



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Grupo de Tecnología Enzimática y Celular

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Sustitución del gen *nirA* entre cianobacterias termofílicas. Clonación, expresión y purificación de la nitrito reductasa de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

Memoria presentada por Maite Buxens Azcoaga para optar al grado de
Doctora en Ciencias.

2011

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Universidad del País Vasco la concesión de la beca predoctoral para llevar a cabo este trabajo y a mis directores Juan Luis Serra y María Jesús Llama, por permitir que formase parte de su grupo de investigación, por ayudarme a que el día de hoy por fin llegara, y por sus numerosas aportaciones y correcciones.

Gracias al Prof. J. Berenguer y al Prof. F. de la Cruz por la ayuda prestada.

A todas y todos mis compañeros del laboratorio y alrededores durante todos estos años. En primer lugar a aquellos con los que pasé más tiempo durante los primeros años. A Bego, por ser la primera que vi cuando entré, por cuidar de mi tanto y tan bien, y por nuestros paseos en bici. A Sonia y Javi por solucionar mis primeras dudas. A Eneko, gracias por las ayudas tecnológicas, por aguantarme (casi siempre), y por contestar bien miles de veces a mis mismas preguntas.

A Laura, porque tiene gran parte de la culpa de que esté aquí, por preocuparse por mí, y por contestar en cuestión de minutos a todos mis emails de "Asunto: duditas". A Inés, por ser como es y por confirmar mi creencia de que tener personalidad merece mucho la pena. Por encima de todo, gracias a las dos por nuestras pequeñas grandes reuniones.

Me gustaría agradecer a los compañeros del laboratorio que aún estáis aquí. A Silvia por sus poltergeists, y por llenar los silencios con sus anécdotas tan divertidas. A Noelia y Ainhoa por compartir incubadores y minerales traza, Noe gracias por tenerme en cuenta y preguntar cómo me va todo. A Marta y Joana por aportar puntos de vista tan diferentes y como no, a mi compi Álvaro, por ambientar el laboratorio, por ser un friki de los buenos, y sobre todo por ayudarme siempre sin perder la sonrisa.

También me gustaría acordarme de Pilar, de Aurelio, y de Irati y Kerman de los Servicios Generales, por la ayuda prestada en numerosas ocasiones.

Por terminar con todos los que tenéis que ver con la UPV/EHU, gracias Unai por tus comentarios y visitillas, gracias Cristina por los ratitos de café y gracias Patricia, ya sabes que me alegro mucho de que todo te empiece a ir bien.

Gracias a todos aquellos de los que voy a poder disfrutar tantísimo este verano. Álvaro por animarme y Janne por estar con él. Alfonso por tu humor (Kylling!!) y por ser el padrino perfecto. Igortxu miles de gracias por el cariño y por ver el vaso siempre medio lleno. Luca, Marc, Isa y Jonathan gracias porque sois geniales y porque me encanta ser vuestra tía.

A mis amigas de toda la vida; Sandra, Ixo, y Ainhoa gracias por todos los buenos ratos, y por darme una visión más práctica de la vida. Gracias al resto de mis amigos de la cuadrilla y que ¡vivan los langostinos de los viernes!

A Inma, Mari, Miriam y Rosa, gracias por cuidarme y estar en mi vida desde hace tantos años.

Por último, a los tres que desde hace años sabía que ocuparíais una buena parte de estas líneas. ¡Amoyita, miles de gracias, por ser tan parecida pero tan diferente, por tu faceta cómica, por tus despistes, por tu estilo y sobre todo por ser mi hermana favorita! Mil gracias a mi padre, por los desayunos del Zodiaco, por no escatimar en cariño, y por enseñarme que la perseverancia importa. Otras mil gracias a mi madre, por sus “querer es poder”, y sobre todo por hacerme comprender, después de 29 años, que cada uno debe de ir por su camino sin importar lo que digan o hagan los demás.

A mi familia

“Know where you come from to get where you are going”

Jhumpa Lahiri

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS EMPLEADOS

2-OG	2-Oxoglutarato
Ax	Absorbancia medida a longitud de onda x nm
ABC	ATP-binding cassette
ATP	Adenosín trifosfato
BG11sin	Medio BG11 carente de fuente nitrogenada
BG11sin SA	Medio BG11sin suplementado con amonio
BG11 sin SNI	Medio BG11sin suplementado con nitrito
BSA	Seroalbúmina bovina
DEAE	Dietilaminoetil
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
E	Einstein (μmol de fotones)
EDTA	Ácido N,N,N,N-etilendiamino tetraacético
FD	Ferredoxina
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
$\times g$	Aceleración por gravedad
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
His ₆	Extensión de 6 residuos de histidina
IgG	Inmunoglobulina G
IMAC	Immobilized-metal affinity chromatography
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
Kan	Kanamicina
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Medio Luria-Bertani
LFH-PCR	Long Flanking Homology-PCR
SFH-PCR	Short Flanking Homology-PCR

MFS	Major Facilitator Superfamily
NBT-BCIP	Cloruro de nitro azul tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, sal de toluidino
<i>nirA-nrtABCD-narB</i>	Operón de genes para la asimilación de nitrato/nitrito
NirA	Nitrito reductasa
NarB	Nitrato reductasa
NRT	Transportador ABC de nitrato/nitrito
p/v	Relación peso/volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fosfato inorgánico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
v/v	Relación volumen/volumen
V _{máx}	Velocidad máxima

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. METABOLISMO DEL NITRÓGENO INORGÁNICO EN CIANOBACTERIAS.....	3
1.1.1. Toma de amonio en cianobacterias	4
1.1.2. Transporte de nitrato en cianobacterias.....	4
1.1.2.1. El transportador ABC de nitrato/nitrito	6
1.1.2.2. El transportador MSF de nitrato/nitrito	7
1.1.3. Reducción de nitrