, 25 pmoles del oligonucleótido con la mutación diseñada en cada caso y 0,025 pmoles de plásmido se llevaron hasta un volumen final de 20  $\mu$ l en tampón OPA (Tris-acetato 10 mM; acetato magnésico 10 mM y acetato potásico 50 mM, pH 7,5). Tras incubación 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  $\mu$ l de una solución conteniendo 2,86 mM de cada dNTP; 4,34 mM ATP y 1,43x del tampón OPA, así como 3  $\mu$ l de la mezcla de reacción que incluía DNA ligasa del fago T4 (0,83-1,17 U/ $\mu$ l); DNA polimerasa del fago T4 (0,83-1,67 U/ $\mu$ l) y proteína del gen 32 del fago T4 (0,2-0,28 mg/ml). La mezcla anterior se incubó a 37 °C durante 1 h y se detuvo la reacción calentando a 85 °C durante 15 min.

La preparación anterior se sometió a digestión con la enzima de restricción *ScaI* en un volumen final de 50  $\mu$ l. De esta forma se reduce la capacidad de los plásmidos silvestres (que contienen el sitio *ScaI*) para transformar células de *E. coli*.

Se utilizaron 20  $\mu$ l de la mezcla de plásmidos resultado de la digestión anterior, para transformar alícuotas de 200  $\mu$ l de la estirpe de *E. coli* BMH71-18, que es defectiva en reparación de mutaciones en el DNA y por tanto, no revierte las mutaciones introducidas con los oligonucleótidos usados. Con la mezcla de transformación se inocularon 3 ml de medio LB con ampicilina, a 100  $\mu$ g/ml de concentración final y se incubaron en agitación a 37 °C durante 12-16 h.

Para incrementar la eficiencia en la selección de plásmidos portadores de mutación, los plásmidos, obtenidos por lisis por hervido a partir de la estirpe de *E. coli* BMH71-18, se sometieron a digestión con la enzima de restricción *MluI*. De esta forma, se digirieron aquellos plásmidos que portaban la mutación que hacia aparecer el sitio de restricción *MluI*, mientras que los plásmidos silvestres o los que sólo portaban la mutación en el gen diana permanecían circulares. El resultado de esta digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %, y se extrajo la banda correspondiente a DNA plasmídico linearizado. Posteriormente se recircularizaron los plásmidos aislados del gel de agarosa usando DNA ligasa del fago T4.

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 %. Algunos de los plásmidos que contenían el sitio *MluI*, se usaron para realizar reacciones de secuenciación, con el fin de comprobar la existencia de la mutación diseñada.

#### *2.3.2.13. Manipulaciones enzimáticas del DNA*

Las endonucleasas de restricción, la ligasa, la fosfatasa alcalina, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa o la nucleasa S1 empleados, fueron suministradas por Boehringer Mannheim o Amersham-Pharmacia-Biotech y se utilizaron siguiendo las instrucciones indicadas por los fabricantes.

#### *2.2.1.14. Fraccionamiento de DNA en gradiente de sacarosa para construcción de genotecas*

DNA de *Synechocystis* parcialmente digerido con *HpaII* se centrifugó a 100.000 g durante 21 h a través de un gradiente de sacarosa continuo del 10 al 40 % (Sambrook *et al.*, 1989) y se recogieron 40 fracciones de 0,3 ml. Se estimó el tamaño de los fragmentos de DNA recogidos en cada fracción por electroforesis en un gel de agarosa (2.3.2.4.). Fracciones que contenían fragmentos de DNA de un tamaño comprendido entre 4 y 6 kb

se mezclaron y se precipitaron con etanol. El DNA precipitado se resuspendió en TE y se ligó con el plásmido pBluescript-SK(+) digerido con *Cla*I y desfosforilado. Se obtuvieron clones mediante transformación de la estirpe de *E. coli* MC1061 y selección de colonias en ampicilina. El 80 % de los clones obtenidos resistentes al antibiótico contenían inserto.

### 2.3.3. Secuenciación de DNA

#### 2.3.3.1. 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 "Erase-a-Base System" de Promega (EE.UU.), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Este método se basa en las propiedades de dicha enzima, específica para DNA de doble cadena y que 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 estos extremos y con una segunda que produzca extremos 5' protuberantes. De esta forma, la deleción ocurre sólo a partir del extremo 5' protuberante, evitando así que ocurra en zonas funcionalmente esenciales del vector. El DNA plasmídico empleado en este proceso se aisló como se cita en el apartado 2.3.2.1.

Los plásmidos se digirieron en primer lugar con la enzima que proporcionaba extremos 3' protuberantes y a continuación con la que proporcionaba extremos 5' protuberantes, sometiéndose posteriormente a digestión con exonucleasa III. Se extrajeron muestras 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 transformaron células de *E. coli* y se seleccionaron los clones deseados.



2.3.3.2. *Reacciones de secuenciación. Electroforesis vertical en geles de urea-poliacrilamida*

El DNA plasmídico empleado en los experimentos de secuenciación se obtuvo mediante la lisis por ebullición (2.3.2.1). La secuenciación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sanger *et al.* (1977), basado en el uso de didesoxirribonucleótidos de adenina, guanina, citosina y timina para producir paradas aleatorias durante la reacción de polimerización a partir del cebador. El nucleótido empleado para marcar radiactivamente las cadenas sintetizadas en dichas reacciones fue [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]dATP (1.212  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol), suministrado por New England Nuclear. Como cebadores se emplearon, bien los oligonucleótidos comerciales "Reverse primer" y "M13-20 primer", bien oligonucleótidos homólogos a secuencias conocidas de la región que se quería secuenciar. Los reactivos y la DNA-polimerasa empleados en las reacciones fueron los incluidos en el equipo Sequenase versión 2.0, suministrado por U.S.B. 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 2.2.7.), previamente equilibradas en tampón TE.

Los productos de las reacciones de secuenciación se separaron en geles de poliácridamida 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 y siguiendo las instrucciones del fabricante, 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, consiguiéndose con ello determinar una secuencia de al menos 300 bases.

Terminada la electroforesis, los geles se colocaban sobre papel Whatman 3 MM y se secaban utilizando un secador de geles Drygel modelo SE1160 de Hoefer Scientific Instruments. La autorradiografía se realizaba con películas Kodak X-OMAT-S, en carcasas de exposición Sigma, a temperatura ambiente, empleándose para el revelado de las películas reactivos suministrados por Valca, siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

### 2.4.1. Aislamiento de RNA total de *Synechocystis*

Los cultivos se recogieron por centrifugación, cuando la concentración clorofila era 3-4  $\mu\text{g/ml}$  (fase exponencial). Las células se rompieron con fenol y perlas de vidrio, como se indica en el apartado 2.3.2.3. en presencia de macaloide 0,9 % para evitar la degradación del RNA. Los ácidos nucleicos se precipitaron en presencia de LiCl 60 mM y 2,5 volúmenes de etanol frío. La muestra resuspendida se trató con DNasa libre de RNasas (Boehringer Mannheim). Esta enzima se eliminó por fenolización y el RNA se precipitó en presencia de acetato sódico y etanol frío.

Todo el proceso se realizó en el menor tiempo posible, en frío y con todos los materiales y productos libres de RNasas.

### 2.4.2. Preparación de RNAs mediante transcripción *in vitro*

#### 2.4.2.1. Transcripción preparativa

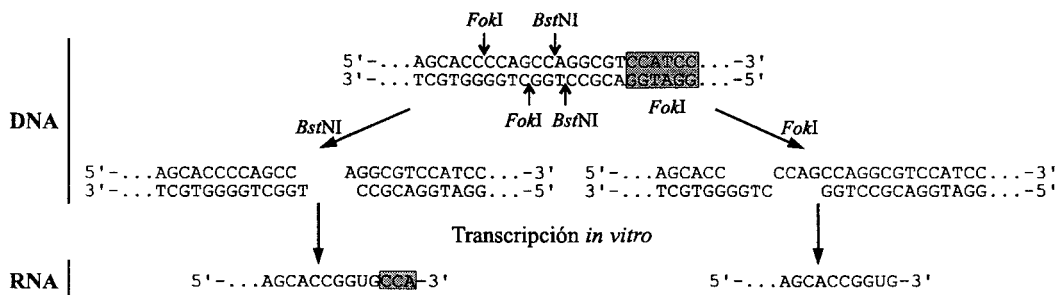
Los plásmidos codificantes de los RNAs que se iban a transcribir se digirieron con el enzima de restricción necesario para crear el extremo 3' deseado. En la tabla 6 se detallan estas enzimas y los diferentes RNAs utilizados. En la figura 4 se muestra un ejemplo de como se crean los extremos 3' de los RNAs en los casos en que desde un mismo plásmido se generen dos RNAs diferentes.

**Tabla 6. Moldes utilizados para la obtención de diferentes RNAs**

Plásmido molde <sup>(1)</sup>	RNA	Diana para enzima de restricción en 3'	Procedencia
<b>a) Sustratos de la RNasa P</b>			
pTyrSu3	pre-tRNA <sup>Tyr</sup> Su-3	<i>FokI</i>	<i>E. coli</i>
*pT7GLN	pre-tRNA <sup>gln</sup> +CCA	<i>BstNI</i>	<i>Synechocystis</i>
	pre-tRNA <sup>gln</sup> -CCA	<i>FokI</i>	
*pT7GLU	pre-tRNA <sup>glu</sup> +CCA	<i>BstNI</i>	<i>Synechocystis</i>
	pre-tRNA <sup>glu</sup> -CCA	<i>FokI</i>	
p4.5S	pre-4.5 S	<i>FokI</i>	<i>E. coli</i>
<b>b) RNAs P</b>			
pJA2	M1	<i>FokI</i>	<i>E. coli</i>
*pT76803	RNA P de <i>Synechocystis</i>	<i>DraI</i>	<i>Synechocystis</i>
*pT76803J15/16	RNA PJ15/16 de <i>Synechocystis</i>	<i>DraI</i>	<i>Synechocystis</i>
pT76803 $\Delta$ 12	RNA P $\Delta$ 12 de <i>Synechocystis</i>	<i>DraI</i>	<i>Synechocystis</i>

pT76903	RNA P de <i>Pseudanabaena</i>	<i>Dra</i> I	<i>Pseudanabaena</i>
pT77120	RNA P de <i>Anabaena</i>	<i>Dra</i> I	<i>Anabaena</i>
pT77120Δ12	RNA PΔ12 de <i>Anabaena</i>	<i>Dra</i> I	<i>Anabaena</i>
*pT7CYPAR	RNA P del cianelo de <i>C. paradoxa</i>	<i>Dra</i> I	<i>C. paradoxa</i>
*pT7CYPARL14	RNA L14 del cianelo de <i>C. paradoxa</i>	<i>Dra</i> I	<i>C. paradoxa</i>

(1) Los plásmidos se han descrito previamente en las tablas 3 y 4. \* Estos plásmidos se construyeron en este trabajo y se describen en Resultados (3.2.1.)



**Figura 4. Esquema de producción de un pre-tRNA con o sin el extremo 3'CCA por transcripción *in vitro* a partir del mismo molde.** Se muestran los extremos generados en el DNA molde por digestión con *Fok*I o *Bst*NI y la región 3' del transcrito generado por la RNA polimerasa en cada caso. En una caja se muestran la diana de la enzima *Fok*I y la secuencia 3'CCA que diferencia a los dos RNAs transcritos. La secuencia de reconocimiento de la enzima *Bst*NI coincide con el sitio de corte.

Cuando se comprobó que la digestión era completa, se fenolizó y se precipitó el DNA. 40 ng/μl de DNA digerido se incubaron durante 10 h a 37 °C en tampón de transcripción (Tris-HCl 40 mM, pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 24 mM; espermidina 2 mM; Tritón X-100 0,01 % (v/v); DTT 10 mM; BSA 0,05 μg/μl; NTP 5 mM; inhibidor de RNasas 0,1 U/μl (RNasin, Promega) y polimerasa de RNA del fago T7 (0,4 U/μl)) en un volumen final de ensayo de 100 μl. Tras la transcripción, la muestra se trató con DNasa I (5 U, durante 30 min a 37 °C) (Boehringer) y se purificó mediante columnas de Sephadex G-50 (2.2.7.).

Los RNAs P se renaturalizaron mediante una incubación de 5 min a 80 °C, tras lo que se dejaban enfriar a temperatura ambiente hasta alcanzar 37 °C.

Para generar RNAs radioactivos mediante transcripción *in vitro* la concentración de nucleótidos se redujo hasta 0,5 mM y se adicionaron 25 μCi de un nucleótido radioactivo

( $\alpha$ - $^{32}$ P CTP con una actividad específica variable entre 400 Ci/mmol y 3.000 Ci/mmol). El volumen final de la reacción fue 40  $\mu$ l y se utilizaron como molde 2  $\mu$ g de DNA plasmídico digerido con la enzima adecuada. Tras diez horas de incubación, la muestra se pasó por una columna de Sephadex G-25 (apartado 2.2.7.) para eliminar el nucleótido no incorporado. Los RNA se purificaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida como se describe en el apartado 2.4.2.3.

#### *2.4.2.2. Separación de RNA en geles desnaturalizantes de poliacrilamida*

Geles de poliacrilamida (19:1 acrilamida:bis-acrilamida) de una composición variable entre 5 % y 20 %, dependiendo del tamaño de los RNAs a separar, fueron preparados en TBE conteniendo 7 M de urea. Antes de cargar las muestras se les añadió 1/10 de volumen de tampón de carga para RNA. El gel se preparó en dos cristales de 20 cm x 18 cm x 0,5 cm con una separación de 0,75 mm. La electroforesis se llevó a cabo a intensidad constante de 25 mA en tampón TBE.

#### *2.4.2.3. Purificación de RNA marcado con $^{32}$ P de geles desnaturalizantes de poliacrilamida*

Tras la separación en gel de los RNAs, las bandas se localizaron mediante autorradiografía durante 1 min. Las bandas deseadas se cortaron del gel y se eluyeron durante 10 h a 37 °C en presencia de Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; SDS 0,01 % (p/v); EDTA 1 mM, pH 8,0 y NaCl 100 mM. Tras la incubación, las muestras se fenolizaron, precipitaron y resuspendieron en un volumen apropiado.

#### **2.4.3. Marcaje de RNA en el extremo 5'**

10  $\mu$ g de RNA se desfosforilaron con 10 U de fosfatasa alcalina (Pharmacia-Biotech) en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 y 0,1 mM EDTA. El RNA desfosforilado se marcó con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP siguiendo el protocolo descrito para el marcaje de oligonucleótidos (2.3.2.7.). Tras pasar las muestras por Sephadex G-25, éstas se cargaron en geles de urea-poliacrilamida de porcentaje adecuado y se aislaron de éste según se ha descrito.

#### **2.4.4. Interacción RNA-RNA**

##### *2.4.4.1. Análisis de la interacción RNA-RNA mediante la técnica de retardo en gel*

Pre-tRNAs (100 nM) marcados con  $^{32}\text{P}$  y RNAs P (0–500 nM) se incubaron en Tris-acetato 50 mM, pH 7,0; glicerol 5 % (v/v); acetato amónico 100 mM; acetato de magnesio 100 mM y EDTA 2 mM durante 10 min en un volumen de 10  $\mu\text{l}$ . La mezcla se separó en gel de poliacrilamida al 5 % equilibrado en el mismo tampón. La electroforesis se llevó a cabo a 37 °C durante 10-20 h con recircularización del tampón de electroforesis, las condiciones fueron ajustadas para permitir al BFB llegar al extremo inferior del gel. Las constantes de disociación aparentes fueron calculadas según la siguiente ecuación:

$$k_d = [\text{RNA P}_{\text{total}} \text{ al } 50 \% \text{ del complejo}] - 0,5 \times [\text{tRNA}_{\text{total}}] \text{ (Hardt et al., 1993).}$$

##### *2.4.4.2. Análisis de la interacción RNA-RNA mediante la técnica de interacción en filtro*

100 pmoles de diferentes RNAs fueron transferidos con un aparato "Slot-Blot" (Hoefer) a una membrana de nitrocelulosa por vacío y fijados a ésta con una incubación a 80° C durante dos horas. Las membranas fueron bloqueadas con RNA de levadura (Sigma, tipo VI, preparado según Sägger *et al*, 1997) en 20 mM Hepes-KOH, pH, 8,0; 100 mM  $\text{MgCl}_2$  y 1M KCl durante 2 h a 30° C. RNAs P marcados radioactivamente en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ , fueron añadidos en el mismo tampón, a una concentración de 1000 cpm/ml, continuándose la hibridación 30 min más. Las membranas se lavaron dos veces con el mismo tampón antes de su exposición.

#### **2.4.5. Interacción RNA-proteína. Cálculo de constantes de disociación**

##### *2.4.5.1. Análisis de la interacción RNA-proteína mediante la técnica de retardo en gel*

0,1 nM del componente RNA P, marcado con  $^{32}\text{P}$ , se incubó en presencia de la proteína P (0,01–100 nM) en Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; acetato de magnesio 10 mM; acetato amónico 400 mM; Nonidet P-40 0,01 % (v/v) (Sigma) y glicerol 5 % (v/v). La incubación se realizó a 37 °C durante 10 min en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Las muestras se separaron en gel de poliacrilamida al 5 % en Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; acetato de magnesio 10



mM y Nonidet P-40 0,01 % (v/v). La electroforesis se llevó a cabo a 4 °C durante 3-4 h a intensidad constante de 5 mA, con recircularización del tampón de electroforesis (Talbot *et al.*, 1994). Las constantes de disociación aparentes fueron calculadas usando la siguiente ecuación:

$$k_d = [\text{Proteína } P_{\text{total}} \text{ al } 50 \% \text{ del complejo}] - 0,5 \times [\text{RNA } P_{\text{total}}]$$

#### 2.4.5.2. Análisis de la interacción RNA-proteína mediante la técnica de Northwestern

Proteínas separadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (2.2.5.1.) fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa como se describió para la técnica de Western (2.2.6.3.). Las proteínas transferidas se renaturalizaron en presencia de tampón SB mediante incubación con agitación constante a 4 °C durante 12 h. La membrana se prehibridó en presencia del mismo tampón conteniendo RNA de levaduras (Sigma, tipo VI) a una concentración de 50 mg/ml a temperatura ambiente durante 2 h. RNA marcado en su extremo 5' con <sup>32</sup>P fue añadido a una concentración de 0,25-0,5 x 10<sup>6</sup> cpm/ml, continuándose la incubación durante 2 h más. La membrana se lavó cuatro veces con 50 ml de SB en las mismas condiciones de temperatura y agitación que la hibridación y se analizó inmediatamente por autorradiografía.

#### 2.4.6. Extensión del cebador

RNA total extraído según se describió (2.4.1.) se hibridó con 5 x 10<sup>5</sup> cpm de un oligonucleótido complementario al RNA diana que estaba marcado en su extremo 5' con <sup>32</sup>P como se describió (2.3.2.7.). El híbrido RNA-DNA (5 µl típicamente) se incubó durante 5 min a 90 °C y se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45 °C. Se añadió el tampón de la enzima transcriptasa reversa (Gibco-BRL) y 10 U de la enzima. El volumen de ensayo fue 30 µl y la reacción de extensión se realizó durante 45 min a 45 °C. Los productos de extensión del cebador se analizaron en gel de poliacrilamida-urea al 6 % (2.3.3.2.).

## **2.5. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD RNasa P**

Para el ensayo de la actividad RNasa P se utilizaron como sustratos diferentes RNAs marcados radioactivamente según se describe en el apartado 2.4.2.2.

Para ello se incubaban por separado entre 0,1 y 10 pmol de los RNAs de las enzimas y una cantidad variable de los sustratos, a 37 °C en tampón de ensayo durante 5 min. Tras esto, se mezclaron, en un volumen final de 10 µl, en diferentes tampones según el ensayo a realizar. Tras la incubación por un tiempo variable, la reacción se detenía con la adición de 1/10 de volumen del tampón de carga de RNA. Los productos fueron separados de los sustratos en electroforesis en gel de poliacrilamida según se describe en el apartado (2.4.2.2.). La radioactividad presente en los geles se estimó en un Instantimager (Packard, EE.UU.) o en un Cyclone (Packard). La actividad enzimática se cuantificó como la razón entre la radioactividad presente en los productos (tRNA o fragmento 5') y el pre-tRNA, con una corrección de la radioactividad estimada en función del número de citosinas presentes en cada uno de los RNAs.

En el caso de que la proteína P estuviera presente, era necesario reconstituir primero la holoenzima. Para ello, en tubos conteniendo el tampón de ensayo adecuado, se añadió la proteína P a la concentración deseada, incubándose a 37 °C durante 5 min. A continuación se incluyó en la reacción el RNA P y se incubó a la misma temperatura durante 15 min. La reacción se inició con la adición del sustrato. La proteína se encontraba a una concentración 10 veces mayor que la del RNA en la mayoría de los ensayos.

La actividad RNasa P se inmunoprecipitó según se ha descrito (Mamula *et al.*, 1989). Anticuerpos purificados por FPLC (2.2.6.2.) se incubaron con proteína A-sepharosa una noche a 4 °C con agitación. La RNasa P de *E. coli* o de *Synechocystis* se incubó con suero preinmune, anticuerpos anti-proteína P de *E. coli* o anti-proteína P de *Synechocystis*, durante 2h y la preparación se centrifugó 1 min. El sobrenadante se usó para ensayos RNasa P.

## 2.6. MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

### 2.6.1. 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 (1983). Las células se cultivaban en 100 ml de medio líquido  $\phi$ -broth (apartado 2.1.2.2.) con agitación vigorosa hasta alcanzar una absorbancia a 580 nm entre 0,45 y 0,65. Tras mantener el cultivo en hielo durante 10 min las células se recogían por centrifugación (5 min, 750 x g, 4 °C) y se resuspendían en 30 ml de solución TjBI fría (acetato potásico 30 mM, pH 5,8; RbCl<sub>2</sub> 100 mM; MnCl<sub>2</sub> 50 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM y glicerol al 15 % (v/v)) esterilizada por filtración. Tras mantener la solución en hielo durante 5 min, se repetía el proceso de centrifugación anterior y se resuspendían las células en 4 ml de solución TjBII fría (MOPS-NaOH 10 mM, pH 7,0; RbCl<sub>2</sub> 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 75 mM y glicerol al 15 % (v/v)). Las células así preparadas se conservaban a -70 °C en alícuotas de 200  $\mu$ l. La competencia de las células se comprobaba transformándolas con cantidades conocidas de DNA plasmídico, obteniéndose en torno a 10<sup>7</sup> transformantes/ $\mu$ g de DNA.

Para transformar las células competentes, el DNA transformante (máximo 20  $\mu$ l) se mezclaba suavemente con una alícuota de células competentes descongelada en hielo, empleando tubos (13 x 75 mm) de poliestireno-cristal suministrado por Soria Greiner S.A. (España). Tras incubar 30 min en hielo se sometían a choque térmico durante 45 s a 42 °C y se volvían a incubar en hielo durante 2 min. La suspensión se suplementaba posteriormente con 0,8 ml de medio LB y se incubaba durante una hora a 37 °C. A continuación las células se sembraban en medio LB sólido con el antibiótico adecuado para la selección de transformantes.

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

## **2.7. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **2.7.1. Determinación de proteína**

La determinación de proteína de las suspensiones celulares y en extractos crudos se llevó a cabo por el método de Lowry *et al.* (1951), con las modificaciones de Markwell *et al.* (1978), utilizando seroalbúmina como patrón.

Cuando las preparaciones contenían menor cantidad de proteína (0,2-0,5 mg) se utilizó el método descrito por Bradford (1976), usando el reactivo para proteínas de Bio-Rad y siguiendo el procedimiento de microensayo recomendado por el fabricante. Se utilizó ovoalbúmina como patrón.

### **2.7.3. Determinaciones espectrofotométricas**

Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic 601, marca Milton Roy.

### **2.7.4. Medidas de pH**

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

### **2.7.5. Determinación de la concentración salina**

La concentración salina de los efluentes de la columna de cromatografía de intercambio iónico se determinó mediante el uso de un conductivímetro Crison CDTM523 (España). Se realizaron rectas patrón con soluciones de concentración salina conocida.

### **2.7.6. Cuantificación de DNA y RNA**

El DNA y el RNA se cuantificaban midiendo su absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA bicatenario, 30  $\mu\text{g/ml}$  de oligonucleótidos o 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA. Para estimar la pureza se utilizó la razón entre la absorbancia a 260 nm y la absorbancia a 280 nm considerándose, para ácidos nucleicos

en general, una muestra suficientemente pura la que presenta un valor comprendido entre 1,7 y 2,1.

### 2.7.7. Determinación de $K_m$ y $V_{max}$

Para determinar las constantes cinéticas de diferentes enzimas, se realizaron representaciones de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk, ( $1/V$  frente a  $1/S$ ). Para calcular las velocidades iniciales de la reacción en cada concentración de sustrato se realizaron ensayos en tiempos variables (15-20 min) con la toma de puntos cada 3 min, con el fin de determinar la velocidad en la parte lineal de la reacción.

## 2.8. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA RNA Y PROTEÍNAS

Para la búsqueda de fases de lectura abierta, localización de sitios de restricción, traducción a proteína de secuencias nucleotídicas y obtención de perfiles hidrofóbicos 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 9.1 y el acceso al banco de secuencias del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) en Heidelberg (Alemania). La búsqueda de similitudes de una secuencia con las contenidas en el banco de datos del EMBL/Genbank, 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 W (Thomson *et al.*, 1994). La determinación de los porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos se realizaron utilizando los programas Bestfit y Gap, los cuales se basan en el mejor alineamiento entre dos secuencias, calculando el número de residuos idénticos entre ambas. Secuencias y estructuras de diferentes RNAs P utilizados se tomaron de la "RNase P Database" (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNaseP/home.html>) (Brown, 1998).

Las nuevas secuencias de DNA descritas en este trabajo están depositadas en las bases de datos con los siguientes números de acceso:

X73135 gen *rnpB* de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903.

X81989 genes *rpmH* y *rnpA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

### **3. RESULTADOS**

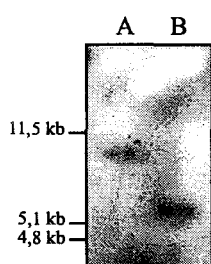
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 CLONACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA ACTIVIDAD RNasa P DE ALGUNAS CIANOBACTERIAS

##### 3.1.1. Identificación del gen codificante del RNA P (*rnpB*) de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903

###### 3.1.1.1. Hibridación heteróloga

Para identificar el gen *rnpB* de *Pseudanabaena* se utilizó la hibridación heteróloga, con una sonda del mismo gen de la cianobacteria *Anacystis nidulans* (Banta *et al.*, 1992). Un fragmento de restricción *XhoI-PstI* del plásmido Ani4, que contiene el gen *rnpB* de



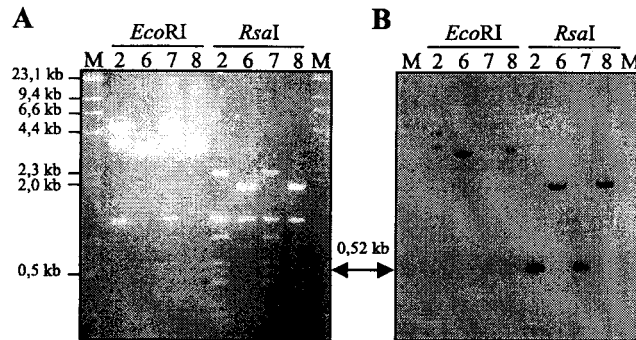
**Figura 5. Hibridación de DNA total de *Pseudanabaena* con una sonda de *A. nidulans* que contiene el gen *rnpB* de *A. nidulans*.** (A) DNA de *Pseudanabaena* digerido con *EcoRI*. (B) DNA de *Pseudanabaena* digerido con *HindIII*. A la izquierda se indica el tamaño de los marcadores

*Anacystis nidulans*, se marcó radioactivamente y se utilizó como sonda sobre un filtro que contenía DNA total de *Pseudanabaena* digerido con *EcoRI* o *HindIII*. En la figura 5 se muestra el resultado de la hibridación. En cada carril se localizó una única señal de hibridación y se eligió para continuar el trabajo la zona de 6,6 kb detectada en la digestión con *HindIII*, debido a que poseía un tamaño más que suficiente para contener el gen buscado (aproximadamente 400 pb) y era la menor de las bandas detectadas.

###### 3.1.1.2. Construcción de una subgenoteca de *Pseudanabaena*

Se digirieron 5  $\mu$ g de DNA total de *Pseudanabaena* con *HindIII* y se separaron en un gel de agarosa. Se cortó la región de un tamaño aproximado a 6,6 kb, se purificó el DNA y se ligó en pBluescript-SK+ digerido con la misma enzima. La mezcla de ligación se utilizó para transformar la estirpe MC1061 de *E. coli*. Se picaron 400 colonias sobre 4 filtros de nitrocelulosa (HATF Millipore) y se incubaron, lisaron e hibridaron tal y como se describe en el apartado 2.3.2.10., utilizando la sonda descrita en el apartado anterior.



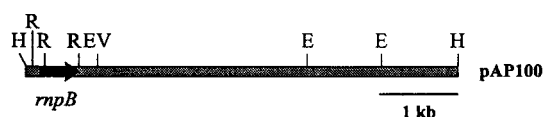


**Figura 6. Hibridación de DNA plasmídico con una sonda de *A. nidulans* que contiene el gen *rnpB*.** (A) Gel de agarosa mostrando la restricción con *EcoRI* y *RsaI* de los clones positivos obtenidos de la hibridación *in situ*. (B) Autorradiografía de la hibridación sobre el filtro obtenido por transferencia del gel mostrado en A. La flecha marca la banda *RsaI* de 0,52 kb del clon 2 utilizada para construir el plásmido pAP111. M, DNA de fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*; 2, 6, 7 y 8 son clones identificados en la hibridación de colonias, ver el texto.

La autorradiografía de los filtros reveló señal de hibridación en cinco colonias, a las que se les extrajo DNA plasmídico para realizar su mapa de restricción. Uno de ellos se descartó por no presentar el inserto extremos *HindIII*. DNA de los cuatro clones restantes fue digerido con *EcoRI* y, separadamente, con *RsaI*. Los productos de la digestión enzimática se separaron en gel de agarosa y éste se transfirió a filtro y se hibridó con la misma sonda. En la figura 6 se muestra el resultado de la hibridación. Tanto el análisis de restricción como la hibridación indicaban que los clones 2 y 7 eran idénticos entre sí, al igual que los clones 6 y 8, pero estos últimos fueron descartados por tener un inserto menor de 6 kb (figura 6).

Se decidió continuar analizando el clon 2, al que se denominó pAP100. El mapa de restricción de pAP100 se muestra en la figura 7, con los enzimas de restricción usados y la situación del gen *rnpB*, como se confirmó por secuenciación. Para confirmar que el inserto de pAP100 procedía de *Pseudanabaena* se realizó una hibridación en condiciones estrictas (no mostrado).

**Figura 7. Mapa de restricción del inserto de pAP100.** H. *HindIII*, R. *RsaI*, EV. *EcoRV* v E. *EcoRI*



La banda de menor tamaño que mostraba hibridación y que conservaba un tamaño adecuado, 0,52 kb, se subclonó en pBluescript-SK+ digerido con *EcoRV*, denominándose el plásmido obtenido pAP111.

### 3.1.1.3. Secuenciación del gen *rnpB*

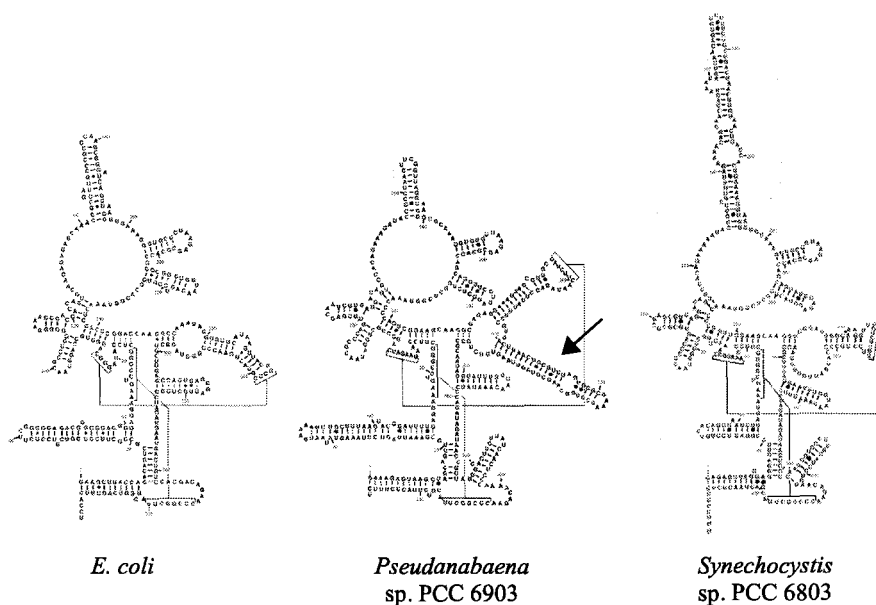
Las primeras reacciones de secuenciación (2.3.3.) desde oligonucleótidos complementarios al plásmido pAP111 determinaron la presencia de una secuencia homóloga al gen buscado, por lo que se llevó a cabo la secuenciación del fragmento completo. La secuenciación se realizó por el método de terminación de cadenas con dideoxinucleótidos, secuenciándose ambas cadenas completamente. El plásmido pAP111 contenía el gen casi completo, excepto el extremo 5'. Para la lectura de éste extremo y de la diana *RsaI* se utilizaron clones procedentes de deleciones seriadas del plásmido pAP100 (2.3.3.1.). La secuencia obtenida se muestra en la figura 8.

	-35	-10	
1	aagcttgctatg	catacctgtagtacataatggtagatg	GAAAGAGTAAGCGAGCAGTT 60
61	GCGAAATTAGTCTTAAAGTATAATGAAAATTTGCTTTAAGTACGGATTTTGAGGAAAAGTC		120
121	CGGGCTTCCAAGAAGATCAGGCTGCTGGATAACGCCAGTGCAGCAATCGTGAGGATAG		180
181	TGCCACAGAAAAGATACCGCTAACTTCGGTTAGGTAAGGGTGCAAAGGTGTGTTAAGAGC		240
241	GCACCAGCAGGGTCGTGAGGCTCTGGCTCGGTAACCCAGTCGGAAGCAAGGCAGAGG		300
301	AAATAAGCGTTGCGATCTTCAATAGACCTTATTTCCGTGACTTAAC TGCGTTTAGTGCGC		360
361	GAAAGCGTGGCAAGCGTAGTTAAGTGTGTGCCGCAAGAGGTATTTGGTAACAAATATCCC		420
421	AGATAGATAACCGCTAGGGCAGTTGTTATCAACTCCAAAACAGAACCCGGCTTATGTCT		480
481	TACTCTTTCTatcaacaaatccgataaaatatccaaacaagactaatcatccccctctttt		540
541	ttgggattgctggttggttacagaatattcagaaaacactaaaaaaatagatatagttta		600
601	tgttttttgactaaaaccactcttaaaatctggt		635

**Figura 8. Secuencia de DNA del gen *rnpB* de *Pseudanabaena*.** Secuencia de DNA del gen *rnpB*. Subrayadas se muestran las posibles secuencias -35 y -10. La secuencia que codifica el RNA se muestra en mayúsculas y azul. Los extremos del RNA no se han determinado experimentalmente, pero se han deducido por homología con otros RNAs P.

La estructura del RNA deducida de la secuencia y la comparación con las estructuras secundarias propuestas para los RNAs P de *Synechocystis* y *E. coli* se muestran en la

figura 9. El RNA P de *Pseudanabaena* es en términos generales similar al de otras bacterias, excepto por la presencia de una hélice extra en el lazo que une P15 y P16 (J15/16). Esta hélice sólo se ha observado en algunos casos excepcionales, como en la cianobacteria *Oscillatoria* sp. PCC 7515 (Vioque, 1997).



**Figura 9. Estructura secundaria del RNA P de *Pseudanabaena*.** Modelos de estructura secundaria de los RNAs P de *E. coli*, *Pseudanabaena* y *Synechocystis*. La estructura del RNA P de *Pseudanabaena* se ha deducido por homología con otros RNAs P. La flecha marca la hélice extra en *Pseudanabaena*.

### 3.1.2. Clonación del gen codificante de la proteína P (*rnpA*) de *Synechocystis*

#### 3.1.2.1. Construcción de una genoteca de *Synechocystis*

DNA total de alto peso molecular purificado a partir de *Synechocystis* se digirió parcialmente con *HpaII* y se fraccionó por centrifugación a 100.000 g durante 21 h (2.3.2.14.) en un gradiente de sacarosa. Las fracciones que contenían fragmentos de entre 4 y 6 kb se juntaron y se ligaron en pBluescript-SK+ que se había digerido con *ClaI* y desfosforilado. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* MC1061 y se obtuvieron aproximadamente 15.000 clones independientes que contenían inserto. Se purificó DNA

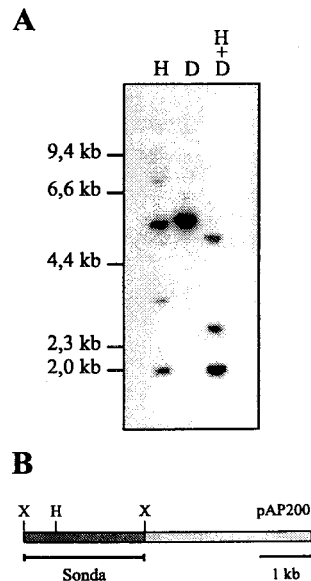
en masa de la genoteca y se amplificó en *E. coli* DH5 $\alpha$ . DNA obtenido de DH5 $\alpha$  se utilizó para los experimentos de complementación que se describen a continuación.

### 3.1.2.2. Clonación mediante complementación de un mutante termosensible de *E. coli*

Para clonar el gen *rnpA* de *Synechocystis* se utilizó una estrategia de complementación funcional con la cepa termosensible de *E. coli* NHY322. Esta cepa posee una mutación en el gen *rnpA* debido al cambio de Arg46 por His46 (Kirsebom *et al.*, 1988). El efecto de la mutación no está determinado, pero parece afectar al ensamblaje de las subunidades de la enzima (Baer *et al.*, 1989), debido a que la termosensibilidad se puede suprimir con la sobreexpresión de la subunidad RNA (Motamedi *et al.*, 1984) o de la subunidad proteica (Vioque *et al.*, 1988).

Además de la genoteca de *Synechocystis* descrita en el apartado anterior, se utilizó una genoteca de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Linden *et al.*, 1993) y otra de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 (Crespo *et al.*, en prensa). No se aisló ningún clon positivo de la genoteca de *Anabaena*. Varios clones positivos aislados de la genoteca de *Pseudanabaena* están siendo caracterizados actualmente en nuestro laboratorio por Cristina Tous.

De 120.000 transformantes de la genoteca de *Synechocystis* analizados se obtuvieron 26 colonias capaces de crecer a la temperatura restrictiva (43 °C). Con DNA plasmídico obtenido a partir de las colonias positivas se transformó nuevamente la cepa NHY322. De los 26 clones sólo 2 mantuvieron la capacidad de



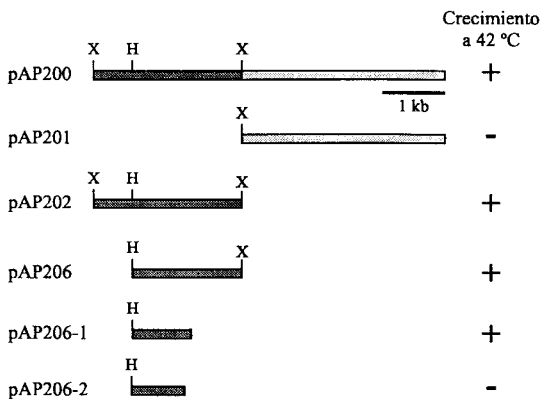
**Figura 10. Hibridación en condiciones estrictas de DNA de *Synechocystis* con una sonda procedente del inserto de pAP200.** (A) Hibridación, H. *Hind*III, D. *Dra*I y M. marcador. (B) Mapa de restricción de pAP200, mostrándose los sitios *Xba*I (X), *Hind*III (H) y con una línea la región usada como sonda en A. El sitio *Xba*I indicado en el extremo izquierdo del inserto pertenece al plásmido pBluescript-SK+.

complementar el fenotipo termosensible. Se les extrajo DNA y se transformó la cepa DH5 $\alpha$  para poder obtener DNA de calidad suficiente (el DNA extraído de la cepa NHY322 resultaba contaminado con DNasas). El DNA obtenido se analizó por restricción, calculándose el tamaño de los insertos y su patrón de restricción con un enzima cuya diana es frecuente (*RsaI*). Los dos clones poseían el mismo tamaño, 6,6 kb, y mostraban las mismas bandas cuando se digerían con la enzima *RsaI*. Se seleccionó uno de ellos y se le denominó pAP200.

Para confirmar que el inserto de pAP200 procedía de *Synechocystis* se realizó una hibridación en condiciones estrictas. Un filtro conteniendo DNA de *Synechocystis* digerido con diferentes enzimas se hibridó con el fragmento *XbaI* de aproximadamente 2 kb (figura 10B). La hibridación obtenida se muestra en la figura 10 y está de acuerdo con los datos obtenidos por análisis de restricción del plásmido pAP200.

### 3.1.2.3. Mapeo del gen *rnpA* en pAP200 y secuenciación del mismo

Para localizar el gen *rnpA* en el inserto de pAP200 se subclonaron fragmentos del mismo y se analizó su capacidad para complementar la mutación termosensible de la cepa de *E. coli* NHY322. Los subclones capaces de complementar se esquematizan en la figura 11. El inserto del plásmido pAP206 (con un tamaño aproximado de 1,4 kb) se secuenció completamente en las dos cadenas.



**Figura 11. Mapeo de pAP200 mediante complementación de *E. coli* NHY322.** Se muestran los fragmentos generados a partir de pAP200 y su capacidad de complementar el fenotipo termosensible de NHY322, indicada con un signo + (crece) o - (no crece). Los insertos de pAP206-1 y pAP206-2 se generaron por tratamiento de pAP200 con exonucleasa III.

#### 3.1.2.4. Análisis de la secuencia de DNA obtenida

El análisis de la secuencia obtenida reveló la presencia de dos fases de lectura abiertas (figura 12) con homología al gen *rpmH* de bacterias y cloroplastos (que codifica la proteína ribosómica L34) y al gen *rnpA* bacteriano (que codifica la proteína P) respectivamente.

Deleciones que truncaban la segunda pauta de lectura abierta (homóloga a *rnpA*) eran incapaces de complementar la mutación de la estirpe NHY322 (figura 12). Lo que confirmó que esta secuencia correspondía al gen *rnpA* de *Synechocystis*.

La zona codificante del gen *rnpA* comienza en un codón GTG sólo nueve nucleótidos detrás del codón de parada del gen *rpmH*. La presencia de éste codón de inicio parece ser un rasgo general de este gen en bacterias, así como su localización detrás del gen *rpmH*.

Una tercera pauta de lectura abierta se localizó superpuesta al gen *rnpA*. Fue denominada ORF1 y no presenta homología con ninguna otra proteína presente en las bases de datos analizadas y no está relacionada con una proteína de 7 kDa que es codificada en otras eubacterias por una pauta de lectura abierta igualmente superpuesta al gen *rnpA*.

Aguas arriba del comienzo del gen *rpmH* se localizaron tres secuencias similares a cajas dnaA, 5'-TTAT(C/A)CA(C/A)A-3' (Yoshikawa y Ogasawara, 1991).

#### 3.1.2.5. Determinación del punto de inicio de la transcripción del gen *rnpA* de *Synechocystis*

Para localizar el extremo 5' del RNA mensajero de este gen se utilizó la técnica de extensión del cebador descrita en el apartado 2.4.7. RNA total extraído de *Synechocystis* se hibridó con el oligonucleótido PE1 (tabla 5), complementario a la zona del codón de inicio del RNA mensajero del gen *rpmH* de *Synechocystis*. El híbrido se utilizó como molde para producir DNA mediante transcripción reversa. El DNA extendido se separó en gel de poliacrilamida-urea (2.3.3.2.) en paralelo con una reacción de secuenciación del plásmido pAP206 realizada con el mismo oligonucleótido. El resultado se muestra en la figura 13, donde se aprecian tres bandas principales como posibles extremos 5' de este mensajero. La situación de estos nucleótidos en la región se mostró en la figura 12.



## Resultados

*Hind*III

AAGCTTTTTTTTACCATTCCAAGTCAAGCCACCGGGCATTGTTCGGGCTAATGACCATTACTGCCGAGCAAGTGGTGGACCCACGCAGT 90

TTGACCCTGCTAGCCATACTTTGACCCCAAGGCTACTCTGGAGAAGCCCCGTTGGTTCCACCGTTAAAGCCAGTTTTTACCAGGGAATTTG 180

CCCAGATGATTACTTTGTCCACCCTCAAAGCCAGTTTGTAGTCCGGAGGAATTAGGAGTCTTTAAAAAAGGGAACCGCCTGTCGGTGTTC 270

CCGCTCTCCCGCGGATCGCCAATCGAATTTTAGAGTTAGCTTAATCCATGAGCAATGATACAATTTGGAGACTGTGTCTTTTTTTTGGGAG 360

*rpmH*>

TAACGGTTCATGACTCAACGAACCTCGGCGGAACCAACCGCAACAAAAAGCTACTTCCGGTTTCGGGCGAGAATCGTACCATAAC 450

M T Q R T L G G T N R K Q K R T S G F R A R M R T H N

*rnpA*>

GGCCGAAAGTTATCCAGGCCCGCGGAGCAAGGTCATCGCTTGGCTGTATAGTTTCCITTCGGTGGACTACCCAAAACACTGCGC 540

G R K V I Q A R R S K G R H R L A V \* M G L P K T L R

TTAAAACACTGGCAAGATTTCCAGACCGTTTATCAGCAAGGAAAGCGACATCGTCACAGCAATTTACTAATGCGGGTTCTAGGCGATCGC 630

L K H W Q D F Q T V Y Q Q G K R H R H S N L L M R V L G D R

CAGGCCGACCATAGCCGTTTGGCATCACCGTCAGCCAAAAGTTAGTAAAAAGCCACGGTTAGAAATCGTCTAAAACGTCAAAATTCGC 720

Q A D H S R F G I T V S Q K V S K K A T V R N R L K R Q I R

GCCGTCATTAACCATTTTCAGCCCAATCAAGCCGGGTTTGTAGTGGTGATTATTGTCTTGGCCCGAGGCGATGGGTGCAATATGAA 810

A V I N H F Q P Q I K P G F D V V I I V L P Q G I G C N Y E

+ ORF1>

CGTTTTTTCGAGAAATAGAGCAGTTATTTAGCCAAGCTGGGATTAATTGACCATGGGCATTCGAGAAAACCACTTATTATGAGGGCGGCC 900

R F L R E L E Q L F S Q A G I I D H G H S R N H L L \* M G I R E T T Y Y E G G P

\*

CCACATCGGGGACTTGTATCGTCAATATTTTATTGGGGTTCACCGTCATCTTTCTCCCTTTGACCGTTGGGGCGATCGTCCGGGCCATCTG 990

H I G D L I V N I L L G F T V I F L P L T V G A I V R A I W

GCTTCGTTACAAAATTACTGATCGCCGATTTCTGTACCAGCGGTTGGATGGTAAAGACCGCACCGACATCGTCTATGGCAAGTGGC 1080

L R Y K I T D R R I S V T G G W M G K D R T D I V Y G E V A

GAAAATGATTAATAATGCTAGGGGGATAGGCCTCTGGGGGATATAGTTGTACCCCTCAATGACCGTTCTCGGCTAGAGCTCGGGCCAT 1170

K M I K M P R G I G L W G D I V V T L N D R S R L E L R A M

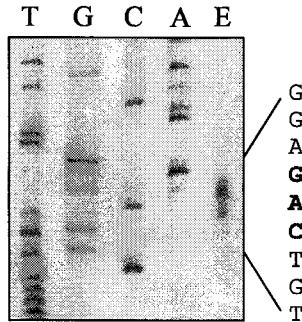
GCCTAACTTTCCGGGAAGTCTATGACTATATGGCCGAACGGGTCGCCGACAAAACCGGTCGGCCCTTAGAAGCTATCACCCAGCGGTAG 1260

P N F R G S L \*

*Xba*I

AAACAACAGGTAATTAATGATATTAATCAAGCACTGGGGCATTGAGCCCCCAGTCTTCCGGCAACCTTGGCAATATTTATCTAGA 1348

**Figura 12. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de los genes *rpmH* y *rnpA* de *Synechocystis*.** La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína L34 (azul), proteína P (rojo) y ORF1 (verde) se muestra debajo de la de nucleótidos. Este fragmento puede complementar la mutación *rnpA49* de *E. coli* en la cepa NYH322, así como también es capaz de hacerlo un fragmento generado por tratamiento con exonucleasa III que se extiende desde el sitio *Hind*III hasta el nucleótido 952 (marcado como \*). Sin embargo un fragmento generado de la misma forma, pero extendiéndose sólo hasta el nucleótido 818 (+), es incapaz de complementar. Sitios hipotéticos de unión al ribosoma delante del gen *rpmH* y de la ORF1 se marcan subrayados. Las flechas marcan la posición y orientación de las posible cajas *dnaA*. En rojo y subrayado se señala el punto de inicio de la transcripción (3.1.2.5.). Sobre la secuencia se indican posibles cajas -10 y -35.



**Figura 13. Determinación del punto de inicio de la transcripción del gen *rnpA*.** En negrita se muestran los nucleótidos correspondientes a las bandas detectadas.

11 nucleótidos aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción comienza una secuencia similar a las cajas -10 consenso de bacterias. También hay una secuencia -35, aunque menos conservada, en la posición apropiada.

### 3.1.2.6. Análisis de la secuencia de la proteína P de *Synechocystis*

La proteína de P de *Synechocystis* es sólo 20-30% idéntica a las proteínas P conocidas de otras eubacterias. La característica común entre todas las proteínas analizadas es un tamaño pequeño (110-120 aminoácidos) y una carga muy positiva. En la región central se encuentra la única zona altamente conservada, resaltando en ella la presencia de aminoácidos básicos. En la figura 14 se muestra el alineamiento de esta parte de la molécula con secuencias de diferentes bacterias. Esta zona podría constituir un dominio de unión a RNA (Morse y Schmidt, 1992 y Gopalan *et al.*, 1997).

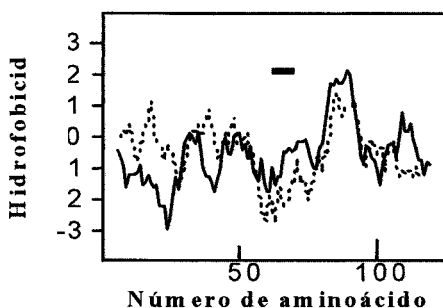
Dentro de esta porción conservada se localiza el motivo RNRLKR, parte más invariable de la proteína. Pese a la baja similaridad en cuanto a secuencia, existe un paralelismo en cuanto al perfil hidrofóbico entre la proteína P de *E. coli* y la de *Synechocystis*, excepto en las regiones amino y carboxi terminales (figura 15). Las interacciones hidrofóbicas han sido propuestas como parte del reconocimiento RNA-proteína en esta enzima en *E. coli* (Talbot y Altman, 1994).



```

Streptomyces bikiniensis P T R A G F V V S - K A V G - G A V V R N Q V K R R L R H L V C D R L S A L P P -
Streptomyces coelicolor  R T R A G F V V S - K A V G - V A V V R N K V K R R L R H L M R D R I D L L P P -
Micrococcus luteus      R P R A G F V V S - K A V G - N A V T R N R V K R R L R A V V A E - Q M R L P P L
Mycobacterium leprae   A P H V G L I I A - K T V G - S A V E R H R V A R R L R H V A R T M L G E L G G -
Bacillus subtilis      - L R V G L S V S - K K I G - N A V M R N R I K R L I R Q A F L E E K E R L K E -
Mycoplasma capricolum   Y L K Y G I S V G - K K I G - N A V I R N K V K R Q I R M I L K Q N I S E I G T -
Mycoplasma genitalium   T W R V A I S I A - K T K Y K L A V Q R N L I K R Q I R S I F Q Q I S N N L E P -
Escherichia coli       - - R I G L T V A - K K N V R R A H E R N R I K R L T R E S F R L R Q H E L P A -
Haemophilus influenzae - - R L G L T V A - K K H L K R A H E R N R I K R L V R E S F R L S Q H R L P A -
Proteus mirabilis      H P R I G L T I A - K K N V K R A H E R N R I K R L A R E Y F R L R H Q H Q L P A -
Pseudomonas putida     H P R L G L V I G - K K S V K L A V Q R N R L K R L M R D S F R L N Q Q L L A G -
Buchnera aphidicola    H P R L G L S I S - R K N I K H A Y R R N K I K R L I R E T F R L L Q H R L I S -
Coxiella burnetii      H S R L G V V A S - K R N V R K A V W R N R V R V V K E A F R I R K K D L P A -
Synechocystis 6803    - - R P G I T V S Q K - V S K K A T V R N R L K R Q I R A V I N H F Q P Q I K P -
          * +          *          + * * * * *          +
    
```

**Figura 14. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de diferentes proteínas P de bacterias.** Alineamiento de la región central conservada de la proteína P. Las secuencias usadas provienen de *Streptomyces bikiniensis* (Morse y Schmidt, 1992), *Streptomyces coelicolor* (Calcutt y Schmidt, 1992), *Micrococcus luteus* (Fujita *et al.*, 1990), *Mycobacterium leprae* (número de acceso en la base de datos L39923), *Bacillus subtilis* (Ogasawara y Yoshikawa, 1992), *Mycoplasma capricolum* (Miyata *et al.*, 1993), *Mycoplasma genitalum* (Fraser *et al.*, 1995), *Escherichia coli* (Hansen *et al.*, 1985), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *Proteus mirabilis* (Skovgaard, 1990), *Pseudomonas putida* (Ogasawara y Yoshikawa, 1992), *Buchnera aphidicola* (Lai y Baumann, 1992), *Coxiella burnetii* (Suhan *et al.*, 1994) y *Synechocystis* sp. PCC 6803 (este trabajo). Posiciones muy conservadas mostrando un residuo con carga positiva se señalan con “\*”. Residuos hidrofóbicos altamente conservados se muestran con un signo “+”. El alineamiento se realizó usando Clustal W.



**Figura 15. Alineamiento de perfiles de hidrofobicidad.** (—) Proteína P de *E. coli*. (---) Proteína P de *Synechocystis*. El perfil se obtuvo con una ventana de 11 aminoácidos (Kyte y Doolittle, 1982). La línea negra muestra la posición de la secuencia conservada RNRLKR.

### 3.2. CARACTERIZACIÓN *in vitro* DE LA RNasa P DE *Synechocystis*

*Synechocystis* es la única cianobacteria en la que se han identificado los genes tanto de la subunidad RNA (Vioque, 1992) como proteína (3.1.2. de esta Tesis). Por ello se decidió utilizar la RNasa P de este organismo para su caracterización bioquímica, ya que la clonación de los genes facilita la preparación de las subunidades correspondientes.

El estudio *in vitro* de la RNasa P requiere la disponer de cantidades suficientes de las subunidades RNA y proteína purificadas y de los sustratos. Para ello se desarrollaron vectores de transcripción *in vitro* y un procedimiento de purificación de la proteína P de *Synechocystis* que se describen en los siguientes apartados.

#### 3.2.1. Construcción de vectores para la transcripción *in vitro* con RNA polimerasa del fago T7 de diferentes RNAs

Se hicieron diversas construcciones, descritas a continuación, que se utilizaron para preparar mediante transcripción *in vitro* RNAs utilizados en este trabajo. Los RNAs generados así poseen una secuencia y extremos que se esperan sean idénticos a los que tienen *in vivo*.

A continuación se enumeran las diferentes construcciones realizadas:

**pT76803:** Este plásmido permite la transcripción *in vitro* del RNA P de *Synechocystis*.

Se amplificó mediante PCR el gen *rnpB* de *Synechocystis* utilizando como molde el plásmido pAV1100 (Vioque, 1992). El cebador 5' usado (5'RP6803, tabla 5) contiene la diana *EcoRI*, el promotor del fago T7 y una secuencia complementaria al extremo 5' del gen *rnpB*. El cebador 3' (3'RP6803) contiene una secuencia complementaria al extremo 3' del gen *rnpB* y secuencias dianas para las enzimas de restricción *DraI* y *HindIII*. El producto de PCR se digirió con *EcoRI* y *HindIII* y se clonó en pUC19 digerido con las mismas enzimas.

Tras la digestión con *DraI* y transcripción *in vitro*, se obtiene un RNA idéntico al RNA P natural y con sus mismos extremos.

**pT7CYPAR:** Este plásmido se construyó para expresar el RNA P del cianelo de *Cyanophora paradoxa*.

Se amplificó mediante PCR el gen *rnpB* del cianelo de *Cyanophora paradoxa*, utilizando como molde DNA genómico del cianelo (donado por Wolfgang Loffelhardt,

Universidad de Viena) y basados en la secuencia conocida de este RNA (Shevelev *et al.*, 1995 y Baum *et al.*, 1996). Los cebadores usados (5'RPCYPAR y 3'RPCYPAR) se diseñaron de manera similar a los utilizados para generar el plásmido pT76803. El producto de PCR se clonó igualmente en pUC19 digerido con las mismas enzimas.

Tras la digestión con *DraI*, y transcripción *in vitro*, se obtiene un RNA idéntico al RNA P natural y con sus mismos extremos, excepto por la presencia de una G extra en el extremo 5' del RNA P.

**pT7GLN:** Este plásmido se construyó para expresar el pre-tRNA de glutamina de *Synechocystis*.

El gen *trnQ* se amplificó por PCR en base a la secuencia publicada (Mayes *et al.*, 1993) desde DNA genómico de *Synechocystis*. El cebador 5' (5'GLN) contenía la diana *BamHI*, el promotor del fago T7 la secuencia complementaria al extremo 5' del gen. El cebador 3' (3'GLN) hibridaba con la secuencia del extremo 3' del gen y contenía dianas para las enzimas *FokI*, *BstNI* y *HindIII*. El producto de PCR se cortó con *BamHI* y *HindIII* y se clonó en pUC19 digerido con las mismas enzimas. La digestión con *FokI* permitió generar, mediante transcripción *in vitro*, un sustrato que carece del extremo CCA-3'. La digestión con *BstNI* del mismo plásmido permitió obtener mediante transcripción *in vitro* un pre-tRNA que contenía la secuencia CCA-3' (figura 5).

**pT7GLU:** Este plásmido se construyó para expresar el pre-tRNA de glutámico de *Synechocystis*.

El gen *trnE* se amplificó por PCR en base a la secuencia publicada (Neill y Soell, 1990) desde DNA genómico de *Synechocystis*. El cebador 5' (5'GLU) contenía la diana *BamHI*, el promotor del fago T7 y la secuencia complementaria al extremo 5' del gen. El cebador 3' (3'GLU) hibridaba con la secuencia del extremo 3' del gen y contenía dianas para las enzimas *FokI*, *BstNI* y *HindIII*. El producto de PCR se cortó con *BamHI* y *HindIII* y se clonó en pUC19 digerido con las mismas enzimas. La digestión con *FokI* permitió generar mediante transcripción *in vitro* un sustrato que carece del extremo CCA-3'. La digestión con *BstNI* del mismo plásmido permitió obtener, mediante transcripción *in vitro*, un pre-tRNA que contenía la secuencia CCA-3'.

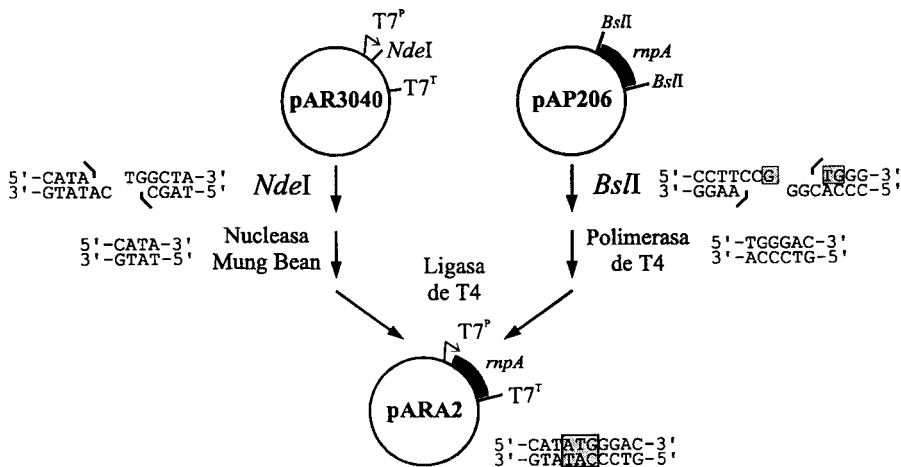
Otros sustratos y RNAs P fueron generados, por transcripción *in vitro*, desde los plásmidos que se indican en la tabla 5. Las estructuras de los sustratos de la RNasa P

empleados en este trabajo se muestran en el apéndice 2 de esta Tesis y las estructuras de los RNAs P se muestran en el apéndice 1 de esta Tesis.

### 3.2.2. Expresión en *E. coli*, purificación y obtención de anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis*

#### 3.2.2.1. Expresión del gen *rnpA* en *E. coli*

Para expresar la proteína P de *Synechocystis* en *E. coli* utilizamos un vector que permite la transcripción a partir de un promotor específico del fago T7. El plásmido pAR3040 (Studier y Moffatt, 1986) fue tratado con *NdeI* y los extremos 5' colgantes fueron eliminados con la nucleasa de "mung bean". El plásmido pAP206 fue tratado con *BsII* y la banda de 400 pb, conteniendo el gen *rnpA* de *Synechocystis*, fue tratada con la polimerasa del fago T4 para eliminar los extremos 3' colgantes. Esta banda se ligó en el sitio *NdeI* de pAR3040, seleccionándose un clon que contenía el gen *rnpA* en la orientación adecuada respecto al promotor del fago T7 y que se denominó pARA2 (su construcción se esquematiza en la figura 16). La estrategia de clonación utilizada permite expresar una proteína idéntica a la original. El codón de inicio GTG del gen *rnpA* está cambiado a un codón ATG para facilitar la expresión de la proteína.



**Figura 16. Estrategia de clonación del gen *rnpA* de *Synechocystis* en el vector pAR3040.** En pAR3040 y pARA2 se indican la posición de un promotor (T7<sup>P</sup>) y un terminador (T7<sup>T</sup>) específicos del fago T7. La construcción se comprobó mediante secuenciación. En una caja se muestran el codón GTG del gen *rnpA* y la sustitución por ATG en el plásmido pARA2.

El plásmido pARA2 se introdujo en *E. coli* BL21(DE3) (Studier y Moffatt, 1986). Esta cepa contiene el gen de la polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG y no reprimible por glucosa.

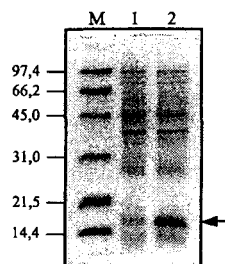
Se ensayaron diversas condiciones de expresión de la proteína, sin que pudiéramos obtener una expresión apreciable. Finalmente, ésta se logró mediante transformación de la cepa BL21(DE3) conteniendo pIZ233 con el plásmido pARA2 e inoculación directa de la mezcla de transformación en medio de cultivo M9 (2.2.1.). El cultivo se incubó hasta una densidad óptica a 550 nm de 0,5 y se indujo la expresión mediante la adición de 2 mM IPTG.

Las células se recogieron 3 h después

de la adición del inductor y se comprobó la presencia de una banda predominante de tamaño algo mayor al esperado (14,5 kDa) (figura 17). Está descrito que la proteína P de *E. coli* también migra más lentamente de lo esperado en geles de SDS (Vioque *et al.*, 1988).

### 3.2.2.2. Purificación de la proteína recombinante

Se recogieron las células de 2 L de cultivo en los que se había inducido la expresión según se indica en el apartado anterior y se preparó un extracto crudo (aproximadamente 34 mg de proteína) (2.2.2.2.). El extracto crudo se centrifugó a alta velocidad (100.000 g) durante 2 h. El precipitado (fracción ribosómica, aproximadamente 15 mg) se resuspendió en 2 ml de tampón JAS\* y se incubó 2 h a 0 °C con agitación. Este precipitado contiene la proteína P unida no específicamente a los ribosomas. La alta fuerza iónica del tampón JAS\* permite la disociación de la proteína P durante la incubación. Se repitió la centrifugación a alta velocidad, permaneciendo la proteína P de *Synechocystis* en el sobrenadante, que constituyó el lavado ribosómico (aproximadamente 5,5 mg) (2.2.3.).



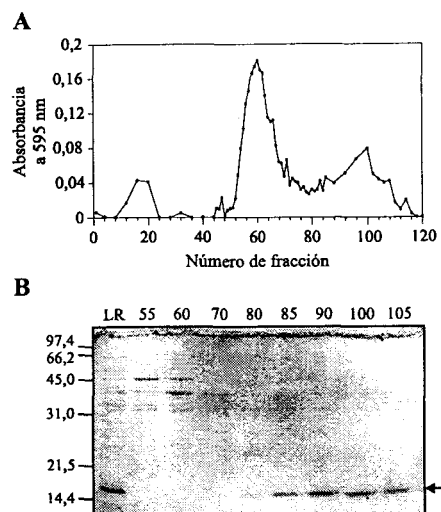
**Figura 17. Inducción de la proteína P de *Synechocystis* en células BL21(DE3) portadoras del plásmido pARA2.** (M) Marcadores de peso molecular (kDa). (1) Proteína total extraída antes de la adición de IPTG. (2) Proteína total extraída 3 h después de la adición de IPTG. La flecha indica la proteína inducida.

A partir de aquí se intentó, en primer lugar, seguir la estrategia utilizada previamente para purificar la proteína P de *E. coli* (Vioque *et al.*, 1988), la muestra se dializó dos veces frente a 2 L de tampón JAS. La proteína P precipitó como se esperaba, sin embargo, al contrario que la proteína P de *E. coli*, la proteína procedente de *Synechocystis* fue insoluble en los diversos tampones que se probaron, incluso en presencia de 7 M de urea. La proteína sólo se pudo resuspender en un tampón que contenía SDS 1 %. Esta proteína no era funcional en ensayos de actividad, pero presentaba homogeneidad electroforética, por lo que se utilizó para obtener anticuerpos, como se describe en el apartado 2.2.6.1.

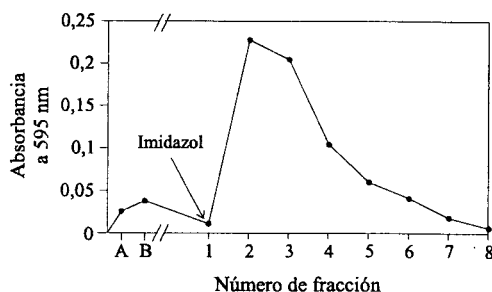
Con objeto de obtener proteína P de *Synechocystis* pura y funcional se investigaron estrategias alternativas que permitieron evitar la diálisis que producía la precipitación irreversible. El procedimiento óptimo encontrado consistió en una filtración en gel en una columna de Sephadex G-50 en tampón JAS\* seguido de una cromatografía en gel de afinidad por histidinas. La proteína P de *Synechocystis* presenta afinidad por el níquel presente en el gel debido, probablemente, a su elevado número de histidinas, sobre todo en la región C-terminal (...DHGHSRNHLL-COOH).

El lavado ribosómico (2 ml.) se cargó en una columna de Sephadex G-50 de 80 ml equilibrada en JAS\* y se eluyó a un flujo de 22 ml/h, colectándose 120 fracciones de 0,5 ml. Las fracciones que contenían la proteína P (83-115, aproximadamente 1,8 mg) (figura 18) se juntaron y se cargaron en una columna de afinidad por histidinas de 1 ml equilibrada en tampón JAS\*.

**Figura 18. Perfil de elución de la cromatografía en gel de Sephadex G-50.** (A) Perfil de elución de proteína determinado por el procedimiento de Bradford. (B) Gel SDS-PAGE de fracciones seleccionadas. M, Marcadores de peso molecular (kDa); LR, Lavado ribosómico; 55-105, Fracciones de la columna. La flecha indica la proteína P de *Synechocystis*.

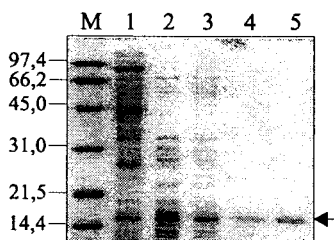


La columna se lavó con 10 ml del mismo tampón y con 20 ml del mismo tampón conteniendo urea 7 M. La proteína P se eluyó con 10 ml de tampón JAS\* conteniendo urea 7 M y 300 mM de imidazol, colectándose en 20 fracciones de 0,5 ml (figura 19). Las fracciones que contenían la proteína P (2-6) se juntaron.



**Figura 19. Perfil de elución de la cromatografía en gel de afinidad por histidinas.** Perfil de elución de proteína determinado por el procedimiento de Bradford. Las fracciones A (no unido) y B (lavado con urea) eran de 10 ml y 20 ml respectivamente. Las restantes fracciones fueron de 0,5 ml).

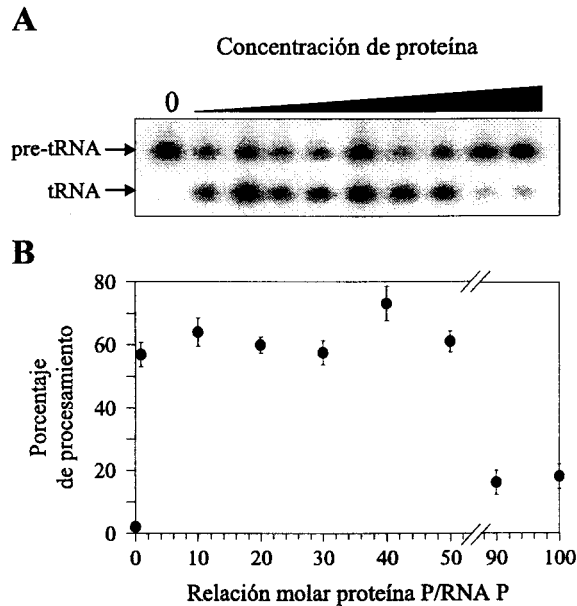
El rendimiento de todo el proceso de purificación era de aproximadamente 0,6 mg de proteína pura por litro de cultivo. La figura 20 muestra el perfil de proteínas de cada uno de los pasos de purificación.



**Figura 20. Purificación de la proteína P de *Synechocystis*.** M, Marcadores de peso molecular; 1, Extracto crudo; 2, Fracción ribosómica; 3, Lavado ribosómico; 4, Pico de elución de cromatografía de filtración en gel; 5, Pico de elución de cromatografía de afinidad por histidinas.

Se comprobó la calidad de la proteína purificada mediante un ensayo de reconstitución de la actividad RNasa P. Se reconstituyó el RNA P de *Synechocystis* con diferentes cantidades de la proteína P purificada y se ensayó la actividad de la holoenzima reconstituida sobre el sustrato pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA (figura 21). La proporción más pequeña utilizada ([proteína P]/[RNA P]=1) produjo un porcentaje de maduración próximo al

máximo, por lo que se puede deducir que una alta proporción de la proteína P purificada es funcional.



**Figura 21. Titulación de la proteína P purificada.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo de holoenzima reconstituida con diferentes proporciones proteína P/RNA P. El sustrato utilizado es pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA uniformemente marcado con <sup>32</sup>P. El ensayo se realizó en tampón 20 mM de Hepes-KOH, pH 8,0 y 50 mM de MgCl<sub>2</sub>. (B) Se muestra la actividad RNasa P en función de la relación molar proteína P/RNA P deducido a partir de varios experimentos similares al mostrado en A.

La proteína P purificada está libre de proteína P de *E. coli* (ver apartado siguiente) y no está contaminada por el RNA P de *E. coli* puesto que no presenta actividad en ausencia de RNA P exógeno (no mostrado).

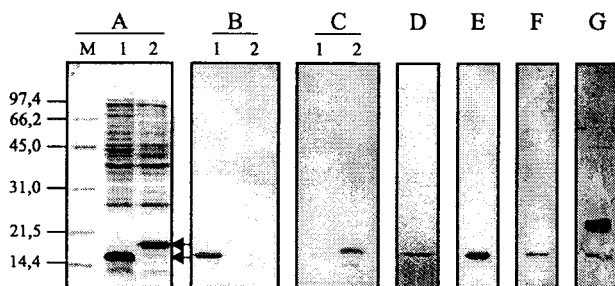
### 3.2.2.3. Obtención de anticuerpos y detección de proteínas por Western blot

La obtención de anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* se llevó a cabo como se describió en el apartado 2.2.6.1. El suero obtenido, al igual que el suero pre-inmune, se purificó mediante una cromatografía de afinidad a proteína A. Los anticuerpos contra la



proteína P de *E. coli* fueron proporcionados por el Dr. Sidney Altman (Yale University, EE.UU.) y se purificaron de la misma forma.

Para comprobar el reconocimiento de la proteína P por los anticuerpos generados y la especificidad de los mismos, se realizaron Western blots con extractos crudos de *E. coli* (pARA2) que sobreexpresaban la proteína P de *Synechocystis* y también con extractos crudos de *E. coli* (pARE7) que sobreexpresaban la proteína P. Usando anticuerpos contra las proteínas P de ambos organismos pudimos comprobar la ausencia de reacción cruzada significativa, aunque se apreciaba un reconocimiento débil de la proteína P de *E. coli* por los anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* (figura 22A, B y C).



**Figura 22. Análisis de la proteína P por Western blot.** (A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie mostrando en 1 un extracto crudo de *E. coli* (pARE7) sobreexpresando la proteína P de este organismo y en 2 un extracto crudo de *E. coli* (pARA2) sobreexpresando la misma proteína procedente de *Synechocystis*. Las flechas indican las posiciones de las proteínas P. (B) Western blot de un duplicado del gel que se muestra en A, utilizando anticuerpos contra la proteína P de *E. coli* en una dilución de 10.000 veces. (C) Western blot de un duplicado del gel que se muestra en A, utilizando anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* en una dilución de 1.000 veces. (D) Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie, mostrando 5 µg de la proteína P de *Synechocystis* purificada. (E) Western blot de una réplica del gel de D utilizando anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* en una dilución de 1.000 veces. (F) Western blot de un gel conteniendo 10 µg de un extracto crudo procedente de *Synechocystis*, utilizando los anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* en una dilución de 1.000 veces. (G) Western blot de un gel conteniendo 50 µg de un extracto crudo procedente de *Anabaena*., utilizando los anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* en una dilución de 1000 veces. La banda ancha de aproximadamente 20 kDa que aparece en el filtro se debe a reconocimiento inespecífico por los anticuerpos de las ficobiliproteínas del extracto, ya que éstas son muy abundantes en cianobacterias.

Dado que los anticuerpos contra la proteína P de *E. coli* no reconocían la proteína P de *Synechocystis*, comprobamos mediante Western blot que la proteína P de *Synechocystis* purificada en *E. coli* estaba libre de proteína P de *E. coli*. Los anticuerpos contra la proteína P de *E. coli* no reconocieron ninguna banda en la proteína P purificada de *Synechocystis* (no se muestra). Dado el nivel de sensibilidad del ensayo utilizado, estimamos que si hubiera contaminación por proteína P de *E. coli* superior al 0,5 %, la habríamos detectado.

Los anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* la reconocían una vez purificada en *E. coli* (figura 22D y E). También detectamos la proteína P en extractos crudos de *Synechocystis* usando los anticuerpos generados contra ella a partir de proteína purificada en *E. coli* (figura 22F), comprobándose que la proteína P de *Synechocystis* poseía el mismo peso molecular que la proteína P recombinante purificada desde *E. coli*. Quisimos ver además si el anticuerpo generado contra la proteína P de *Synechocystis* reconocía alguna proteína de tamaño similar de otra cianobacteria. Los anticuerpos generados contra la proteína P de *Synechocystis* reconocían, aunque débilmente, una banda del mismo peso molecular en extractos de *Anabaena* (figura 22G).

### 3.2.3. Caracterización funcional de la RNasa P de *Synechocystis*

#### 3.2.3.1. Efecto de la concentración de potasio y magnesio sobre la actividad RNasa P de *Synechocystis*

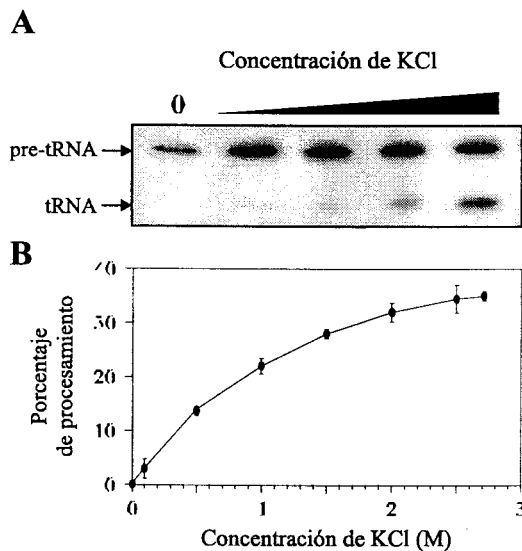
El primer paso en nuestro estudio de la RNasa P cianobacteriana fue determinar las condiciones óptimas para la maduración de pre-tRNAs por la enzima. Se analizó la influencia de variables como la temperatura, las sales presentes en el tampón de ensayo y la concentración de la proteína P. En esta tesis se muestran sólo aquellos resultados que presentaban diferencias con la RNasa P de otros organismos, habiéndose comprobado que la temperatura óptima de ensayo era de 37 °C y que el óptimo de actividad del RNA P en ausencia de proteínas se alcanzaba a una concentración de 100 mM de MgCl<sub>2</sub> (no mostrado).

Se ensayaron diferentes concentraciones de un catión monovalente (K<sup>+</sup>) y de uno divalente (Mg<sup>2+</sup>). El K<sup>+</sup> puede ser sustituido por otros cationes monovalentes, como el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, y por espermidina, dado que la función asignada a éstos es estabilizar la estructura

del RNA P. El requerimiento de este tipo de cationes es mayor para la reacción catalizada por el RNA P sin la proteína P, ya que la presencia de ésta favorece la interacción entre los dos RNAs (enzima y sustrato).

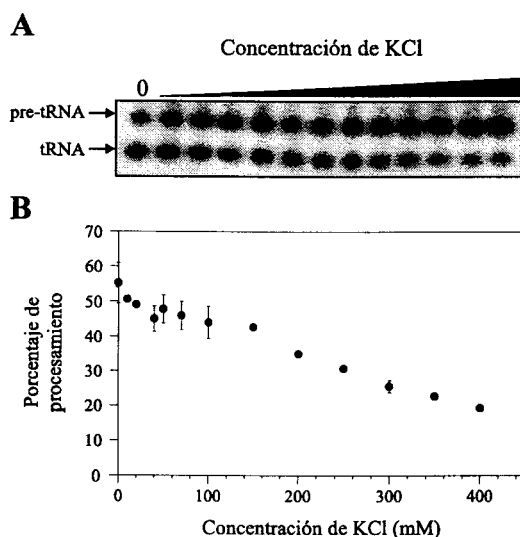
El  $Mg^{2+}$  ha sido implicado directamente en el mecanismo de reacción (para una revisión consultar Frank y Pace, 1998), siendo esencial para la actividad. Puede ser sustituido por  $Mn^{2+}$ , lo que provoca un descenso leve en la actividad, o por  $Ca^{2+}$ , con el que la actividad se reduce  $10^4$  veces. Los ensayos se realizaron utilizando como sustrato pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA procedente de *Synechocystis*.

La concentración de KCl a la que se alcanza la actividad máxima de los RNAs P de otros organismos varía desde 400 mM de *E. coli* (Guerrier-Takada *et al.*, 1983) hasta 2,5 M de *B. subtilis* (Gardinier 1985). Probamos una variación en la sal desde 0 hasta 2,7 M. La actividad del RNA P se incrementaba con la concentración de KCl, no alcanzándose el máximo de actividad a la concentración de KCl más alta ensayada (figura 23).



**Figura 23. Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad RNasa P del RNA P de *Synechocystis*.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo del RNA P. El sustrato utilizado es pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA uniformemente marcado con <sup>32</sup>P. El ensayo se realizó en tampón Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 100 mM y concentración variable de KCl. El ensayo se incubó durante 10 min y la concentración del RNA P fue 20 nM. (B) Actividad RNasa P en función de la concentración de KCl, deducido a partir de varios experimentos similares al mostrado en A.

Sin embargo, en presencia de la proteína P el KCl tiene un efecto inhibitorio desde la concentración más baja utilizada (figura 24). El mismo resultado se repitió con NH<sub>4</sub>Cl y acetato amónico (no mostrado), por lo que se descartó un efecto de inhibición específico del K<sup>+</sup> o del Cl<sup>-</sup>.

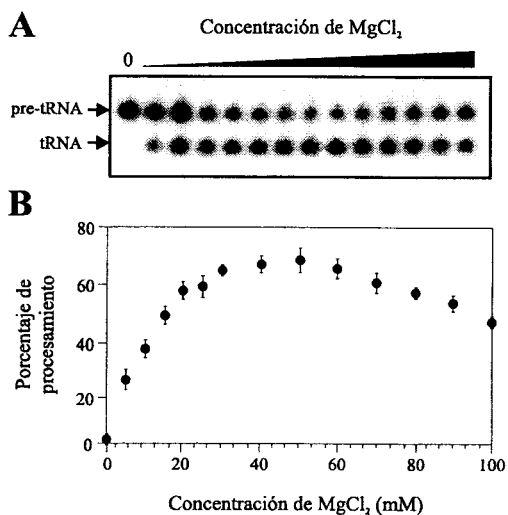


**Figura 24. Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad RNasa P de la holoenzima de *Synechocystis*.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo de la RNasa P. El sustrato utilizado es pre-tRNA<sup>Gln</sup> - CCA uniformemente marcado con <sup>32</sup>P. El ensayo se realizó en tampón Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM y concentración variable de KCl. El ensayo se incubó durante 30 min y la concentración del RNA P fue 20 nM. La proteína P se añadió en un exceso molar de 10 veces. (B) Actividad RNasa P en función de la concentración de KCl, deducido a partir de varios experimentos similares al mostrado en A.

La actividad de la holoenzima se ensayó con concentraciones de MgCl<sub>2</sub> entre 0 y 100 mM. El máximo de procesamiento del sustrato se encontró a una concentración de 50 mM (figura 25), superior a la necesaria para la holoenzima de otros organismos.

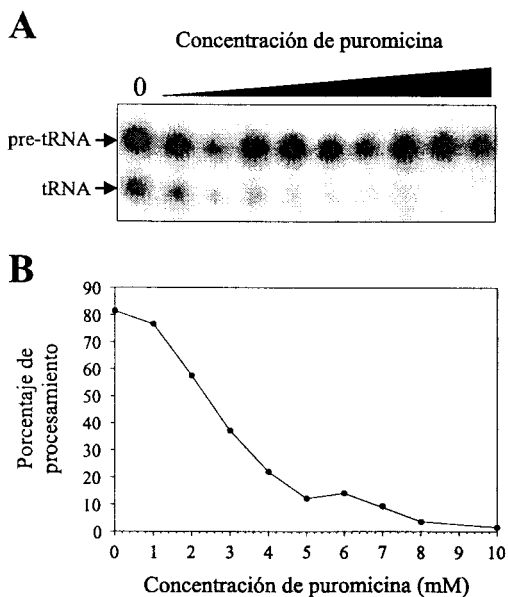
### 3.2.3.2. Efecto de la puromicina sobre la RNasa P de *Synechocystis*

La puromicina es un antibiótico que inhibe la síntesis de proteínas por su analogía estructural con el extremo 3' del peptidil-tRNA (Vázquez, 1997). La actividad RNasa P de *E. coli* es inhibida específicamente por el antibiótico puromicina (Vioque, 1989). Posteriores estudios han mostrado la inhibición de otras RNasas P por el mismo



**Figura 26. Efecto de la concentración de MgCl<sub>2</sub> sobre la actividad RNasa P de la holoenzima de *Synechocystis*.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo de la RNasa P. El sustrato utilizado es pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA uniformemente marcado con <sup>32</sup>P. El ensayo se realizó en tampón HEPES-KOH 20 mM, pH 8,0 y concentración variable de MgCl<sub>2</sub>. El ensayo se incubó durante 30 min y la concentración del RNA P fue 20 nM. La proteína P se añadió en un exceso molar de 10 veces. (B) Actividad RNasa P en función de la concentración de MgCl<sub>2</sub>, deducido a partir de varios experimentos similares al mostrado en A.

antibiótico (Potuschak *et al*, 1993 y True y Celander, 1996). El mecanismo de inhibición de la RNasa P es desconocido. El análisis de la inhibición de la actividad RNasa P de

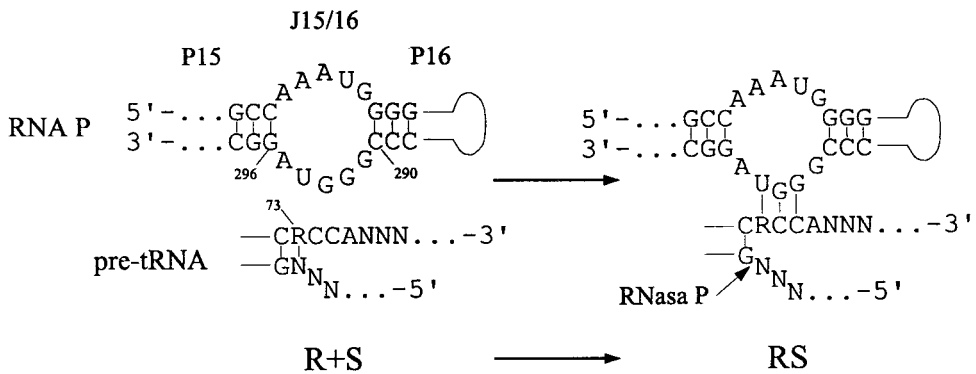


**Figura 25. Efecto de la puromicina en el procesamiento de pre-tRNA por el RNA P de *Synechocystis*.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo. El RNA P de *Synechocystis* se encontraba a una concentración 10 nM y el sustrato utilizado fue pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA. La incubación se realizó durante 30 min a 37 °C en presencia de HEPES-KOH 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM y 1 M KCl. (B) Cuantificación del gel mostrado en A. La concentración de los sustratos fue 100 veces inferior a la del RNA P. El sustrato estaba marcado uniformemente con <sup>32</sup>P.

*Synechocystis* por puromicina ha mostrado una inhibición similar a la observada en *E. coli*, consiguiéndose una inhibición del 50 % a una concentración de puromicina de aproximadamente 3 mM (figura 26).

### 3.2.4. Interacción RNA(enzima)-RNA(sustrato) en la RNasa P de cianobacterias

La secuencia RCCA presente en el extremo 3' de los tRNAs es esencial para la adición del aminoácido a este extremo por la aminoacil tRNA sintetasa. Esta secuencia se encuentra codificada en el genomio de algunas bacterias, como es el caso de *E. coli*, mientras que en otras se añade post-transcripcionalmente. Ha sido propuesto que esta secuencia tiene un papel importante en el reconocimiento de los pre-tRNAs por parte de la RNasa P bacteriana, esto ha sido descrito para la enzima de *E. coli* (Kirsebom y Svärd, 1994) y *T. thermophilus* (Hardt *et al.*, 1995). La secuencia RCCA es reconocida por una secuencia 5'GGU3' del RNA P de estos organismos situada en un lazo entre las hélices P15 y P16 denominado J15/16. Se ha propuesto que la interacción se produce por formación de pares de bases Watson-Crick (Kirsebom y Svärd, 1994) (figura 27) y parece estar implicada en como la enzima precisa el punto de corte en su sustrato, debido a que mutantes en la secuencia GGU del RNA P de *E. coli* presentan variaciones en el punto de corte (Kirsebom y Svärd, 1994).

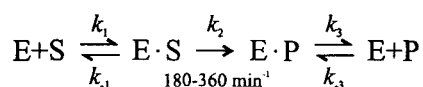


**Figura 27. Esquema de la interacción entre el RNA P y el extremo CCA-3' del pre-tRNA en *E. coli*. "R" ribozima, "S" sustrato. Tomado de Kirsebom y Svärd, 1994.**

Se ha descrito también que la presencia de la secuencia CCA en el extremo 3' del sustrato es responsable de la lenta liberación del producto, al tener éste mayor afinidad por al RNA P (Tallsjö y Kirsebom, 1993).

### 3.2.4.1. Estudio de la preferencia de sustrato de la RNasa P de *Synechocystis* en condiciones de recambio simple

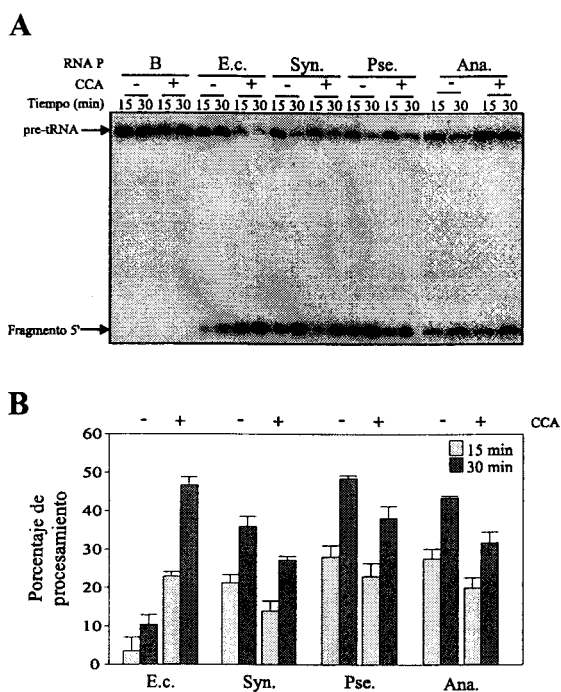
En *Synechocystis* los pre-tRNAs se sintetizan sin esta secuencia CCA-3' terminal, que es añadida en esta cianobacteria post-transcripcionalmente. La secuencia del RNA P encargado en *E. coli* de reconocer al extremo CCA-3' de los pre-tRNAs no se encuentra en la mayoría de los RNAs P de cianobacterias caracterizados hasta el momento (Banta *et al.*, 1992; Vioque, 1992; Vioque, 1997; Fingerhut y Schön, 1998 y Hess *et al.*, 1998). Hemos querido analizar el papel, si es que lo tiene, del CCA-3' en los sustratos sobre la actividad RNasa P de la holoenzima de *Synechocystis* o de su RNA P en ausencia de proteína. Para evitar el efecto de la lenta liberación del producto, en nuestros experimentos realizamos cinéticas de maduración de pre-tRNA, en presencia de exceso de enzima ( $[E] > 10[S]$ ), es decir, en condiciones de recambio simple. De esta manera la cinética de la reacción no se ve afectada por la constante de disociación del producto ( $k_3$ , figura 28).



**Figura 28. Esquema de la reacción llevada a cabo por la RNasa P.** Los valores de  $k_2$  hacen referencia a los calculados para *E. coli* (Smith y Pace, 1993) y *B. subtilis* (Beebe y Fierke, 1994), respectivamente.

Los RNAs P usados fueron los de *Synechocystis*, *Pseudanabaena* y *Anabaena*, así como el de *E. coli*, utilizado como control.

En la figura 29 se muestra que, como se esperaba, el RNA P de *E. coli* maduró mejor un sustrato que poseía la secuencia CCA en su extremo 3'. Sin embargo los RNAs P de las tres cianobacterias analizadas procesaron algo mejor el sustrato que carecía de la secuencia CCA-3'.

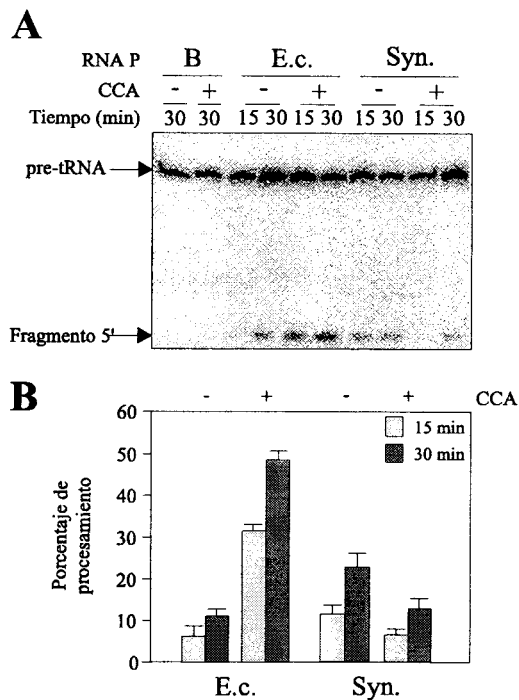


**Figura 29. Procesamiento de pre-tRNA<sup>Gln</sup> con (+) y sin (-) la secuencia CCA-3' por diversos RNAs P en condiciones de recambio simple.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo. 15 y 30 hacen referencia a los min de incubación del ensayo. "B" blanco; E.c., RNA P de *E. coli*; Syn., RNA P de *Synechocystis*; Pse., RNA P de *Pseudanabaena* y Ana., RNA P de *Anabaena*. El ensayo se realizó en Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 100 mM y KCl 1 M. (B) Cuantificación de tres experimentos independientes como los mostrados en A. Las concentraciones de los RNAs P fueron: *E. coli*, 0,5 nM; *Synechocystis*, 5 nM; *Pseudanabaena*, 5 nM y *Anabaena*, 2 nM. La concentración de los sustratos fue 100 veces inferior a la del RNA P. Los sustratos estaban marcados en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP.

Para comprobar que el resultado no era debido al sustrato elegido, repetimos el experimento con el pre-tRNA<sup>Glu</sup> con y sin la presencia de la secuencia CCA en su extremo 3'. Los resultados se muestran en la figura 30 y son equivalentes a los obtenidos con pre-tRNA<sup>Gln</sup>. Sólo se analizaron los RNAs P de *E. coli* y *Synechocystis*.

Se realizaron también cinéticas con la holoenzima completa, en condiciones de recambio simple, para comprobar que las velocidades de maduración observadas con el RNA P sólo no eran debidas a la ausencia de la proteína P. Los resultados del experimento se muestra en la figura 31. Las condiciones iónicas del experimento fueron las óptimas para cada enzima usada. De nuevo, los experimentos se realizaron sólo con los RNAs P de *E. coli* y *Synechocystis* y se confirmó que mientras, como está descrito, la



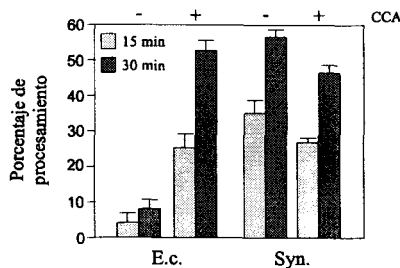


**Figura 30. Procesamiento de pre-tRNA<sup>Glu</sup> con (+) y sin (-) la secuencia CCA-3' por diversos RNAs P en condiciones de recambio simple.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo. 15 y 30 hacen referencia a los min de incubación del ensayo. "B" blanco; E.c., RNA P de *E. coli*; Syn., RNA P de *Synechocystis*; Pse., RNA P de *Pseudanabaena* y Ana., RNA P de *Anabaena*. El ensayo se realizó en de Heps-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 100 mM y KCl 1 M. (B) Cuantificación de tres experimentos independientes como los mostrados en A. Las concentraciones de los RNAs P fueron: *E. coli*, 0,5 nM y *Synechocystis*, 5 nM. La concentración de los sustratos fue 100 veces inferior a la del RNA P. Los sustratos estaban marcados en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP.

enzima de *E. coli* es significativamente más activa con el sustrato que contiene CCA-3', la enzima de *Synechocystis* tiene una ligera preferencia por el sustrato carente de CCA-3'.

#### 3.2.4.2. Caracterización del mutante PJ15/16 del RNA P de *Synechocystis*

Los resultados presentados en el apartado anterior sugieren que el extremo CCA-3' de los sustratos no es importante para la actividad RNasa P en cianobacterias, lo que está de acuerdo con el hecho de que el CCA-3' no está codificado en el genomio y con que el lazo J15/16 no suele contener la secuencia GGU en cianobacterias. Una excepción es precisamente el RNA P de *Synechocystis*, que sí tiene GGU en dicho lazo, aunque ambas



**Figura 31. Procesamiento de pre-tRNA<sup>Gln</sup> con (+) y sin (-) la secuencia CCA-3' por la RNasa P de *E. coli* y *Synechocystis* en condiciones de recambio simple.** 15 y 30 hacen referencia a los min de incubación del ensayo. "B" blanco; E.c., RNasa P de *E. coli* y Syn., RNasa P de *Synechocystis*. El ensayo se realizó en de Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 50 mM. Cuantificación de tres experimentos independiente. Las concentraciones de los RNAs P fueron: *E. coli*, 0,1 nM y *Synechocystis*, 2 nM. La proteína P se añadió en un exceso molar de 10 veces. La concentración de los sustratos fue 100 veces inferior a la del RNA P. Los sustratos estaban marcados en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP.

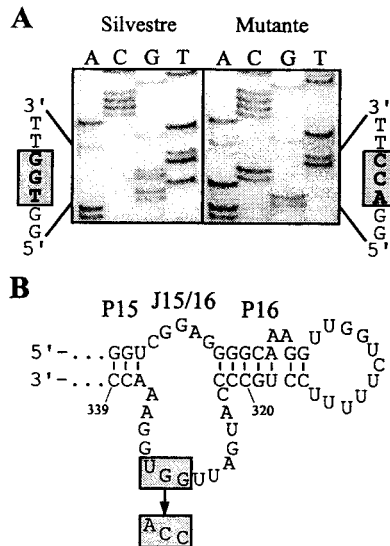
secuencias GGU no son equivalentes pues están en un diferente contexto estructural: el lazo J15/16 es mayor en *Synechocystis* que en *E. coli*.

Para analizar el papel de la secuencia G330G331U332 del RNA P de *Synechocystis* procedimos a modificarla mediante mutagénesis dirigida por la secuencia 5'CCA3'. Mutantes similares se han descrito en *E. coli* (Kirsebom y Svård, 1993).

#### 3.2.2.4.1. Mutagénesis dirigida del RNA P de *Synechocystis*

Se realizó según se describe en el apartado 2.3.2.12. con el oligonucleótido mutagénico 6803CCA (tabla 5). Como consecuencia de la mutación triple introducida por 6803CCA, se generó un sitio de restricción *Bst*NI. De 500 colonias obtenidas tras la segunda ronda de selección se analizaron 12 con la enzima de restricción *Bst*NI. De los 12 plásmidos analizados, 8 contenían el sitio *Bst*NI. Se procedió a secuenciar uno de ellos para comprobar el cambio de la secuencia, utilizando como cebador el oligonucleótido PRT1. La secuencia se muestra en la figura 32, en comparación con la secuencia obtenida desde el plásmido original que contenía el gen silvestre. Al plásmido conteniendo la versión mutante del gen se le denominó pT76803J15/16 y al RNA que se obtenía por transcripción *in vitro* desde este plásmido, RNA PJ15/16. El inserto de este plásmido se

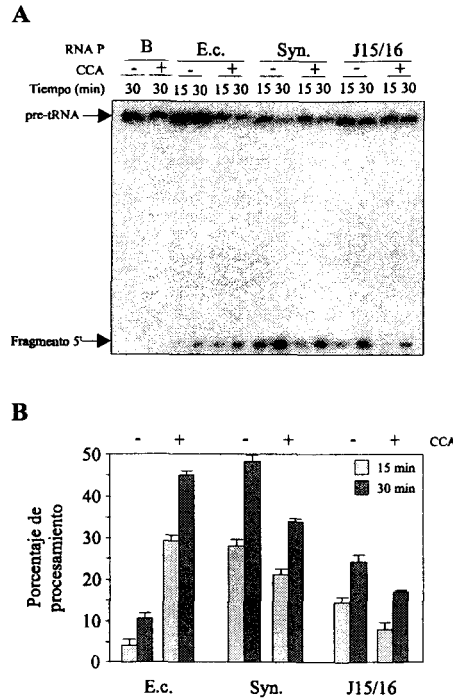
secuenció completamente para asegurar que no había mutaciones adicionales en el gen *rnpB*.



**Figura 32. Secuencia de nucleótidos del gen *rnpB* de *Synechocystis* silvestre y del mutante PJ15/16.** (A) Autorradiografías de un gel que muestra la secuencia de los RNAs P silvestre y mutante PJ15/16 de *Synechocystis*. En una caja y en negrita se marca la secuencia mutada. (B) Estructura secundaria de la región J15/16 del RNA P de *Synechocystis*. En una caja se muestra el cambio de secuencia provocado por la mutación introducida en el RNA PJ15/16.

#### 3.2.4.2.2. Actividad del RNA PJ15/16 en condiciones de recambio simple

Se realizaron ensayos con pre-tRNA<sup>Gln</sup>. La actividad del mutante fue aproximadamente la mitad de la detectada con el silvestre (figura 33), tanto con el pre-tRNA<sup>Gln</sup>+CCA como con el pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA, por lo que en el mutante se mantiene la preferencia por el sustrato sin CCA-3'. El mutante PJ15/16 no está afectado en la identificación del sitio de hidrólisis, pues el fragmento 5' generado tiene el mismo tamaño que el generado por la enzima silvestre.

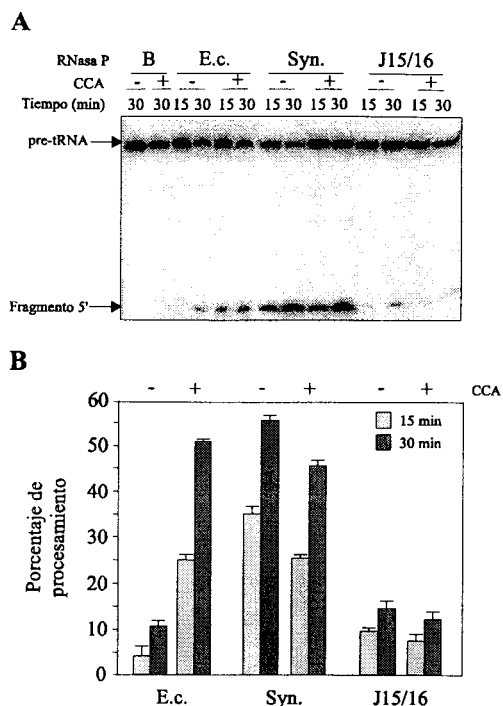


**Figura 33. Procesamiento de pre-tRNA<sup>Gln</sup> con (+) y sin (-) la secuencia CCA-3' por el RNA PJ15/16 en condiciones de recambio simple.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo. 15 y 30 hacen referencia a los min de incubación del ensayo. "B" blanco; E.c., RNA P de *E. coli*; Syn., RNA P de *Synechocystis* y J15/16, RNA PJ15/16 de *Synechocystis*. El ensayo se realizó en Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 100 mM y KCl 1 M. (B) Cuantificación de tres experimentos independientes como los mostrados en A. Las concentraciones de los RNAs P fueron: *E. coli*, 0,5 nM; *Synechocystis*, 5 nM; *Synechocystis* J15/16, 5 nM La concentración de los sustratos fue 100 veces inferior a la del RNA P. Los sustratos estaban marcados en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP.

### 3.2.4.2.3. Procesamiento por la RNasa P reconstituída con la subunidad RNA PJ15/16

El RNA PJ15/16 fue reconstituído con la proteína P de *Synechocystis* y se analizó su actividad sobre pre-tRNA<sup>Gln</sup> con y sin CCA-3' terminal. La actividad, en las condiciones ensayadas, era cinco veces inferior a la obtenida con la holoenzima silvestre, pero mantenía igual que el silvestre la actividad relativa sobre ambos sustratos (figura 34).

Para ver si la deficiencia en actividad observada en la holoenzima reconstituída con el RNA PJ15/16 era debida a un mala reconstitución de este RNA con la proteína P, realizamos el mismo ensayo con concentraciones crecientes de proteína. La actividad se



**Figura 34. Procesamiento por la holoenzima conteniendo el RNA PJ15/16.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo. 15 y 30 hacen referencia a los min de incubación del ensayo. “B” blanco; E.c., RNasa P de *E. coli*; Syn., RNasa P de *Synechocystis* y J15/16 RNasa P reconstituida con le mutante J15/16. El ensayo se realizó en de Hapes-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 50 mM. (B) Cuantificación de tres experimentos independientes como los mostrados en A. Las concentraciones de los RNAs P fueron: *E. coli*, 0,1 nM; *Synechocystis* silvestre 2 nM y *Synechocystis* mutante J15/16 2 nM. La proteína P se añadió en un exceso molar de 10 veces. La concentración de los sustratos fue 100 veces inferior a la del RNA P. Los sustratos estaban marcados en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP.

incremento con el aumento de la concentración de proteína hasta alcanzar, con un exceso de 50 veces de proteína P, aproximadamente la mitad de la actividad del silvestre, que era la tasa alcanzada por el RNA PJ15/16 cuando medíamos la actividad sin la proteína P (no mostrado). La actividad del RNA P silvestre no se afectaba por incrementos en la concentración de la proteína P por encima de un exceso molar de 10 veces (figura 21). Por tanto, parece probable que el RNA PJ15/16 es parcialmente defectivo en la interacción con la proteína P.

### 3.2.4.3. Determinación de la $K_m$ y $V_{max}$ de los RNAs P de *E. coli*, *Synechocystis* y del RNA PJ15/16.

En *E. coli* la delección en un sustrato de la secuencia 3' terminal CCA provoca un cambio en los parámetros cinéticos de la enzima, determinados en condiciones de recambio múltiple. Estos experimentos fueron realizados con un sustrato del mismo organismo (precursor de tRNA<sup>Gly</sup>) y han sido realizados también con el RNA P de *Thermus thermophilus* con un sustrato del mismo organismo (pre-tRNA<sup>Gly</sup>, Hardt *et al.*, 1994). Se han determinado los parámetros cinéticos del RNA P de *Synechocystis* silvestre y del mutante PJ15/16 utilizando como sustrato pre-tRNA<sup>Gln</sup>. Las mismas determinaciones se han realizado con el RNA P de *E. coli* como control. La tabla 7 presenta todos los datos obtenidos. Los resultados obtenidos con el RNA P de *E. coli* están de acuerdo con lo previamente descrito. La  $K_m$  para el sustrato con CCA-3' es significativamente más baja que para el sustrato sin CCA-3', pero la  $k_{cat}$  es menor por el sustrato con CCA-3' debido a la lentitud en la liberación del producto. En cualquier caso, la eficiencia catalítica global ( $k_{cat}/K_m$ ) es mayor para el sustrato con CCA-3', de acuerdo con los obtenidos en condiciones de recambio simple.

El RNA P de *Synechocystis*, tanto silvestre como el mutante PJ15/16 se comporta de forma opuesta. La  $K_m$  y la  $k_{cat}$  para el sustrato sin CCA-3' es menor que por el sustrato con CCA-3', resultando en una eficiencia catalítica ligeramente mayor por el sustrato sin CCA-3'.

**Tabla 7. Parámetros cinéticos determinados bajo condiciones de recambio múltiple**

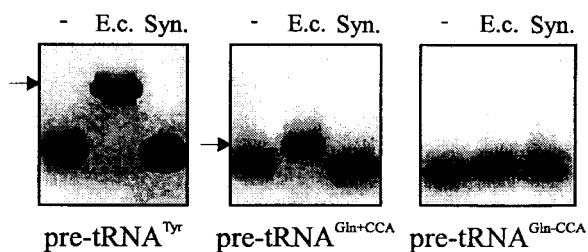
RNA P	Sustrato	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1}/\text{nM}$ )
E. coli	pre-tRNA <sup>Gln</sup> +CCA	$0,13 \pm 0,05$	$0,003 \pm 0,0002$	23
	pre-tRNA <sup>Gln</sup> -CCA	$3,0 \pm 0,27$	$0,039 \pm 0,0020$	13
<i>Synechocystis</i> silvestre	pre-tRNA <sup>Gln</sup> +CCA	$350,6 \pm 2,1$	$0,812 \pm 0,012$	2,2
	pre-tRNA <sup>Gln</sup> -CCA	$2,9 \pm 0,25$	$0,008 \pm 0,002$	3
<i>Synechocystis</i> PJ15/16	pre-tRNA <sup>Gln</sup> +CCA	$126,5 \pm 1,6$	$0,060 \pm 0,005$	0,5
	pre-tRNA <sup>Gln</sup> -CCA	$2,7 \pm 0,45$	$0,004 \pm 0,002$	1,5

La  $K_m$  y la  $k_{cat}$  se determinaron como se describe en Materiales y Métodos. Los ensayos se realizaron en tampón Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 100 mM y KCl 1 M con pre-tRNA<sup>Gln</sup> uniformemente marcado con <sup>32</sup>P.

La mutación de PJ15/16 no afecta significativamente la  $K_m$  o la  $k_{cat}$  para el sustrato sin CCA-3', pero reduce más de 10 veces la  $k_{cat}$  para el sustrato con CCA-3'.

#### 3.2.4.4. Interacción RNA-RNA analiza mediante retardo en gel

Analizamos la interacción RNA-RNA mediante la técnica de retardo en gel descrita previamente (2.4.4.1.), el RNA P de *E. coli* producía un retardo del pre-tRNA<sup>Tyr</sup> así como del pre-tRNA<sup>Gln</sup>+CCA pero no del pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA (figura 35). El RNA P de *Synechocystis* no retardó ninguno de los sustratos empleados. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que el RNA P de *E. coli* tiene mayor afinidad por el sustrato con CCA-3' que sin CCA-3'. En el caso de *Synechocystis* la afinidad por ninguno de los dos sustratos es lo suficientemente alta para ser detectada por este ensayo. Estos datos concuerdan con los valores de  $K_m$  obtenidos (tabla 7). Como control de nuestro ensayo de retardo se calculó mediante este método la constante de disociación del RNA P de *E. coli* y pre-tRNA<sup>Tyr</sup>. Se obtuvo un valor de 4 mM, similar al valor de 10 mM obtenido con pre-tRNA<sup>Gly</sup> (Hardt *et al.*, 1995) (no mostrado).

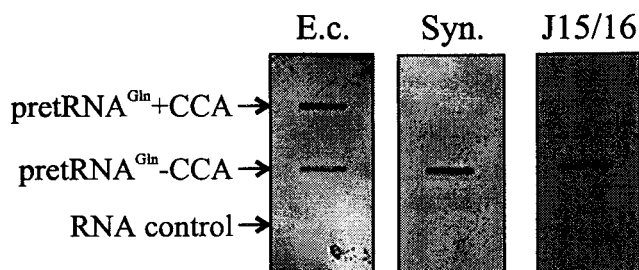


**Figura 35. Análisis de la afinidad RNA P-pre-tRNA mediante ensayo de retardo en gel.** Los RNAs P (500 nM) se incubaron con los pre-tRNAs indicados, marcados uniformemente con <sup>32</sup>P, y se separaron en un gel no desnaturalizante como se describe en Materiales y Métodos (2.4.4.1.). “-” Control sin RNA P; E.c., RNA P de *E. coli* y Syn. RNA P de *Synechocystis*. Las flechas señalan los complejos RNA P-pre-tRNA.

#### 3.2.4.5. Interacción RNA-RNA analizada mediante interacción en filtro

Debido a que fuimos incapaces de detectar la interacción de los pre-tRNA con el RNA P de *Synechocystis* mediante retardo en gel, desarrollamos un nuevo método en el cual el pre-tRNA<sup>Gln</sup> fijado a una membrana se incubaba con el RNA P marcado radioactivamente

en las condiciones en las que ambos RNAs interactúan para reconstituir la actividad. Mediante esta técnica observamos una mayor afinidad en el caso del RNA P de *E. coli* por pre-tRNA<sup>Gln</sup>+CCA (figura 36). El RNA P de *Synechocystis*, sin embargo, reconocía mejor pre-tRNA<sup>Gln</sup>+CAA (figura 36). El RNA PJ15/16 se comportaba igual que el RNA P silvestre.



**Figura 36. Análisis de la afinidad RNA P-pre-tRNA mediante ensayo de interacción en filtro.** Interacción del RNA P de *E. coli* (E.c.), *Synechocystis* (Syn.) y el RNA PJ15/16 (J15/16) con pre-tRNA<sup>Gln</sup> (100 pmoles) conteniendo o careciendo de CCA-3'. El RNA control era RNA P de *Synechocystis*. El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos (2.4.4.2).

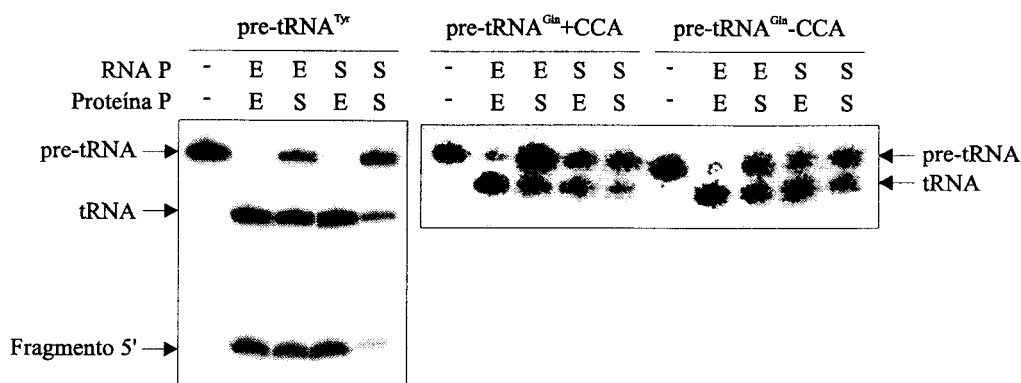
### 3.2.5. Reconstitución de la actividad RNasa P con subunidades de diferentes organismos

Estudios previos con la RNasa P de otros organismos habían demostrado que el RNA P de una bacteria puede reconstituir la actividad con la proteína P procedente de otra bacteria diferente. Para estudiar si las subunidades de la enzima de *E. coli* y *Synechocystis* eran intercambiables analizamos la actividad de las dos combinaciones heterólogas posibles, RNA P de *E. coli* y proteína P de *Synechocystis* y RNA P de este último y proteína P de *E. coli*. Para ello utilizamos las proteínas P purificadas de ambos organismos así como los RNAs P transcritos *in vitro*. Los sustratos utilizados fueron pre-tRNA<sup>Tyr</sup> de *E. coli*, pre-tRNA<sup>Gln</sup> procedente de *Synechocystis* y el precursor del RNA 4.5S *E. coli*.



3.2.5.1. Actividad RNasa P sobre pre-tRNAs

Con todas las combinaciones utilizadas se pudo reconstituir la actividad, como se muestra en la figura 37. El uso de un sustrato proveniente de *E. coli* dio más actividad en aquellas combinaciones que poseían la proteína P de esta bacteria. Sin embargo, en presencia de la proteína P de *Synechocystis* la actividad era mayor sobre el sustrato procedente de este organismo. Todos estos ensayos se realizaron en condiciones óptimas para la holoenzima de *E. coli*, lo que podría explicar que la combinación proteína P de *E. coli*-RNA P de *Synechocystis* poseía con ambos sustratos una actividad mayor que con la combinación proteína P de *Synechocystis*-RNA P de *Synechocystis*.

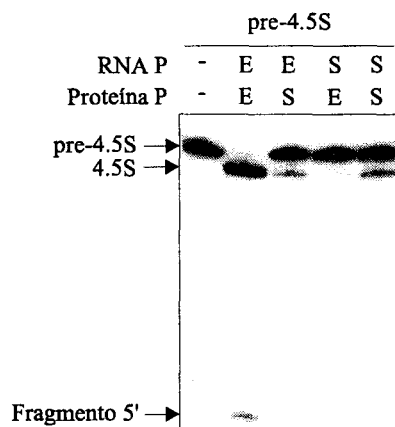


**Figura 37. Actividad RNasa P con diferentes combinaciones de subunidades.** Autorradiografía de geles de ensayo donde se muestra la actividad de la RNasa P reconstituida con subunidades de *E. coli* (E) o *Synechocystis* (S). El ensayo se realizó en presencia de Hepes-KOH 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y KCl 100 mM. La incubación se realizó durante 30 min. Las concentraciones de los RNA P fueron, *E. coli* 1 nM y *Synechocystis* 10 nM. La proteína P se encontraba en un exceso molar de 10 veces. El sustrato se encontraba una concentración 100 veces menor que el RNA P.

3.2.5.2. Actividad RNasa P sobre el precursor del RNA 4.5S de *E. coli*

El precursor del RNA 4.5S de *E. coli*, sustrato natural de la enzima, se había estudiado *in vitro* con subunidades de *E. coli* y de *B. subtilis*, mostrándose la ausencia de actividad en las reconstituciones heterólogas (Guerrier-Takada, 1983). Ensayos de actividad con las subunidades de *Synechocystis* y *E. coli* dieron actividad en todas las combinaciones

posibles (figura 38). La actividad de maduración de este sustrato presentó diferencias con respecto a la maduración de pre-tRNAs. Así, la reconstitución entre la proteína P de *E. coli* y el RNA P de *Synechocystis* poseía una actividad menor que la holoenzima de *Synechocystis*, justo al contrario de lo observado con pre-tRNAs. Esto es interesante debido a que los experimentos se llevaron a cabo en las condiciones de ensayo de la holoenzima de *E. coli* y el sustrato, RNA pre-4.5S, procede de ese mismo organismo.



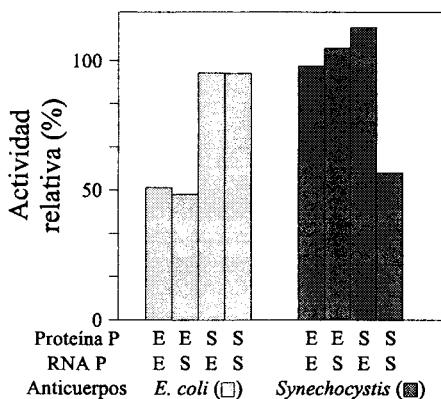
**Figura 38. Actividad RNasa P usando el RNA pre-4.5 S como sustrato.** Autorradiografía de geles de ensayo donde se muestra la actividad de la RNasa P reconstituida con subunidades de *E. coli* (E) o *Synechocystis* (S). El ensayo se realizó en presencia de Hepes-KOH 20 mM,  $MgCl_2$  10 mM y KCl 100 mM. La incubación se realizó durante 30 min. Las concentraciones de los RNA P fueron, *E. coli* 1 nM y *Synechocystis* 10 nM. La proteína P se encontraba en un exceso molar de 10 veces. El sustrato se encontraba una concentración 100 veces menor que el RNA P.

### 3.2.5.3. Inmunoprecipitación de RNasa P conteniendo diferentes subunidades proteicas

RNasa P reconstituída con subunidades de *E. coli* y *Synechocystis* fueron incubadas tanto con anticuerpos generados contra la proteína P de *E. coli* como contra la de *Synechocystis* y se determinó si los anticuerpos inmunoprecipitaban la actividad.

Anticuerpos contra la proteína P de *E. coli* no inmunoprecipitan la actividad RNasa P reconstituida con la proteína P de *Synechocystis*, mientras que sí inmunoprecipitan la actividad RNasa P reconstituida con la proteína P de *E. coli* (figura 39). Un resultado complementario fue obtenido usando anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis*.

Estos anticuerpos no inmunoprecipitan la actividad RNasa P reconstituida con la proteína P de *E. coli*, pero inmunoprecipitan significativamente la actividad RNasa P reconstituida con la proteína P y el RNA P de *Synechocystis*. Cuando se reconstituyó la actividad RNasa P con el RNA P de *E. coli* y la proteína P de *Synechocystis* no se observó inmunoprecipitación de la actividad con anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* (figura 39), sin embargo, cuando el anticuerpo se añadió antes de añadir el RNA P si se observó una inmunoprecipitación de la actividad (no mostrado). Este resultado sugiere que la unión de la proteína P de *Synechocystis* al RNA P de *E. coli* protege a la proteína P contra los anticuerpos, mientras que la unión al RNA P de *Synechocystis* no lo hace.

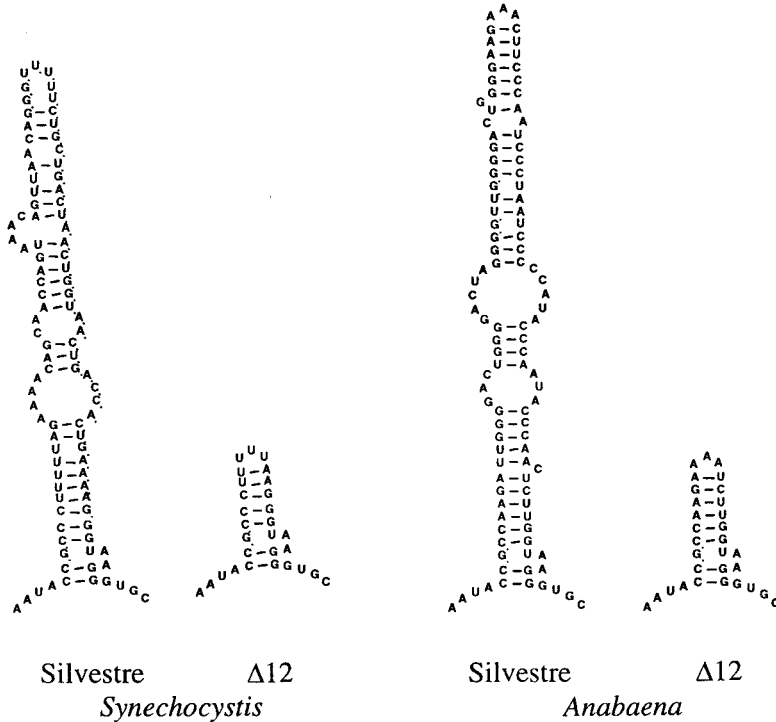


**Figura 39. Inmunoprecipitación de la actividad RNasa P.** RNasa P reconstituida con proteína P o RNA P de *E. coli* (E) o *Synechocystis* (S) según se indica, se incubó durante 2 h en presencia de anticuerpos conjugados a proteína A-sepharosa contra la proteína P de *E. coli* (barras claras) o *Synechocystis* (barras oscuras) como se describe en Materiales y Métodos (2.5.). Se ensayó la actividad RNasa P de alícuotas del sobrenadante, usando pre-tRNA<sup>Tyr</sup> como sustrato. La actividad se expresa como el porcentaje de la actividad obtenida cuando la inmunoprecipitación fue realizada con anticuerpos preinmunes en las mismas condiciones. Se muestra el resultado de un experimento tipo. Se obtuvieron resultados similares cambiando el tiempo de incubación con los anticuerpos o cuando se cambió la cantidad de anticuerpos.

### 3.2.5.3. Interacción RNA P-Proteína P analizada mediante retardo en gel

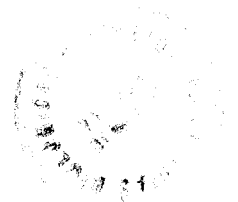
Se estudió, mediante la técnica de retardo en gel (2.4.2.1.) la interacción entre la proteína P de *Synechocystis* y los RNAs P de *Synechocystis*, *Anabaena*, *E. coli* y dos mutantes de los RNAs P de *Synechocystis* y *Anabaena*. Estos mutantes tienen una

delección de parte de la hélice P12 (figura 40), que contiene en algunas cianobacterias repeticiones directas cortas. El uso de estos RNA P mutados nos permitió conocer si esta secuencia afectaba o no a la unión con la proteína. En experimentos anteriores de nuestro grupo se había determinado que la delección de esta hélice no afectaba a la actividad del RNA P sólo o de la holoenzima (Vioque, 1997).



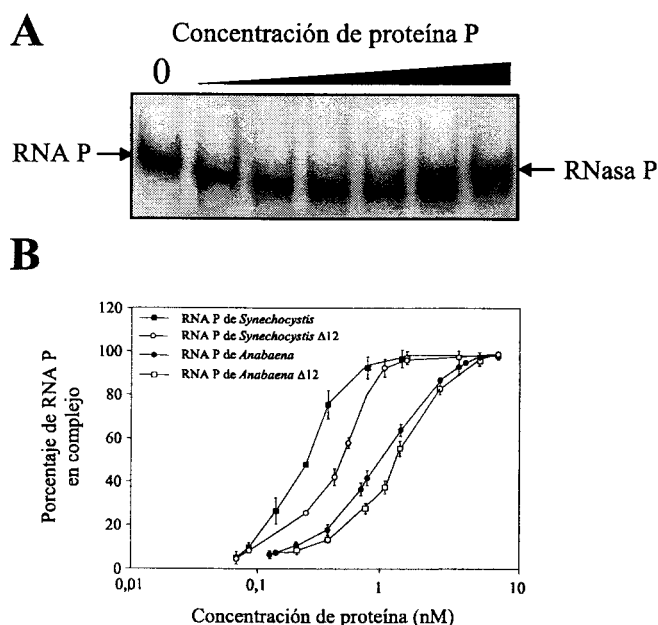
**Figura 40. Estructura secundaria de los RNAs P de *Synechocystis* y *Anabaena*, y de los mutantes de estos RNAs P en la hélice P12 (Vioque, 1997).**

Los resultados de la interacción se muestran en la figura 41. Cuantificando geles similares al mostrado en la figura se calcularon las curvas de disociación y a partir de ellas las constantes de disociación ( $k_d$ ). La constante de disociación calculada para la reconstitución homóloga de la RNasa P de *Synechocystis* (0,12 nM) fue similar a la descrita para *E. coli* (0,4 nM) (Talbot y Altman, 1994). Para la reconstitución heteróloga con el RNA P de *Anabaena*, la constante fue ligeramente mayor (0,8 nM), mientras que



fue imposible calcular la  $k_d$  para la interacción con el RNA P de *E. coli*, debido a que la proteína a las concentraciones necesarias agregaba el RNA inespecíficamente, permaneciendo las muestras en los pocillos.

La delección de la hélice P12 no parecía causar ningún efecto significativo sobre la interacción RNA P-proteína P en ninguna de las cianobacterias analizadas, obteniéndose una  $k_d$  de 0,25 nM para la mutación de la hélice en el RNA P de *Synechocystis* y de 1,1 nM para el RNA P mutante de *Anabaena*.



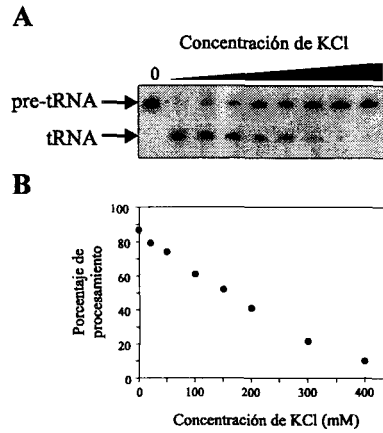
**Figura 41. Análisis de la interacción RNA P-Proteína P mediante ensayo de retardo en gel.** (A) Autorradiografía de un gel de poliacrilamida representativo de un experimento tipo. (B) Representación de la aparición del complejo RNA P-proteína P en función de la concentración de proteína. El RNA se encontraba a una concentración de 0,1 nM en todos los ensayos.

### 3.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD RNasa P DEL CIANELO DE *C. paradoxa*

#### 3.3.1. Actividad RNasa P en extractos crudos de cianelo de *C. paradoxa*

Extractos de cianelo de este organismo, obtenidos según se ha descrito (2.2.2.3.), se ensayaron en presencia de diferentes concentraciones de KCl, para encontrar la concentración a la que la RNasa P de este orgánulo posee el máximo de actividad. El

resultado se muestra en la figura 42, apreciándose que el comportamiento de la enzima es similar a la de *Synechocystis* (3.2.3).



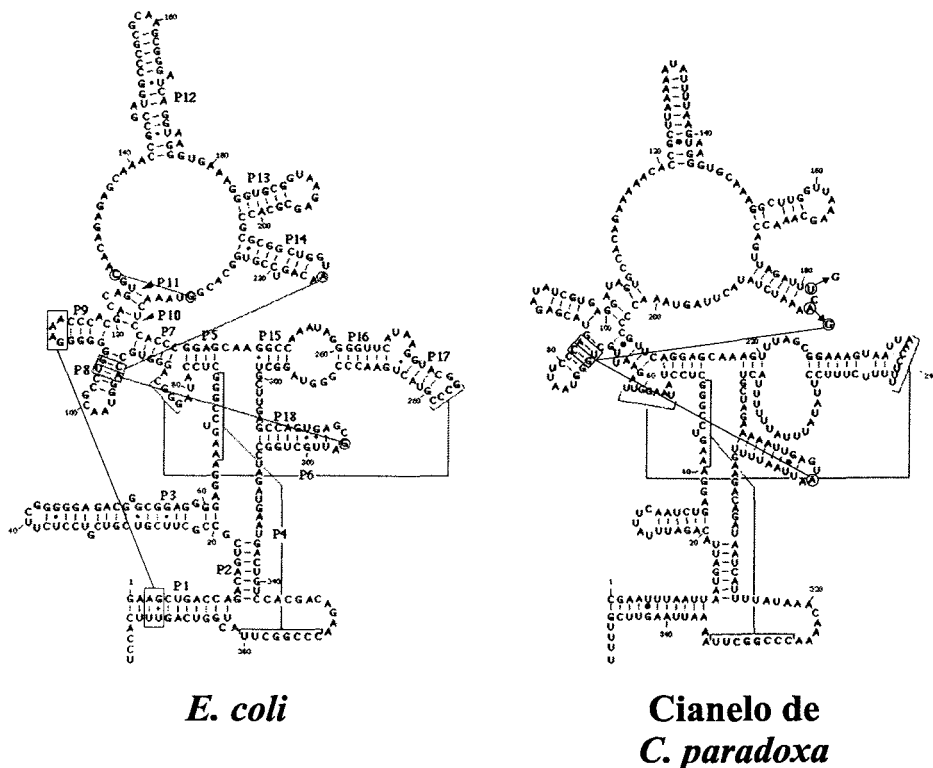
**Figura 42. Efecto de la concentración de KCl sobre la actividad RNasa P del cianelo de *C. paradoxa*.** (A) Autorradiografía de un gel de ensayo de la RNasa P. El sustrato utilizado es pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA uniformemente marcado con <sup>32</sup>P. El ensayo se realizó en tampón Hepes-KOH 20 mM, pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mM y concentración variable de KCl. El ensayo se incubó durante 30 min y se ensayaron 2 µg de extracto crudo preparado como se describió (2.2.2.3.). (B) Actividad RNasa P en función de la concentración de KCl, deducido a partir del experimento mostrado en A.

### 3.3.2. Mutagénesis del RNA P de *C. paradoxa*

El RNA P del cianelo de *C. paradoxa* no posee actividad catalítica en ausencia de proteína (Baum *et al.*, 1996 y esta Tesis). La estructura del RNA P del cianelo es similar a la del RNA P consenso bacteriano, pero posee algunas diferencias que en algunos casos pueden ser explicadas por el alto contenido en AT del genomio del cianelo (Herdman y Stanier, 1977). Los cambios más evidentes en cuanto al consenso son el par de bases C-G conservado dentro de la hélice P5 que aparece como A-U y la G22 conservada en todos los RNAs P bacterianos que ha cambiado a A. Aparte de estos cambios en la secuencia, el RNA P del cianelo es deficiente en una interacción terciaria entre la hélice P8 y el lazo L14 (Brown *et al.*, 1996). El lazo L14 presenta en bacterias un tetraloop GNRA que se postula interactúa con la hélice P8. En el RNA P del cianelo se encuentra en el lazo L14 la secuencia UCAA. En un intento de restablecer la actividad catalítica del RNA P del cianelo, en ausencia de proteínas, hemos mutado en este RNA la secuencia UCAA por

GCGA mediante mutagénesis dirigida (figura 43). Con esta mutación se restaura teóricamente la interacción entre L14 y P8, conforme a las reglas establecidas para esta interacción (Brown *et al.*, 1996).

El RNA P mutante (U184G/A186G) carecía de actividad RNasa P en todas las condiciones probadas (no mostrado).

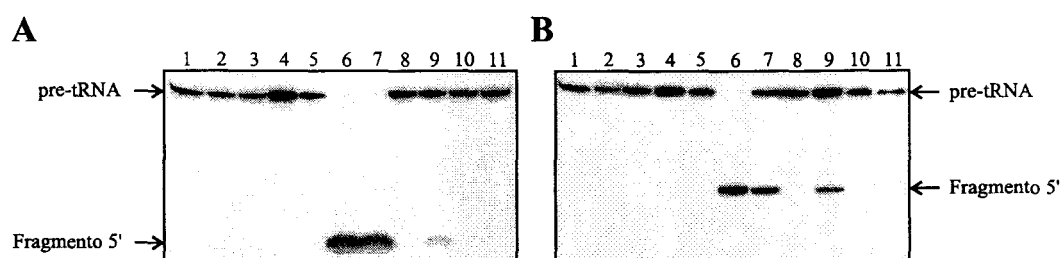


**Figura 43. Modelos de estructura secundaria de los RNAs P de *E. coli* y del cianoelo de *C. paradoxa*.** Interacciones terciarias y pseudonudos se muestran como líneas que conectan las regiones que interactúan. En la estructura del RNA P del cianoelo se muestran los nucleótidos sustituidos en el lazo L14 para la generación del mutante U184G/A186G. Las estructuras están adaptadas de la base de datos de la RNasa P (Brown, 1998).

### 3.3.3. Reconstitución de la actividad RNasa P entre subunidades de *Synechocystis* y del cianoelo de *C. paradoxa*

El RNA P del cianoelo, preparado mediante transcripción *in vitro*, fue incubado en presencia de diferentes concentraciones de proteína P procedente de *Synechocystis*. En ninguna condición de ensayo se apreció actividad cuando los ensayos se realizaron en

presencia de Hepes-KOH 20 mM, pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 10 mM y con o sin KCl a diferentes concentraciones. Sin embargo, utilizando las condiciones óptimas de la holoenzima de *Synechocystis* (MgCl<sub>2</sub> 50 mM y sin KCl) se apreció actividad en la reconstitución entre las subunidades de los dos organismos (figura 33). Sin embargo, con este sustrato, fue imposible obtener actividad utilizando la proteína P de *E. coli* en sustitución de la de *Synechocystis*. Dado que la reconstitución de la proteína P de *E. coli* con el RNA P del cianelo de *C. paradoxa* carecía de actividad RNasa P, probamos con un sustrato de *E. coli*, pre-tRNA<sup>Tyr</sup>, utilizando la reconstitución con la proteína P de *Synechocystis* como control. De nuevo, sólo apreciamos actividad RNasa P en la reconstitución proteína P de *Synechocystis*-RNA P del cianelo de *C. paradoxa*. El resultado se muestra en la figura 44. Intentamos reconstituir también la actividad RNasa P con la subunidad RNA P del cianelo mutante (U184G/A186G) y la proteína P de *Synechocystis*. El RNA P mutante carecía de actividad con la proteína P de *Synechocystis* en todas las condiciones probadas (no mostrado).



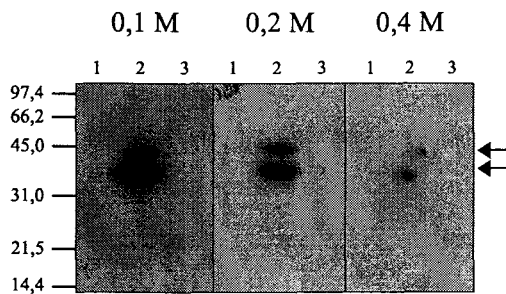
**Figura 44. Actividad de la enzima reconstituida a partir de la proteína P de *Synechocystis* y el RNA P del cianelo de *Cyanophora paradoxa*.** (A) Ensayo RNasa P utilizando pre-tRNA<sup>Gln</sup> de *Synechocystis* como sustrato. (B) Ensayo RNasa P utilizando pre-tRNA<sup>Tyr</sup> de *E. coli* como sustrato. 1. Proteína P de *E. coli* (1 μM); 2. Proteína P de *Synechocystis* (1 μM); 3. RNA P de *Synechocystis* (5 nM); 4. RNA P del cianelo de *Cyanophora paradoxa* (200 nM); 5. RNA P14 del cianelo de *Cyanophora paradoxa* (200 nM); 6. RNA P de *Synechocystis* (5 nM) y proteína P de *E. coli* (50 nM); 7. RNA P de *Synechocystis* (5 nM) y proteína P de *Synechocystis* (50 nM); 8. RNA P del cianelo de *Cyanophora paradoxa* (200 nM) y proteína P de *E. coli* (1 μM); 9. RNA P del cianelo de *Cyanophora paradoxa* (200 nM) y proteína P de *Synechocystis* (1 μM); 10. RNA P14 del cianelo de *Cyanophora paradoxa* (200 nM) y proteína P de *E. coli* (1 μM); 11. RNA P14 del cianelo de *Cyanophora paradoxa* (200 nM) y proteína P de *Synechocystis* (1 μM). El ensayo se realizó a 37 °C durante 2 h.



### 3.3.4. Identificación de una proteína de *C. paradoxa* con alta afinidad por el RNA P de *C. paradoxa* mediante la técnica de Northwestern

Utilizando la técnica de Northwestern descrita en Materiales y Métodos (2.4.5.2.) intentamos identificar alguna proteína en extractos crudos del cianelo de *C. paradoxa*. RNA P de *C. paradoxa* marcado radiativamente fue usado como sonda sobre membranas que contenían extractos del cianelo así como la proteína P purificada de *Synechocystis* y un extracto crudo de *E. coli*. La hibridación dió como resultado dos bandas específicas de peso molecular entre 35 y 45 kDa pertenecientes al extracto crudo del cianelo (figura 45). La hibridación se perdía lavando la membrana con NaCl 0,4 M, siendoeste hecho razonable con el comportamiento de la RNasa P del cianelo en presencia de cantidades crecientes de KCl.

No existía hibridación con el resto de las proteínas presentes en la membrana, ni siquiera con la proteína P de *Synechocystis*. Sin embargo el RNA P del cianelo reconoce esta proteína mediante esta misma técnica en condiciones de hibridación menos estrictas (no mostrado).



**Figura 45. Northwestern utilizando como sonda RNA P del cianelo de *C. paradoxa*.** Hibridación de tres membranas idénticas. 0,1 M; 0, 2 M y 0, 4 M indican las cantidades de NaCl con la que se lavó cada membrana respectivamente. 1. Extracto crudo de *E. coli* (25 µg). 2. Extracto crudo del cianelo de *C. paradoxa* (25 µg). 3. Proteína P purificada de *Synechocystis* (5 µg). Las flechas señalan las bandas de hibridación.

## **4. DISCUSIÓN**

#### 4. DISCUSIÓN

Las cianobacterias son un amplio grupo de eubacterias, caracterizado por realizar fotosíntesis oxigénica, que presenta una diversidad morfológica y fisiológica grande (Rippka *et al.*, 1979). Se habían descrito, antes del comienzo de esta tesis, cuatro RNAs P procedentes de cianobacterias (Banta *et al.*, 1992 y Vioque, 1992), encuadradas en tres diferentes ramas evolutivas de este grupo y con características morfológicas diferentes. La caracterización del RNA P de *Pseudanabaena*, una cianobacteria filamentosa no formadora de heterocistos y representativa de una de las ramas más antiguas en la evolución de este grupo, según se estableció en función de el análisis de la secuencia de rRNA (Giovannoni *et al.*, 1988), aumentó nuestro conocimiento sobre la diversidad de los RNAs P cianobacterianos. La estructura secundaria propuesta para este RNA P (apéndice 1) es muy similar a la descrita para otros RNAs P bacterianos, pero presenta sin embargo algunas peculiaridades. La hélice P1, comprendida entre los nucleótidos 22 y 71, es más larga en *Pseudanabaena* que otras cianobacterias. La hélice P12 (posiciones 156-179) es corta en comparación con *Synechocystis* (apéndice 1), *Anabaena* y *Calothrix*. En estas estirpes esta hélice es muy larga y en *Anabaena* y *Calothrix* contiene secuencias repetidas (Vioque, 1992). En este aspecto, *Pseudanabaena* y *Anacystis* son más parecidas al consenso eubacteriano. Una de las características diferenciales es la presencia de la hélice 300-345, que no tenía homóloga en las bacterias analizadas hasta ese momento. Esta hélice se encuentra en una zona considerada crítica para el reconocimiento de sustrato en *E. coli*.

Análisis de la secuencia de los RNAs P de otras cianobacterias han confirmado los datos de estos estudios preliminares (Vioque, 1997). Así, la hélice P12 (en *Pseudanabaena* situada entre los nucleótidos 156 y 179) presenta secuencias repetidas en las cianobacterias formadoras de heterocistos y se ha demostrado que su delección (respetando una secuencia conservada previa a las repeticiones) no afecta a la actividad del RNA P ni de la holoenzima (Vioque, 1997). Además, por estudios presentados en esta tesis sabemos que la hélice P12 no está implicada en el reconocimiento de la proteína P, no pudiéndose descartar que las repeticiones posean un papel en el reconocimiento de un hipotético sustrato de la RNasa P específico de cianobacterias formadoras de heterocistos.

La hélice P19 (posiciones 300-345) de *Pseudanabaena* se presenta también en otras dos cianobacterias, *Oscillatoria* sp. PCC 7515 (Vioque, 1997) y *Prochlorothrix hollandica* (Fingerhut y Schön, 1998). Además sólo en tres de los RNAs P de cianobacterias analizados hasta la fecha se encuentra una secuencia 5'-GGU-3' en el lazo J15/16. Además en los casos en los que se presenta el lazo que la contiene posee una estructura diferente al de *E. coli*. Los resultados de esta Tesis indican que, a diferencia de *E. coli*, la secuencia 5'GGU3' no funciona en la interacción con RCCA en el caso de que esta se presente como se describirá a continuación.

En esta Tesis describimos también la clonación del gen codificante de la proteína P de una cianobacteria. El gen codificante de la proteína P de *Synechocystis* sp. PCC 6803 fue aislado desde una genoteca en plásmido por su capacidad para complementar una mutación en la proteína P de *E. coli*. Este resultado indica claramente que las proteínas P de *E. coli* y *Synechocystis* son intercambiables funcionalmente *in vivo*. Esto ha sido confirmado por ensayos enzimáticos *in vitro*.

En todas las eubacterias analizadas hasta ahora, el gen *rnpA* se encuentra corriente abajo y ligado muy cerca al gen *rpmH*, que codifica la proteína ribosómica L34. En este sentido, la organización génica está conservada en *Synechocystis*. El gen *rnpA* comienza con un codón GTG nueve nucleótidos después del codón de parada del gen *rmpH*. El gen *rnpA* carece de sitio de unión al ribosoma, por lo que probablemente la proteína P es sintetizada por acoplamiento traduccional con la proteína L34. La carencia de un sitio de unión al ribosoma y el codón de inicio GTG sugieren una traducción ineficiente. En *E. coli*, que posee una organización genética similar, la cantidad de proteína P es muy baja, mientras la proteína L34 se acumula en grandes cantidades, como se esperaría para una proteína ribosómica. Algo similar podría ocurrir en *Synechocystis*. Para detectar la proteína en extractos crudos de *Synechocystis* con el anticuerpo correspondiente, es necesario cargar grandes cantidades de proteína y usar el anticuerpo a una dilución baja (figura 22E).

La región *rpmH-rnpA* se transcribe divergentemente del gen *dnaA* en muchas eubacterias. Excepto en *Enterobacteriaceae*, el origen de replicación del cromosoma (*oriC*), es cercano al gen *dnaA* (Ogasawara y Yoshikawa, 1992). Sin embargo, en *Synechocystis* el gen *dnaA* mapea en una región diferente del cromosoma (Richter y

Messer, 1995) y el *oriC* no se encuentra en esa región *dnaA*. Tres secuencias similares a cajas *dnaA* se localizan aguas arriba de *rpmH* y podrían ser parte del *oriC* de *Synechocystis*. Recientemente, se ha mutado el gen *dnaA* de *Synechocystis*, no observándose ningún efecto sobre la replicación (Messer *et al.*, 1998) por lo que el significado de las cajas *dnaA* es dudoso.

La proteína P de *Synechocystis* es muy rica en aminoácidos básicos (23,5 %) y tiene también regiones altamente hidrofóbicas, como la secuencia FQPQIKPGFDVVIIVLPQIG entre las posiciones 74 y 95. La presencia de estas regiones hidrofóbicas podría explicar su baja solubilidad en condiciones no desnaturalizantes y la dificultad encontrada en solubilizar la proteína una vez precipitada. Las interacciones hidrofóbicas son importantes en las interacciones RNA-proteína en la RNasa P de *E. coli* (Talbot y Altman, 1994), lo mismo podría ser cierto en *Synechocystis*.

Se ha determinado la estructura tridimensional de la proteína P de *B. subtilis* (Stams *et al.*, 1998). La estructura presenta una topología  $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$  y tres regiones de unión a RNA son evidentes, dos de las cuales son consistentes con los datos previos de mutagénesis y bioquímicos. La primera zona de unión al RNA posee un rasgo topológico inusual, una unión girada a la izquierda entre  $\beta_3$ - $\alpha_B$ - $\beta_4$ . La secuencia consenso de la proteína P de bacterias, RNRLKR, está contenida dentro de esta  $\alpha$  hélice y del lazo de unión. Una segunda zona de interacción con RNA es adjacente a la hélice B y forma una hendidura entre la  $\alpha$  hélice A y parte de la hoja plegada  $\beta$  central. Dentro de esta hendidura se encuentran tres residuos aromáticos (dos Phe y una Tyr), que han sido implicados en la unión al RNA P en la RNasa P de *E. coli* (Gopalan *et al.*, 1997). La proteína P de *Synechocystis* presenta una secuencia que puede ser plegada de en una estructura secundaria similar a la determinada para la proteína P de *B. subtilis*, según el algoritmo de predicción de estructura secundaria de Rost *et al.*, 1993.

La equivalencia funcional entre las proteínas P de *E. coli* y *Synechocystis* y el parecido en los perfiles de hidrofobicidad sugiere que ambas proteínas pueden contener estructuras similares e interactuar con la subunidad RNA de forma similar. Sin embargo, los detalles de la interacción de la proteína P de *Synechocystis* con los RNAs P de *E. coli* y *Synechocystis* deben ser diferentes como se sugiere por la diferente sensibilidad a la

inmunoprecipitación con anticuerpos contra la proteína P de *Synechocystis* de la RNasa P reconstituida con los RNAs P de *E. coli* o *Synechocystis*.

En esta tesis se describe la síntesis de nuevos sustratos pre-tRNAs de *Synechocystis* que nos permiten el estudio de la actividad RNasa P cianobacteriana en un sistema completamente homólogo. Los datos indican que el origen de la proteína P afecta a la eficiencia de maduración del sustrato. En presencia de la proteína P de *E. coli*, el pre-tRNA<sup>Tyr</sup> de *E. coli* se madura mejor que en presencia de la proteína P de *Synechocystis*, mientras que en presencia de la proteína P de *Synechocystis*, el sustrato pre-tRNA<sup>Gln</sup> de *Synechocystis* se madura mejor (figura 37). Este efecto diferencial de la proteína P en la tasa de maduración de diferentes sustratos había sido sugerido por experimentos *in vitro* (Guerrier-Takada *et al.*, 1983) e *in vivo* en *E. coli* (Kirsebom *et al.*, 1988). Estudios recientes realizados en *B. subtilis* indican que la proteína P ayuda al reconocimiento de la secuencia 5' de los pre-tRNAs por parte de la RNasa P (Crary *et al.*, 1998 y Kurz *et al.*, 1988).

Debido a que poseíamos los dos componentes de la RNasa P de *Synechocystis* decidimos caracterizar la actividad RNasa P de este organismo. Mediante ensayos *in vitro* con las dos subunidades purificadas y utilizando como sustrato pre-tRNA<sup>Gln</sup> de *Synechocystis* hemos podido determinar las condiciones óptimas para la actividad del RNA P sólo y de la holoenzima. La holoenzima presenta diferencias en cuanto a la concentraciones óptimas de KCl y MgCl<sub>2</sub> con las encontradas en otras eubacterias. Sin embargo, el análisis de la actividad RNasa P del cianelo de *Cyanophora paradoxa* mostró una inhibición similar por KCl a la encontrada en la RNasa P de *Synechocystis*.

La RNasa P debe ser capaz de reconocer las características comunes a todos los tipos de pre-tRNAs. Los estudios realizados hasta el momento indican que la estructura terciaria del tRNA maduro contiene los determinantes para el reconocimiento por la RNasa P. Estudios con sustratos más pequeños han demostrado que una mini-hélice consistente en los brazos T y acceptor (incluyendo la secuencia 5') es madurada por la RNasa P, con un incremento en la  $K_m$  de 100 veces (McClain *et al.*, 1987; Schlegl *et al.*, 1994 y Hardt *et al.*, 1993) respecto del sustrato normal.

En el RNA P de *Synechocystis* existe una secuencia 5'GGU3' dentro del lazo de unión J15 y 16, pero este lazo es mayor que lo encontrado habitualmente en bacterias (Vioque,

1997). En la mayoría de los RNAs P de cianobacterias analizados hasta el momento no se encuentra esta secuencia 5'-GGU-3', localizándose incluso una hélice que interrumpe esta secuencia en los RNAs P de *Pseudanabaena* y *Oscillatoria* (ver arriba). Este hecho y la ausencia de la secuencia CCA-3' en los genes que codifican los pre-tRNAs en cianobacterias (el CCA-3' se añade posttranscripcionalmente), nos llevó a estudiar con detalle el papel del CCA-3' en los sustratos sobre la actividad RNasa P de la holoenzima o del RNA P.

Los resultados obtenidos en condiciones de recambio simple (condiciones en las que no hay que considerar la liberación del producto) con los RNAs P de varias cianobacterias (*Synechocystis*, *Pseudanabaena* y *Anabaena*), en comparación con el RNA P de *E. coli* como control, muestran que no existe una maduración de pre-tRNA<sup>Gln</sup>+CCA más rápida que de pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA, como ocurre en *E. coli*, apreciándose incluso una preferencia por los sustratos sin CCA-3'.

Esto mismo se comprobó con otro sustrato procedente de *Synechocystis*, pre-tRNA<sup>Glu</sup>, obteniéndose el mismo resultado. La inclusión de la proteína P en el ensayo no varió el comportamiento de la enzima. Ensayos RNasa P realizados con extractos crudos de *Synechocystis* mostraron el mismo comportamiento en cuanto a la maduración de pre-tRNA<sup>Gln</sup>+CCA (no mostrado) lo que indica que la preferencia observada no es un artefacto de la holoenzima reconstituida *in vitro* a partir de subunidades recombinantes.

Para comprobar si la secuencia 5'-GGU-3' en el lazo J15/16 de *Synechocystis* tenía algún papel en la interacción con el sustrato decidimos generar un mutante que cambiara esa secuencia por 5'-CCA-3' (figura 32). Existen mutantes en el RNA P de *E. coli* en la secuencia 5'-GGU-3', con un efecto claro en el reconocimiento del sustrato. El cambio 5'-G292G293U294-3' por 5'-G292C293A294-3' provoca un incremento en la  $K_m$  del RNA P mutante en el reconocimiento de pre-tRNA<sup>Tyr</sup> de aproximadamente 200 veces (Kirsebom y Svärd, 1994). Cambios que implicaban la G292 (delección de los nucleótidos 291 y 292) también afectaban severamente a la  $K_m$  del RNA P (Kirsebom y Altman, 1989). Sobre algunos sustratos, estos cambios poseen también un efecto sobre el punto de corte de la RNasa P (Kirsebom y Svärd, 1993 y Kirsebom y Svärd, 1994).

La mutación produjo diferencias en el reconocimiento de sustratos con o sin CCA-3'. Sin embargo la actividad encontrada era menor que la del RNA P silvestre

(aproximadamente la mitad). Esto puede ser debido a un efecto en la estructura del RNA P por la mutación, debido a que esta secuencia se encuentra cerca del centro activo de la enzima en los dos modelos tridimensionales generados hasta el momento (Chen *et al.*, 1998 y Massire *et al.*, 1998). Además en la reconstitución de la holoenzima era necesario añadir 10 veces mas de la proteína P con el RNA P mutante (PJ15/16) que con el RNA P silvestre para obtener las actividades alcanzadas con los RNAs P solos. Esto puede reflejar un defecto estructural en el RNA PJ15/16 que impide el reconocimiento eficiente de la proteína P.

El análisis de los parámetros cinéticos de los RNAs P de *E. coli*, *Synechocystis* y *Synechocystis* J15/16 en condiciones de recambio múltiple mostró una afinidad mayor de los RNAs P cianobacterianos por pre-tRNA<sup>Gln</sup>-CCA, al contrario de lo que sucedía con el RNA P de *E. coli*. Sin embargo, la  $k_{cat}/K_m$  fue similar para los dos sustratos, aunque algo menor para pre-tRNA<sup>Gln</sup>+CCA. En *E. coli* es a la inversa. Debido a que la estructura del sustrato y el producto es similar y a que el 5' no parece afectar al reconocimiento del sustrato por la enzima, la lenta liberación del producto limita la velocidad global de la reacción y provoca una disminución en la  $k_{cat}/K_m$  en los casos donde la  $K_m$  es menor.

La interacción entre RNAs enzima y sustrato se ha estudiado de diferentes maneras, una de ellas es la técnica de retardo en gel, mediante la cual se han medido las  $k_d$  de los RNAs P de *E. coli* y *T. termophilus* por sustratos con y sin CCA en el extremo 3'. los resultados obtenidos son los esperados, estos RNAs P presentan una afinidad mayor por un sustrato con CCA-3' que sin CCA-3', siendo casi indetectable por este método la interacción con el sustrato sin CCA-3' (Hardt *et al.*, 1995).

El RNA P de *Synechocystis* no retardó en nuestros experimentos ninguno de los sustratos utilizados (figura 36), mientras que nuestro control, el RNA P de *E. coli* se comportó como se ha descrito previamente, retardando sólo los sustratos con la secuencia CCA-3'. Estos datos, en conjunto con los datos cinéticos obtenidos previamente, indican que la afinidad del RNA P de *Synechocystis* por sustratos con o sin CCA-3' es menor que la de los RNAs P de *E. coli* o de *T. termophilus* por un sustrato con CCA-3'.

Este problema de detección de la interacción nos llevó a desarrollar una técnica nueva, que permitiera el análisis de la interacción del RNA P de *Synechocystis* con pre-tRNA<sup>Gln</sup>±CCA. Mediante la técnica de interacción en filtro, basada en la técnica de



Northwestern descrita previamente (Sägesser *et al.*, 1997), pudimos ver interacción entre un RNA fijado a una membrana y un RNA marcado radioactivamente. Así, se ha podido comprobar que el RNA P de *Synechocystis* posee mayor afinidad por el pre-tRNA que carece de la secuencia CCA-3'. El mutante J15/16 del RNA P de *Synechocystis* posee un comportamiento parecido al silvestre en cuanto a la afinidad por los sustratos, por lo que podemos afirmar que la secuencia 5'-GGU-3' contenida en el lazo J15/16 del RNA P de *Synechocystis* no tiene un papel relevante en el reconocimiento de la secuencia CCA-3' de los pre-tRNAs.

Recientemente se han publicado estudios sobre los RNAs P de dos cianobacterias, *Prochlorococcus marinus* (Hess *et al.*, 1998) y *Prochlorothrix hollandica* (Fingerhut y Schön, 1998), presentando este último la secuencia 5'-GGU-3' precedida de una hélice similar a las encontradas en *Pseudanabaena* y *Oscillatoria*. En ambos casos se ha descrito una ligera preferencia por sustratos con CCA-3', en contradicción con nuestros datos. Esto puede ser debido a que el sustrato utilizado en estos experimentos fue pre-tRNA<sup>Glu</sup> de cloroplastos de cebada y no un sustrato procedente del mismo organismo. Además este pre-tRNA presenta características diferentes al consenso de los pre-tRNAs en el brazo T. No se puede excluir que *P. hollandica* y *P. marinus* sean excepciones a nuestra observación.

El cianelo de *C. paradoxa* es un plastido con una serie de propiedades peculiares, como por ejemplo estar rodeado de una pared de peptidoglicano, por lo que se considera un superviviente de una etapa temprana de la evolución de los plastidios desde cianobacterias endosimbióticas. El cianelo se considera una rama evolutiva de los plastidios con una divergencia muy temprana, habiendo perdido casi el 90 % de su información genética, pero reteniendo la pared tipo procariota.

El RNA P del cianelo de *C. paradoxa* ha sido identificado por homología a los RNAs P bacterianos (Schevelev *et al.*, 1995) en la secuencia completa de su genomio (Stirewalt *et al.*, 1995). Posteriormente, este RNA ha sido copurificado con la actividad RNasa P del cianelo (Baum y Schön, 1996), demostrándose su pertenencia a la RNasa P.

El RNA P del cianelo no posee actividad catalítica en las condiciones probadas, sin embargo la RNasa P del cianelo es sensible a tratamiento con nucleasa micrococcal (Baum y Schön, 1996), lo que indica que la actividad necesita el RNA. La estructura del RNA P

del cianelo es similar a la del RNA P consenso bacteriano, pero posee algunas diferencias que en algunos casos pueden ser explicadas por el alto contenido en AT del genomio del cianelo (Herdman y Stanier, 1977). Otra característica estructural destacable es la ausencia de interacciones terciarias, como la descrita entre la hélice P8 y el lazo L14 (Brown *et al.*, 1996) (figura 43).

Nuestros resultados indican que la estructura del RNA P del cianelo es similar al RNA P cianobacteriano, debido a que hemos reconstituido la actividad RNasa P con el RNA P del cianelo y la proteína P de *Synechocystis*. La reconstitución, sin embargo presenta rasgos interesantes, por un lado no hemos conseguido reconstituir la actividad con la proteína P de *E. coli*, en todas las condiciones probadas, a pesar de que las proteínas P de *E. coli* y *Synechocystis* son intercambiables con los RNAs P de estos mismos organismos en diferentes condiciones de ensayo (esta Tesis). Además la reconstitución solo fue funcional en las condiciones óptimas de ensayo de la RNasa P cianobacteriana (esta Tesis) no en las descritas para la RNasa P de *E. coli*. Todo esto en conjunto indica que la RNasa P cianobacteriana posee características estructurales diferentes a la de *E. coli*, o que al menos, la proteína P de *Synechocystis* posee rasgos diferenciales con respecto a la proteína P de *E. coli*.

A pesar de lograr una reconstitución funcional, no parece claro que el componente proteico de la RNasa P del cianelo de *C. paradoxa* sea similar a la proteína P de *Synechocystis*. Por un lado anticuerpos generados contra la proteína P de *Synechocystis* no reconocen una banda específica en extractos crudos del cianelo de *C. paradoxa* (no mostrado). Por otro lado, la localización de una banda específica mediante la técnica de North-Western, usando como sonda el RNA P del cianelo marcado radioactivamente, señaló una banda de peso molecular 35-45 kDa, mayor al de las proteínas P bacterianas (14 kDa aproximadamente).

En un intento de reconstituir la actividad RNasa P del RNA P del cianelo en ausencia de proteínas, realizamos una mutagénesis que reconstituye teóricamente la interacción terciaria P14-L18 descrita para los RNAs P bacterianos y ausente en el RNA P del cianelo. El resultado fue negativo en todas las condiciones probadas, e incluso, la reconstitución con la proteína P de *Synechocystis* fue no activa.

## **5.CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

1. Se ha clonado y caracterizado el gen *rnpB* de la cianobacteria *Pseudanabaena* sp. PCC 6903.
2. Se ha clonado el gen *rnpA* de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, expresado la proteína codificada por este gen en *E. coli* y purificado la proteína P desde este organismo. Se han obtenido anticuerpos funcionales contra la proteína P purificada.
3. Se ha caracterizado la actividad RNasa P de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803, obteniéndose las condiciones óptimas para la actividad del RNA P en ausencia de proteínas y para la holoenzima completa.
4. La secuencia CCA-3' del extremo de los pre-tRNAs no es requerida para el reconocimiento del sustrato por la RNasa P de *Synechocystis*, siendo levemente perjudicial.
5. El RNA P de *Synechocystis* posee mayor afinidad por sustratos que carecen de la secuencia CCA en su extremo 3'. La secuencia 5'-GGU-3' del lazo J15/16 del RNA P de *Synechocystis* no es funcionalmente homóloga a la secuencia 5'-GGU-3' del mismo lazo en el RNA P de *E. coli*.
6. Se ha reconstituido una holoenzima funcional con el RNA P del cianelo de *Cyanophora paradoxa* y la proteína de *Synechocystis*. Esta es la primera demostración de reconstitución funcional de la actividad RNasa P a partir de subunidades de una bacteria y un orgánulo eucariota.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Altman, S., Wesolowski, D. y Puranam, R. S. (1993) Nucleotide sequences of the RNA subunit of RNase P from several mammals. *Genomics* **18**, 418-422.
- Altman, S., Kirsebom, L. y Talbot, S. (1993) Recent studies of ribonuclease P. *FASEB J.* **7**, 7-14.
- Anderson, S. L. y McIntosh, L. (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light requiring process. *J. Bacteriol.* **173**, 2761-2767.
- Baer, M. F., Wesolowski, D. y Altman, S. (1989) Characterization *in vitro* of the defect in a temperature-sensitive mutant of the protein subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 6862-6866.
- Banta, A. B., Haas, E. S., Brown, J. W. y Pace, N. R. (1992) Sequence of the ribonuclease P RNA gene from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Nucleic Acids Res.* **20**, 911.
- Bartkiewicz, M., Gold, H. y Altman, S. (1989) Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells. *Genes Dev.* **3**, 488-499.
- Baum, M., Cordier, A. y Schon, A. (1996) RNase P from a photosynthetic organelle contains an RNA homologous to the cyanobacterial counterpart. *J. Mol. Biol.* **257**, 43-52.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Beebe, J. A. y Fierke, C. A. (1994) A kinetic mechanism for cleavage of precursor tRNA(Asp) catalyzed by the RNA component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry* **33**, 10294-10304.
- Bonen, L. y Doolittle, W. F. (1975) On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2310-2314.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.



- Britton, G.** (1993) Carotenoids in chloroplast pigment-protein complexes. En *Pigment-protein complexes in plastids: synthesis and assembly* (Sundqvist, C. y Ryberg, M. eds.) pp 447-484. Academic Press, San Diego.
- Brown, J. W. y Pace, N. R.** (1991) Structure and evolution of ribonuclease P RNA. *Biochimie* **73**, 689-697.
- Brown, J. W. y Pace, N. R.** (1992) Ribonuclease P RNA and protein subunits from Bacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1451-1456.
- Brown, J. W., Haas, E. S., Nolan, J. M., Major, F., Rubio, M. A. y Pace, N. R.** (1996) Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences reveals tertiary structural elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3001-3006.
- Brown, J. W.** (1998) The ribonuclease P database. *Nucleic Acids Res.* **26**, 351-352.
- Bult, C. J., et al.** (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-1073.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. y Short, J. M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376.
- Calcutt, M. J. y Schmidt, F. J.** (1992) Conserved gene arrangement in the origin region of the *Streptomyces coelicolor* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**, 3220-3226.
- Chamberlain, J., Lee, Y., Lane, W. S. y Engelke, D. R.** (1998) Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.* **12**, 1678-1690.
- Chang, S. y Carbon, J.** (1975) The nucleotide sequence of a precursor to the glycine- and threonine- specific transfer ribonucleic acids of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **250**, 5542-5555.
- Chauvat, F., De Vries, L., Van der Ende, A. y Van Arkel, G. A.** (1986) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 185-191.
- Chauvat, F., Labarre, J. y Ferino, F.** (1988) Development of genes transfer systems for the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol. Biochem.* **26**, 629-637.
- Chauvat, F., Ronet, P., Bottin, H. y Boussac, A.** (1989) Mutagenesis by random cloning of an *Escherichia coli* kanamycin resistance gene into the genome of the

- cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: selection of mutants defective in photosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* **216**, 51-59.
- Chen, J. L. y Pace, N. R.** (1997) Identification of the universally conserved core of ribonuclease P RNA. *RNA* **3**, 557- 560.
- Chen, J. L., Nolan, J. M., Harris, M. E. y Pace, N. R.** (1998) Comparative photocross-linking analysis of the tertiary structures of *E. coli* and *Bacillus subtilis* RNase P RNAs. *EMBO J.* **17**, 1515-1525.
- Cherabil, B., Krupp, G., Schuchert, P., Char, S. y Söll, D.** (1987) The RNA components of *Schizosaccharomyces pombe* RNase P are essential for cell viability. *Gene* **60**, 157-161.
- Debus, R. J., Barry, B. A., Babcock, G. T. y McIntosh, L.** (1988a) Site-directed mutagenesis identifies a tyrosine radical involved in the photosynthetic oxygen-evolving system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 427-430.
- Debus, R. J., Barry, B. A., Sithole, I., Babcock, G. T. y MacIntosh, L.** (1988b) Directed mutagenesis indicates that the donor to P680<sup>+</sup> in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry* **27**, 9071-9074.
- Deng, W. P. y Nickoloff, J. A.** (1992) Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**, 81-88
- Deutscher, M.P.** (1984) Processing of tRNA in prokaryotes and eukaryotes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **17**, 45-71.
- Devereux, J., Haerberli, P. y Smithies, O.** (1984) A comprehensive set of sequences analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- Doersen, C., Guerrier-Takada, C., Altman, S., y Attardi, G.** (1985) Characterization of RNase P from HeLa Cell mitochondria; comparison with the cytosol RNase P activity. *J. Biol. Chem.* **260**, 5942-5949.
- Doria, M., Carrara, G., Calandra, P. y Tocchini-Valentini, G. P.** (1991) An RNA molecule copurifies with RNase P activity from *Xenopus laevis* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2315-2320.
- Douglas, S. E. y Turner, S.** (1991) Molecular evidence for origin of plastids from a cyanobacterium-like ancestor. *J. Mol. Evol.* **33**, 267-273.



- Eder, P. S., Srinivasan, A., Fishman, M. C. y Altman, S. (1996) The RNA subunit of ribonuclease P from the zebrafish, *Danio rerio*. *J. Biol. Chem.* **271**, 21031-21036.
- Eder, P., Kekuda, R., Stolc, V. y Altman, S. (1997) Characterization of two scheroaderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1101-1106.
- Engelke, D. R., Gegenheimer, P. y Ableson, J. (1985) Nucleolytic processing of a tRNA<sup>arg</sup>-tRNA<sup>asp</sup> dimeric precursor by a homologous component from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **260**, 1271-1279.
- Easterwood, T. R. y Harvey, S. C. (1997) Ribonuclease P RNA : Models of the 15/16 bulge from *E. coli* and the P15 stem loop of *Bacillus subtilis*. *RNA* **3**, 577-585.
- Fay, R. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* **56**, 340-373.
- Ferino, F. y Chauvat, F. (1989) A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Gene* **84**, 257-266.
- Fingerhut, C. y Schön, A. (1998) Sequence and functional characterization of RNase P RNA from the chl a/b containing cyanobacterium *Prochlorothrix hollandica*. *FEBS Lett.* **428**, 161-164.
- Fleischmann, R. D., et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* **269**, 496-512.
- Flores, E. y Herrero, A. (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En *Advances in Photosynthesis, vol 1: The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D.A. ed.) pp 487-517. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Flores, E. y Wolk, C. P. (1985) Identification of facultatively heterotrophic, N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria, able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. *J. Bacteriol.* **162**, 1339-1341.
- Frank, D. N., Ellington, A. E. y Pace, N. R. (1996) In vitro selection of RNase P RNA reveals optimized catalytic activity in a highly conserved structural domain. *RNA* **2**, 1179-1188.
- Fraser, C. M., et al. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-403.

- Fujita, M., Yoshikawa, H., y Ogasawara, N.** (1990) Structure of the *dnaA* region of *Micrococcus luteus*: conservation and variations among eubacteria. *Gene* **93**, 73-78.
- Gardiner, K. y Pace, N. R.** (1980) RNase P of *Bacillus subtilis* has an RNA component. *J. Biol. Chem.* **255**, 7507-7509.
- Gardiner, K. J., Marsh, T. L. y Pace, N. R.** (1985) Ion dependence of the *Bacillus subtilis* RNase P reaction. *J. Biol. Chem.* **260**, 5415-5419.
- Gegenheimer, P.** (1996) Structure, mechanism and evolution of chloroplast transfer RNA processing systems. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 147-150.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. L., Barns, S., Lane, D. J. y Pace, N. R.** (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**, 3584-3592.
- Goodwin, T. W.** (1977) The prenyllipids of the membranes of higher plants. En *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants* (Trevini, M. y Lichtenthaler, eds.) pp 29-47. Springer, New York.
- Goodman, H. M. Olson, M. V. y Hall, B. D.** (1977) Nucleotide sequence of a mutant eukaryotic gene: the yeast tyrosine-inserting ochre supressor SUP4-o. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5453-5457.
- Gopalan, V., Baxevanis, A. D., Landsman, D. y Altman, S.** (1997) Analysis of the functional role of conserved residues in the protein subunit of ribonuclease P from *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **267**, 818-829.
- Gray, M. W.** (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* **5**, 294-299.
- Green, C. J., Vold, B. S., Morch, M. D., Joshi, R. L. y Haenni, A. L.** (1988) Ionic conditions for the cleavage of the tRNA-like structure of turnip yellow mosaic virus by the catalytic RNA of RNase P. *J. Biol. Chem.* **263**, 11617-11620.
- Guerrero, M. G. y Lara, C.** (1987) Assimilation of inorganic nitrogen. En *The cyanobacteria* (Fay, P. y van Baalen, C., eds.) pp 163-186. Elsevier Science Publishers, New York.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. y Altman, S.** (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857.

- Guerrier-Takada, C. y Altman, S.** (1984) Structure in solution of M1 RNA, the catalytic subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **23**, 6327-6334.
- Guthrie, C.** (1975) The nucleotide sequence of the dimeric precursor to glutamine and leucine transfer RNAs coded by bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **95**, 529-547.
- Hanahan, D.** (1983) Studies for transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hansen, F. G., Hansen, E. B. y Atlung, T.** (1985) Physical mapping and nucleotide sequence of the *rnpA* gene that encodes the protein component of ribonuclease P in *Escherichia coli*. *Gene* **38**, 85-93.
- Hardt, W. D., Schlegl, J., Erdmann, V. A. y Hartmann, R. K.** (1993) Gel retardation analysis of *E. coli* M1 RNA-tRNA complexes. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3521-3527.
- Hardt, W. D., Schlegl, J., Erdmann, V. A. y Hartmann, R. K.** (1993) Role of the D arm and the anticodon arm in tRNA recognition by eubacterial and eukaryotic RNase P enzymes. *Biochemistry* **32**, 13046-53.
- Hardt, W. D., Schlegl, J., Erdmann, V. A. y Hartmann, R. K.** (1995) Kinetics and thermodynamics of the RNase P RNA cleavage reaction: analysis of tRNA 3'-end variants. *J. Mol. Biol.* **247**, 161-172.
- Hardt, W. D. y Hartmann, R. K.** (1996) Mutational analysis of the joining regions flanking helix P18 in *E. coli* RNase P RNA. *J. Mol. Biol.* **259**, 422- 433.
- Hayes, J. M.** (1983) Geochemical evidence bearing on the origin of aerobiosis, a speculative hypothesis. En *The Earth's earliest biosphere, its origins and evolution* (Schopf, J.W., ed.) pp 291-300. Princeton University Press. Princeton, N.J.
- Henikoff, S.** (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**, 351-359.
- Herdman, M., Janvier, M., Rippka, R. y Stanier, R. Y.** (1979) Genome size of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 73-85.
- Hess W. R., Fingerhut, C. y Schön, A.** (1988) RNase P RNA from *Prochlorococcus marinus*: contribution of substrate domains to recognition by a cyanobacterial ribozyme. *FEBS Lett.* **431**, 138-142.

- Hirschberg, J. y Chamovitz, D.** (1994) Carotenoids in cyanobacteria. En *Advances in Photosynthesis, Vol. 1: The Molecular Biology of Cyanobacteria* (Bryant, D.,ed.) pp 559-579. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Hollingsworth, M. J. y Martin, N. C.** (1986) RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1058-1064.
- Jansson, C., Debus, R. J., Osiewacz, H. D., Gurevitz, M. y McIntosh, L.** (1987) Construction of an obligate photoheterotrophic mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Physiol.* **85**, 1021-1025.
- Jayanthi, G. P. y Van, T. G.** (1992). Characterization of ribonuclease P isolated from rat liver cytosol. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 264-70.
- Kahle, D., Wehmeyer, U. y Krupp, G.** (1990) Substrate recognition by RNase P and by the catalytic M1 RNA: identification of possible contact points in pre-tRNAs. *EMBO J.* **9**, 1929-1937.
- Kaneko, T. et al.** (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
- Kirsebom, L. A., Baer, M. F. y Altman, S.** (1988) Differential effects of mutations in the protein and RNA moieties of RNase P on the efficiency of suppression by various tRNA suppressors. *J. Mol. Biol.* **204**, 879-888.
- Kirsebom, L. A. y Svärd, S. G.** (1993) Identification of a region within M1 RNA of *Escherichia coli* RNase P important for the location of the cleavage site on a wild type tRNA precursor. *J. Mol. Biol.* **231**, 594-604.
- Kirsebom, L. A. y Svärd, S. G.** (1994) Base pairing between *Escherichia coli* RNase P RNA and its substrate. *EMBO J.*, **13**, 4870-4876.
- Kirsebom, L. A. y Vioque, A.** (1996) RNase P from bacteria. Substrate recognition and function of the protein subunit. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 99-109.
- Kline, L., Nishikawa, S. y Söll, D.** (1981) Partial purification of RNase P from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **256**, 5058-5063.

- Krupp, G., Cherayil, B., Frendewey, D., Nishikawa, S. y Söll, D.** (1986). Two RNA species co-purify with RNase P from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **5**, 1697-1703.
- Kurz, J. C., Niranjanakumari, S. y Fierke, C.** (1998) Protein component of *Bacillus subtilis* RNase P specifically enhances the affinity for precursor- tRNA<sup>Asp</sup>. *Biochemistry* **37**, 2393-2400.
- Labarre, J., Chauvat, F. y Thuriaux, P.** (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **171**, 3449-3457.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaGrandeur, T. E., Darr, S. C., Haas, E. S., y Pace N. R.** (1993) Characterization of the RNase P RNA of *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* **175**, 5043-5048.
- Lai, C. Y. y Baumann, P.** (1992) Genetic analysis of an aphid endosymbiont DNA fragment homologous to the *rnpA-rpmH-dnaA-dnaN-gyrB* region of eubacteria. *Gene* **113**, 175-181.
- Lang, B. F., Berger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. y Gray, M. W.** (1997) An Ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**, 493- 497.
- Lee, J. Y. y Engelke, D. R.** (1989) Partial characterization of an RNA component that copurifies with *Saccharomyces cerevisiae* RNase P. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2536-2543.
- Lee, J. Y., Rohlman, C. E., Molony, L. A. y Engelke, D. R.** (1991) Characterization of RPR1, an essential gene encoding the RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Mol. Cell Biol.* **11**, 721-730.
- Linden, H., Vioque, A ySandmann, G.** (1993) Isolation of a carotenoid biosynthesis gene coding for  $\xi$ -carotene desaturase from *Anabaena* PCC7120 by heterologous complementation. *FEMS Microbiol. Lett.* **106**, 99-104.
- Liu, F. y Altman, S.** (1994) Differential evolution of substrates for an RNA enzyme in the presence and absence of its protein cofactor. *Cell* **77**, 1093-1100.
- Löffelhardt, W., Bohnert, H. J. y Bryant, D. A.** (1997) The cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**, 393-413.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Mamula, M. J., Baer, M., Craft, J. y Altman, S.** (1989) An immunological determinant of RNase P protein is conserved between *Escherichia coli* and humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86**, 8717-8721.
- Markwel, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L. y Tolbert, N. E.** (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **180**, 152-157.
- Marraccini, P., Bulteau, S., Cassier-Chauvat, C., Mermet-Bouvier, P. y Chauvat, F.** (1993) A conjugative plasmid vector for promoter analysis in several cyanobacteria of de genera *Synechococcus* and *Synechocystis*. *Plant Mol. Biol.* **23**, 905-909.
- Marraccini, P., Cassier-Chauvat, C., Bulteau, S., Chávez, S. y Chauvat, F.** (1994) Light-regulated promoters from *Synechocystis* PCC6803 share a consensus motif involved in photoregulation. *Mol. Microbiol.* **12**, 1005-1012.
- Martin, N. C. y Underbrink-Lyon, K.** (1981) A mitochondrial locus is necessary for the synthesis of mitochondrial tRNA yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4743-4747.
- Massire, C., Jaeger, L. y Westhof, E.** (1997) Phylogenetic evidence for a new tertiary interaction in bacterial RNase P RNAs. *RNA* **3**, 553-556.
- Massire, C., Jaeger, L. y Westhof, E.** (1998) Modeling of the three-dimensional architecture of bacterial RNase P RNA based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **279**, 773-793.
- Mayes, S. R., Chiesa, D. M., Zhang, Z. y Barber, J.** (1993) The genes *aroA* and *trnQ* are located upstream of *psbO* in the chromosome of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* **325**, 255-261.
- Meissner, P. S., Sisk, W. P. y Berman, M. L.** (1987) Bacteriophage  $\lambda$  cloning system for the construction of directional cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4171-4175
- Messing, J.** (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**, 20.

- Miller, D. L., Martin, N. C.** (1983) Characterization of the yeast mitochondrial locus necessary for tRNA biosynthesis: DNA sequence analysis and identification of a new transcript. *Cell* **34**, 911-917.
- McClain, W. H., Guerrier-Takada, C. y Altman, S.** (1987) Model substrates for an RNA enzyme. *Science* **238**, 527-530.
- McClain, W. H., Foss, K., Schneider, J., Guerrier-Takada, C. y Altman, S.** (1987) Suppressor and novel mutants of bacteriophage T4 tRNA. *J. Mol. Biol.* **193**, 223-226.
- Miyata, M., Sano, K. I., Okada, R. y Fukumura, T.** (1993) Mapping of replication initiation site in *Mycoplasma capricolum* genome by two dimensional gel electrophoretic analysis. *Nucleic Acids. Res.* **21**, 4816-4823.
- Montesinos, M. L., Herrero, A. y Flores, E.** (1995) Amino acid transport system required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **177**, 3150-3157.
- Morales, M. J., Dang, Y. L., Lou, Y. C., Sulo, P. y Martin, N. C.** (1992). A 105-kDa protein is required for yeast mitochondrial RNase P activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9875-9879.
- Morse, D. P. y Schmidt, F. J.** (1992) Sequences encoding the protein and RNA components of ribonuclease P from *Streptomyces bikiniensis* var. *zorbonensis*. *Gene* **117**, 61-66.
- Motamedi, H., Lee, Y. y Schmidt, F. J.** (1984) Tandem promoters preceding the gene for the M1 RNA component of *E. coli* ribonuclease P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3959-3963.
- Nieuwlandt, D. T., Haas, E. S. y Daniels, C. J.** (1991) The RNA component of RNase P from the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *J. Biol. Chem.* **266**, 5689-5695.
- Ogasawara, N., Moriya, S., von Meyenburg, K., Hansen, F. G. y Yoshikawa, H.** (1985) Conservation of genes and their organization in the chromosomal replication origin region of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *EMBO J.* **4**, 3345-3350.
- Oh, B.-K. y Pace, N. R.** (1994) Interaction of the 3'-end of tRNA with ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4087-4094.

- O'Neill, G. P. y Söll, D. (1990) Expression of the *Synechocystis* sp. PCC 6803 tRNA-Glu gene provides tRNA for protein and chlorophyll biosynthesis. *J. Bacteriol.* **172**, 6363-6371.
- Pan, T. (1995) Higher order folding and domain analysis of the ribozyme from *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry* **34**, 902-909.
- Pearce, J., Leach, C. K. y Carr, N. G. (1969) The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* **55**, 371-378.
- Pearson, W. R. y Lipman, D. J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.
- Peck-Miller, K. A. y Altman, S. (1991). Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **221**, 1-5.
- Perreault, J. P. y Altman, S. (1992) Important 2'-hydroxyl groups in model substrates for M1 RNA, the Catalytic RNA Subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *J Mol. Biol* **226**, 399-409.
- Porter, R. D. (1986) Transformation in cyanobacteria. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **13**, 111-132.
- Potuschak, T., Rossmanith, W. y Karwan, R. (1993) RNase MRP and RNase P share a common substrate. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3239-3243.
- Reich, C., Gardiner, K. J., Olsen, G. J., Pace, B., Marsh, T. L. y Pace, N. R. (1986) The RNA component of the *Bacillus subtilis* RNase P: sequence, activity, and partial secondary structure. *J. Biol. Chem.* **261**, 7888-7893.
- Reich, C., Olsen, G. J., Pace, B. y Pace, N. R. (1988) Role of the protein moiety of ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme. *Science* **239**, 178-181.
- Reith, M. y Munholland, J. (1995) Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 333-335.
- Richter, S., Hagemann, M. y Messer, W. (1998) Transcriptional analysis and mutation of a *dnaA*-like gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Bacteriol.* **180**, 4946-4969.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. y Stanier, R. Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1-61.



- Rost, Burkhard, Sander y Chris** (1993) Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7558-7562.
- Sakamoto, H., Kimura, N., Nagawa, F. y Shimura, Y.** (1983) Nucleotide sequence and stability of the RNA component of RNase P from a temperature-sensitive mutant of *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **11**, 8237-8251.
- Sakamoto, H., Kimura, N. y Shimura, Y.** (1983) Processing of transcription products of the gene encoding the RNA component of RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6187-6191.
- Sakano, H., Yamada, S., Shimura, Y. y Ozeki** (1974) Temperature sensitive mutants of *Escherichia coli* for tRNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* **1**, 355-371.
- Sägesser, R., Martinez, E. Tsagris, M. y Tabler, M.** (1997) Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3816-3822.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. (2nd edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schedl, P. y Primakoff, P.** (1973) Mutants of *E. coli* thermosensitive for the synthesis of tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2091- 2095.
- Schlegl, J., Hardt, W. D., Erdmann, V. A. y Hartmann, R. K.** (1994) Contribution of structural elements to *Thermus thermophilus* ribonuclease P RNA function. *EMBO J.* **13**, 4863-4869.
- Schleifer, K. H. y Ludwig, W.** (1989) Phylogenetic relationships among bacteria. En *The Hierarchy of Life* (Fernholm, B., Bremer, K. y Jörnvall, eds.) pp 103-117. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Schmidt, F. J., Seidman, J. G. y Bock, R. M.** (1976) Transfer ribonucleic acid biosynthesis. Substrate specificity of ribonuclease P. *J. Biol. Chem.* **251**, 2440-2445.
- Schmidt, A.** (1988) Sulfur metabolism in cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**, 572-583.

- Schopf, J. W., Hayes, J. M. y Walter, M. R. (1983) Evolution of the Earth's earliest ecosystem: recent progress and unsolved problems. En *The Earth's earliest biosphere, its origins and evolution* (Schopf ed.) pp 361-384. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Seidman, J. G. y McClain, W. (1975). Three steps in the conversion of large precursor RNA into serine and proline transfer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**, 1491-1495.
- Shareck, F., Biely, P., Morosoli, R. y Kluepfel, D. (1995) Analysis of DNA flanking the *xinB* locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl xylan esterase and the RNA component of ribonuclease P. *Gene* **153**, 105-109.
- Shevelev, E. L., Bryant, D. A., Loffelhardt, W. y Bohnert, H. J. (1995) Ribonuclease P RNA gene of the plastid chromosome from *Cyanophora paradoxa*. *DNA Research* **2**, 231 - 234.
- Sherman, L., Bricker, T., Guikema, J. y Pakrasi, H. (1987) The protein composition of the photosynthetic complexes from the cyanobacterial thylakoid membrane. En *The cyanobacteria* (Fay, P. y van Baalen, C.V. eds.) pp 1-33. Elsevier, Amsterdam.
- Siegel, R. W., Banta, A. B., Haas, E. S., Brown, J. W. y Pace, N. R. (1996) *Mycoplasma fermentans* simplifies our view of the catalytic core of ribonuclease P RNA. *RNA* **2**, 452-462.
- Skovgaard, O. (1990) Nucleotide sequence of a *Proteus mirabilis* DNA fragment homologous to the 60K-*rnpA-rpmH-dnaA-dnaN-recF-gyrB* region of *Escherichia coli*. *Gene* **93**, 27-34.
- Smart, L. B., Anderson S. L. y McIntosh, L. (1991) Targeted genetic inactivation of the photosystem I reaction center in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *EMBO J.* **10**, 3289-3296.
- Smart, L. B., Bowlby, N. R., Anderson, S. L., Sithole, I. y McIntosh, L. (1994) Genetic manipulation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Development of strains lacking Photosystem I for the analysis of mutations in Photosystem II. *Plant Physiol.* **104**, 349-354.

- Smart, L. B. y McIntosh, L. (1993) Genetic inactivation of the *psaB* gene in *Synechocystis* sp. PCC 6803 disrupts assembly of photosystem I. *Plant. Mol. Biol.* **21**, 177-180.
- Smith, D., Burgin, A. B., Haas, E. S. y Pace, N. R. (1992) Influence of metal ions on the ribonuclease P reaction. Distinguishing substrate binding from catalysis. *J Biol. Chem.* **267**, 2429-2436.
- Smith, D. y Pace, N. R. (1993) Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism. *Biochemistry* **32**, 5273-5281.
- Smith, D. (1995) Magnesium as the catalytic center of RNA enzymes. En *The Biological Chemistry of Magnesium*. (J.A. Cowan , ed). p111-135. VCH Publishers.
- Söll, D. y RajBhandary, U.L. (eds). (1995) tRNA: structure, biosynthesis and function, Washington, D.C. ASM Press.
- Stams, T., Niranjanakumari, S., Fierke, C. A. y Christianson, D. W. (1998) Ribonuclease P protein structure : Evolutionary origins in the translational apparatus. *Science* **280**, 752-755.
- Stanier, R. Y. y Cohen-Bazire, G. (1977) Phototrophic prokaryotes: The cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**, 225-291.
- Stark, B. C., Kole, R., Bowman, E. J. y Altman, S. (1978) Ribonuclease P: an enzyme with an essential RNA component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 3717-3721.
- Studier, F.W. y Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130.
- Suhan, M., Chen, S. Y., Thompson, H. A., Hoover, T. A., Hill, A. y Williams, J. C. (1994) Cloning and characterization of an autonomous replication sequence from *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* **176**, 5233-5243.
- Surratt, C. K., Carter, B. J., Payne, R. C. y Hecht, S. M. (1990) Metal ion and substrate structure dependence of the processing of tRNA precursors by RNase P and M1 RNA. *J. Biol. Chem.* **265**, 22513-22519.
- Talbot, S. J. y Altman, S. (1994) Kinetic and thermodynamic analysis of RNA-protein interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 1406-1411.

- Talbot, S. J. y Altman, S.** (1994) Gel retardation analysis of the interaction between C5 protein and M1 RNA in the formation of the ribonuclease P holoenzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 1399-1405.
- Tallsjö, A., Svard, S. G., Kufel, J. y Kirsebom, L. A.** (1993) A novel tertiary interaction in M1 RNA, the catalytic subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3927-3933.
- Tallsjö, A. y Kirsebom, L. A.** (1993) Product release is a rate-limiting step during cleavage by the catalytic RNA subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Nucleic Acids Res.* **21**, 51-57.
- Tandeau de Marsac, N. y Houmard, J.** (1987) Advances in cyanobacterial molecular genetics. En *The cyanobacteria* (Fay, P. y van Baalen, C., eds.) pp 251-302. Elsevier Science Publishers, New York.
- Tanner, M. A. y Cech, T. R.** (1995) An important RNA tertiary interaction of group I and group II introns is implicated in Gram-positive RNase P RNAs. *RNA* **1**, 349-350.
- Thiel, T. y Poo, H.** (1989) Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bacteriol.* **171**, 5743-5746.
- Thomson, V. D., Higgins, G. D. y Gibson, T. J.** (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* **22**, 4673-4680.
- Thurlow, D. L., Shilowski, D. y Marsh, T. L.** (1991). Nucleotides in precursor tRNAs that are required intact for catalysis by RNase P RNAs. *Nucleic Acids Res.* **19**, 885-891.
- Tranguch, A. J. y Engelke, D. R.** (1993) Comparative structural analysis of nuclear RNase P RNAs from yeast. *J. Biol. Chem.* **268**, 14045-14055.
- True, H. L. y Celander, D. W.** (1996) Ribonuclease P of *Tetrahymena thermophila*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16559-16566.
- Vázquez, D.** (1979) Inhibitors of proteins biosynthesis, Springer, New York.
- Vermaas, W. F. J., Rutherford, A. W. y Hansson, O.** (1988) Site-directed mutagenesis in photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: donor D is a tyrosine residue in the D2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8477-8481.

- Vermaas, W. F. J., Williams, J. G. K., Rutherford, A. W., Mathis, P. y Arntzen, C. J.** (1986) Genetically engineered mutant of the cyanobacterium *Synechocystis* 6803 lacks the photosystem II chlorophyll-binding protein CP-47. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 9474-9477.
- Vioque, A., Arnez, J. y Altman, S.** (1988) Protein-RNA interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **202**, 835-848.
- Vioque, A. y Kirsebom, L. A.** (1996) RNase P from bacteria. Substrate recognition and function of the protein subunit. *Mol. Bio. Rep.* **22**, 99-109.
- Vioque, A.** (1989) Protein synthesis inhibitors and catalytic RNA: effect of puromycin on tRNA precursor processing by the RNA component of *Escherichia coli* RNase P. *FEBS Lett.* **246**, 137-139.
- Vioque, A.** (1992) Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **20**, 6331-6337.
- Vioque, A.** (1997) The RNase P RNA from cyanobacteria: short tandemly repeated repetitive (STRR) sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3471-3477.
- Wang, M. J., Davis, N. W. y Gegenheimer, P.** (1988) Novel mechanisms for maturation of chloroplast transfer RNA precursors. *EMBO J.* **7**, 1567-1574.
- Walter, M. R.** (1987) Archean stromatolites: evidence of The Earth's earliest benthos. En *The Earth's earliest biosphere, its origins and evolution* (Schopf, J.W., ed.) pp 187-212. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Williams, J. G. K.** (1988) Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering. *Methods Enzymol.* **167**, 766-778.
- Woese, C. R.** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
- Wolfe, G. R., Cunningham, F. X., Durnford, D., Green, B.R. y Gantt, E.** (1994) Evidence for a common origin of chloroplasts with light-harvesting complexes of different pigmentation. *Nature* **367**, 566-568.
- Wolk, C. P.** (1982) Heterocysts. En *The biology of cyanobacteria* (Carr, N.G, y Whitton, B.A.,eds.) pp 359-386. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

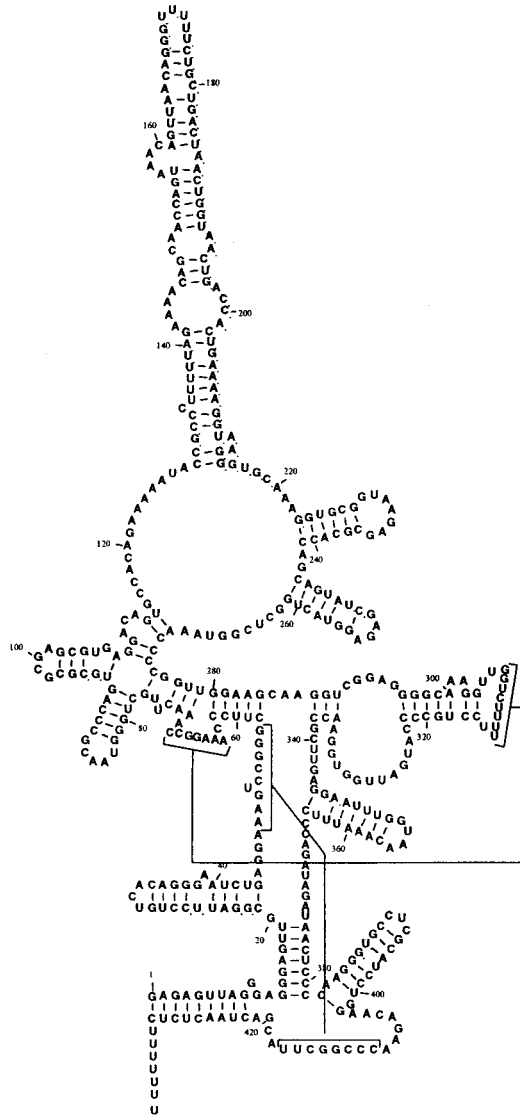
- Wolk, C. P., Vonshak, A., Kehoe, P. y Elhai, J.** (1984) Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1561-1565.
- Warnecke, J. M., Furste, J. P., Hardt, W. D., Erdmann, V. A. y Hartmann, R.** (1996) Ribonuclease P ( RNase P ) is converted to a Cd<sup>2+</sup>-ribozyme by a single Rp-phosphorothioate modification in the precursor tRNA at the RNase P cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8924- 8928.
- Woese, C. R. y Pace, N. R.** (1993) Probing RNA structure, function, and history by comparative analysis. En *The RNA World* (Gesteland, R. F. y Atkins, J. F., eds) pp. 91-117. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Yarus, M.** (1993) How many catalytic RNAs? Ions and the Cheshire cat conjecture. *FASEB J.* **7**, 31-39.
- Zarrinkar, P. P., Wang, J. y Williamson, J. R.** (1996) Slow folding kinetics of RNase P RNA. *RNA* **2**, 564- 573.
- Zimmerly, S., Drainas, D., Sylvers, L. A. y Söll, D.** (1993) Identification of a 100 kDa protein associated with nuclear ribonuclease P activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **217**, 501-507.

## **7. APÉNDICES**



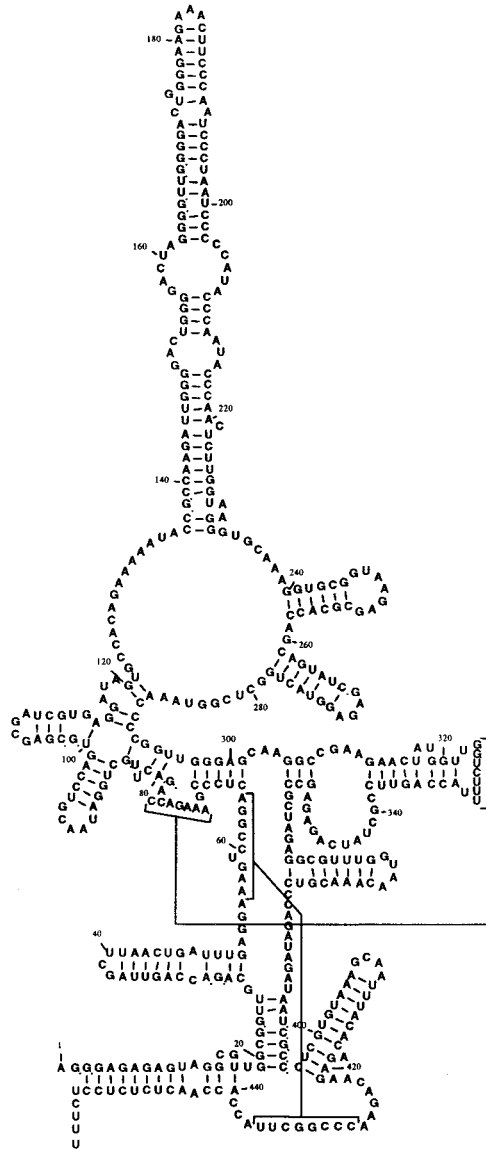
7. APÉNDICES

7.1. APÉNDICE 1. ESTRUCTURAS SECUNDARIAS DE LOS RNAs P UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

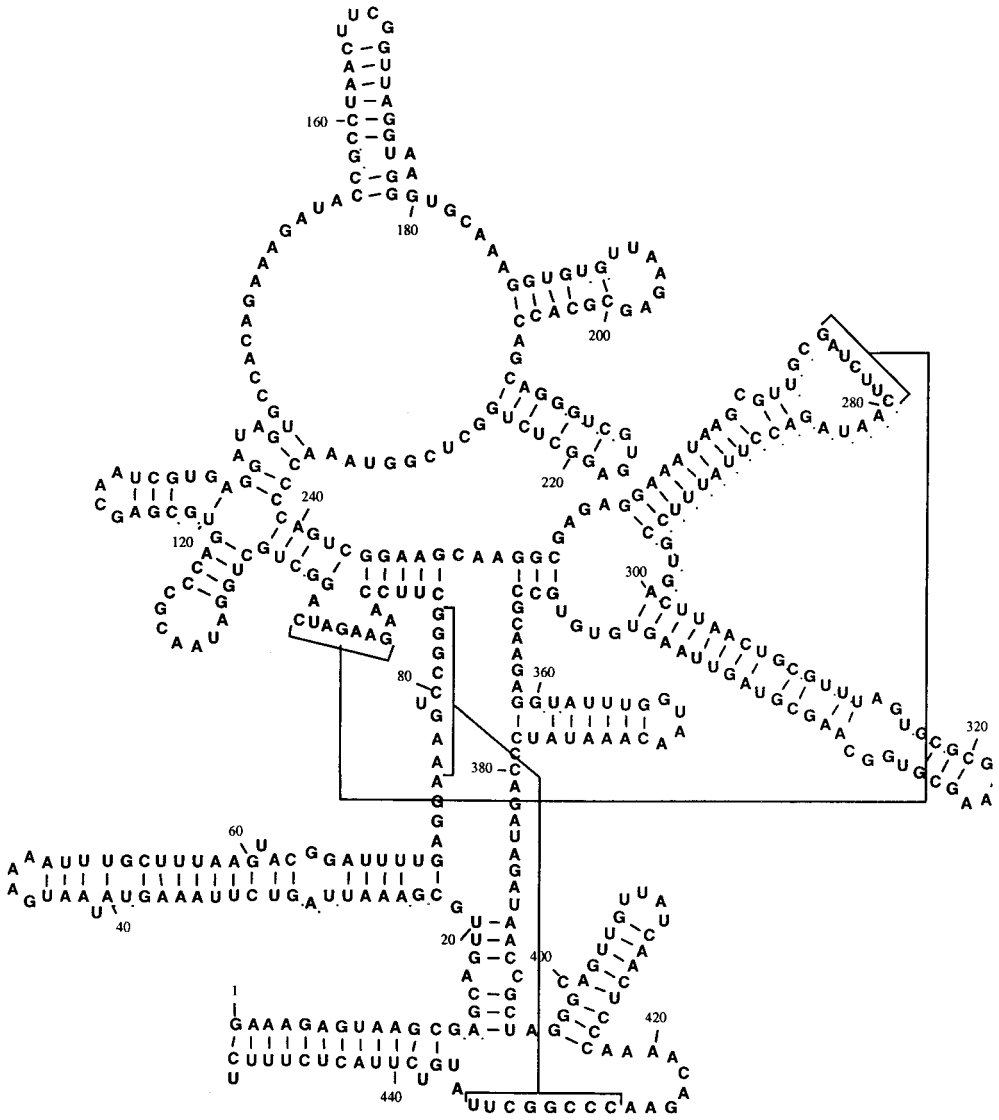


RNA P de *Synechocystis sp. PCC 6803* (Vioque, 1992).

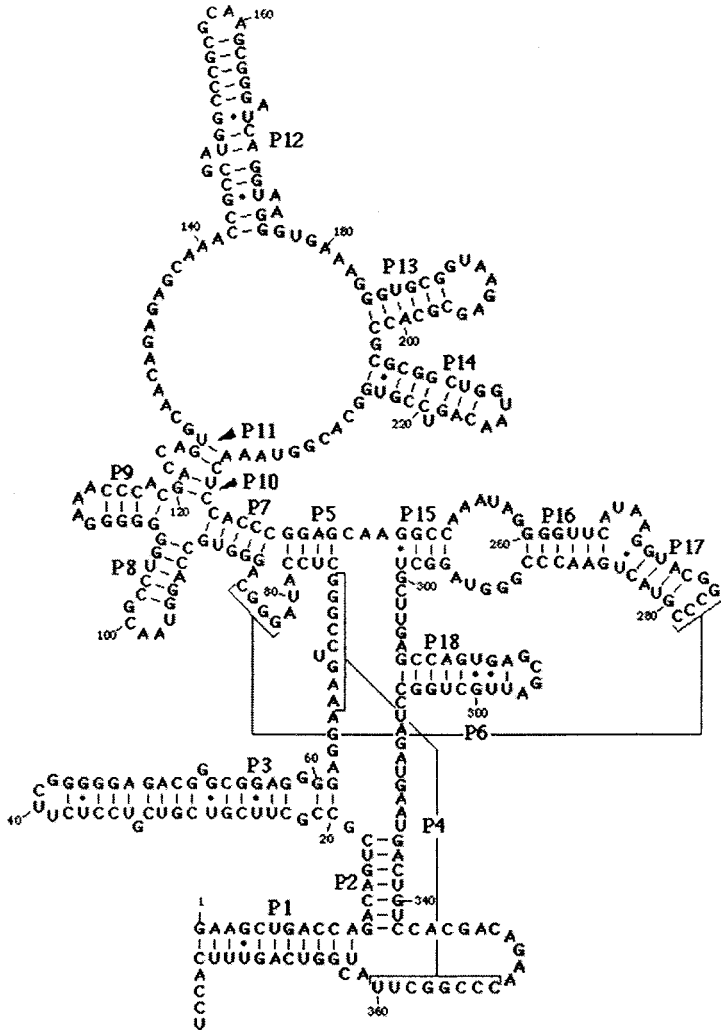




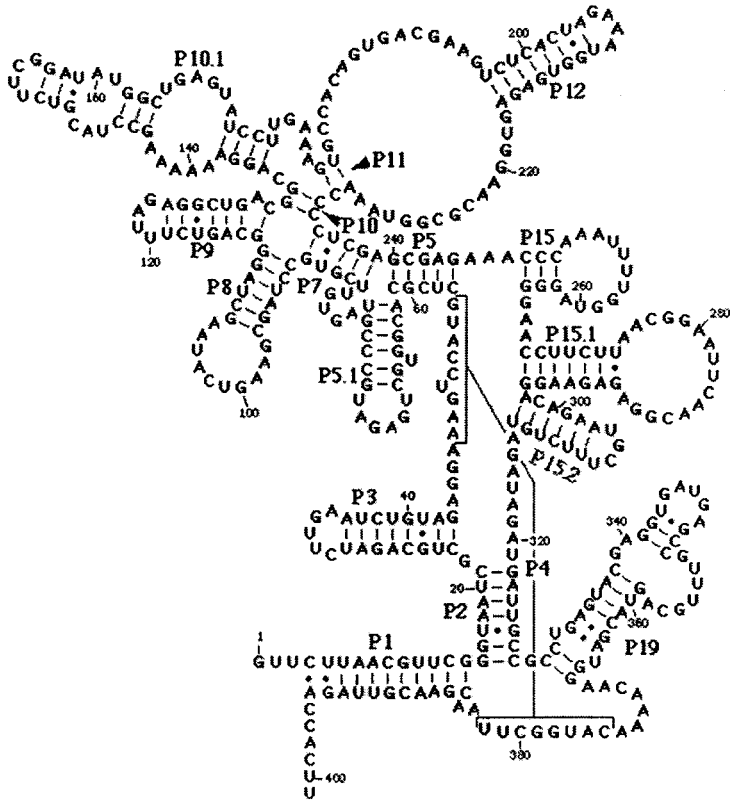
RNA P de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Vioque, 1992).



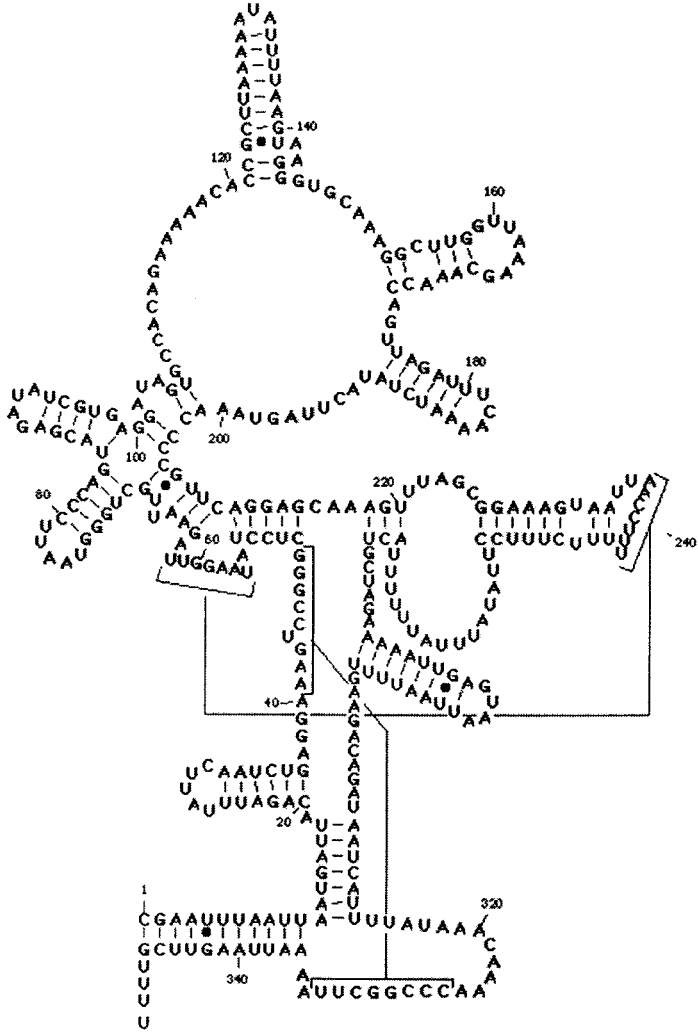
RNA P de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 (esta Tesis).



RNA P de *Escherichia coli* (Brown, 1998).

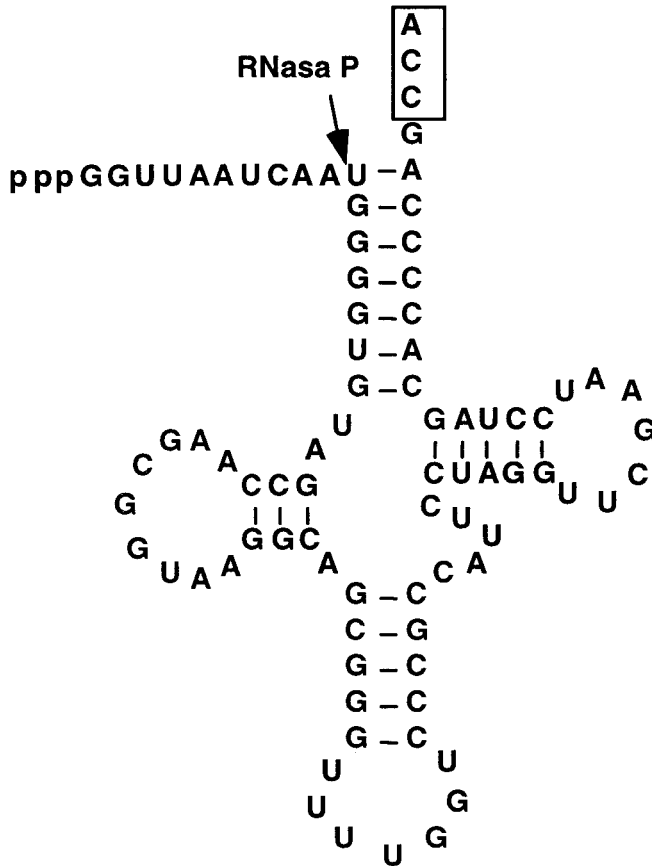


RNA P de *Bacillus subtilis* (Brown, 1998).

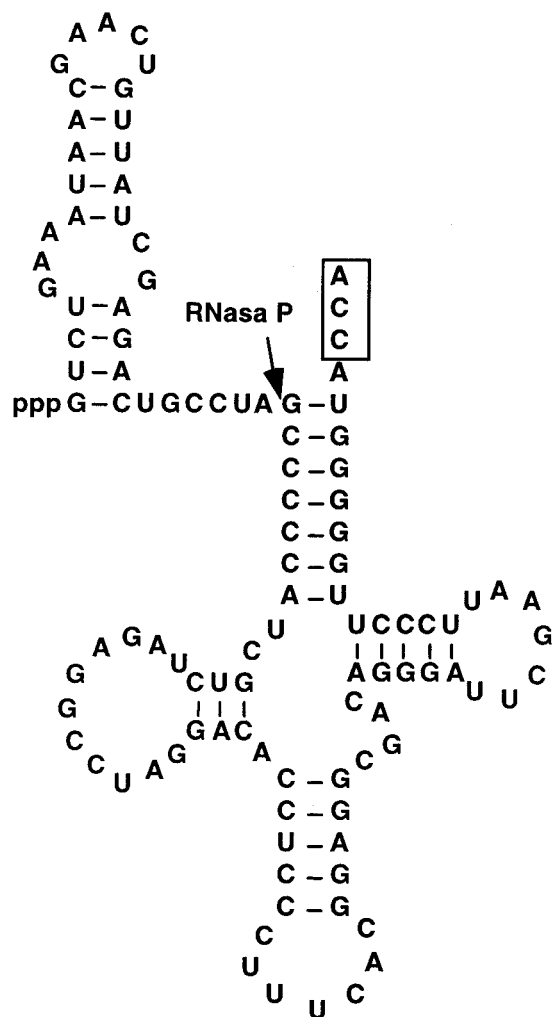


RNA P del cianelo de *Cyanophora paradoxa* (Baum et al., 1996).

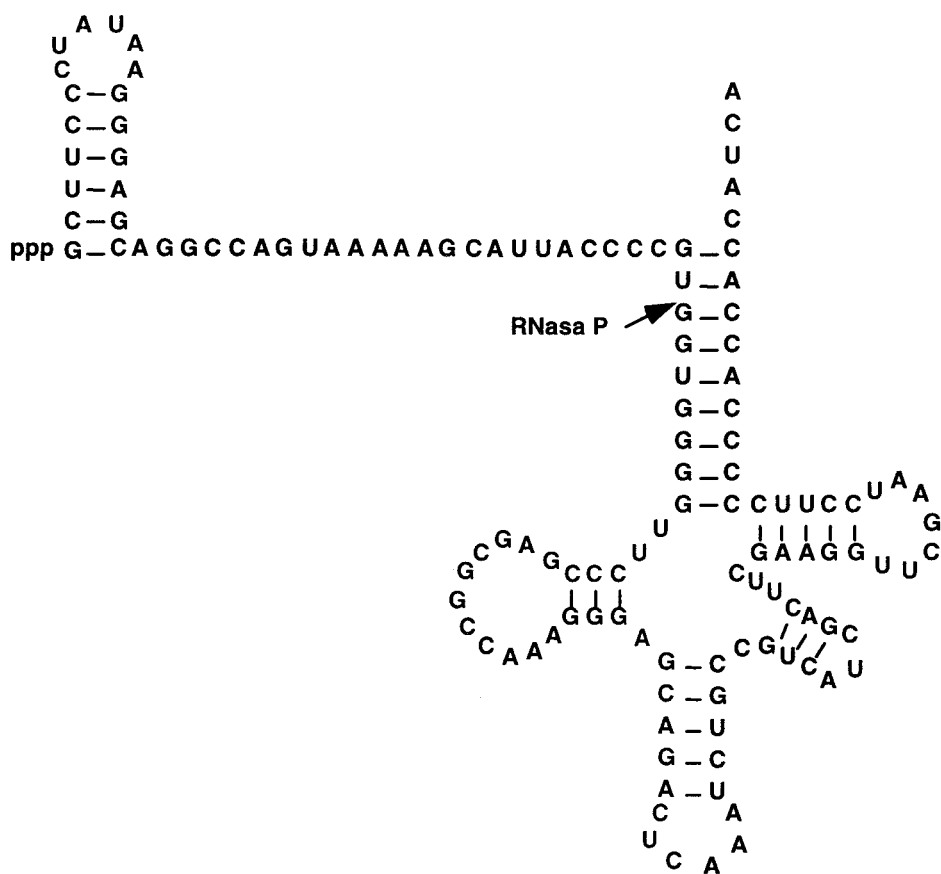
7.2. APÉNDICE 2. ESTRUCTURA SECUNDARIAS DE LOS SUSTRATOS DE LA RNasa P UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO



pre-tRNA<sup>Gln</sup> de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (esta Tesis).

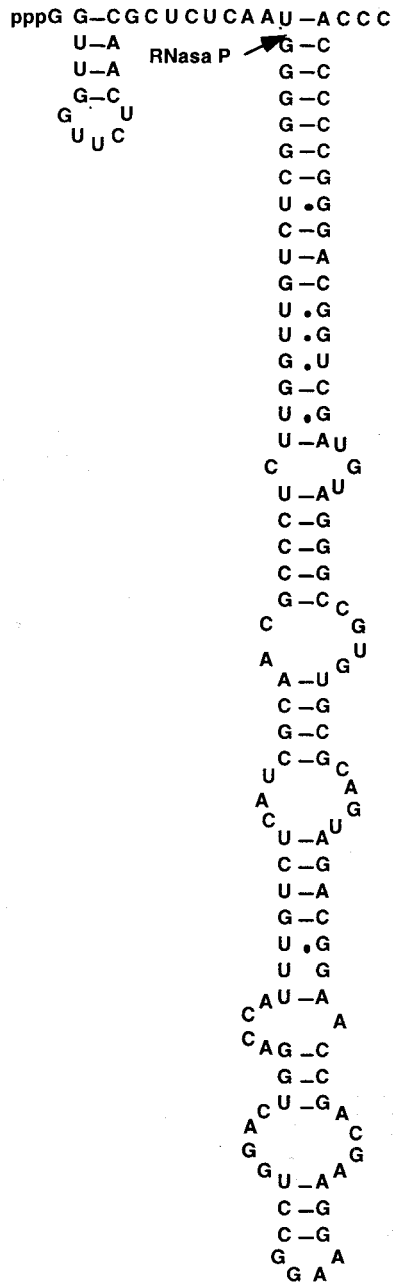


pre-tRNA<sup>Glu</sup> de *Synechocystis* (esta Tesis).



pre-tRNA<sup>Tyr</sup>Su3+ de *E. coli* (Vioque *et al.*, 1988).





RNA pre-4.5S de *E. coli* (Peck-Miller y Altman, 1990).



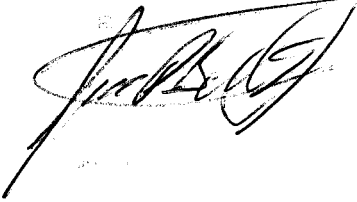
FBI ETD / 414

480854

D. Alberto Pascual Bravo

Estudio funcional de la ribonucleasa P de la  
cianobacteria *Synechocystis* sp PCC 6803

Sobresaliente  
con laude por unanimidad  
doce de marzo de 1999



Juan Carlos

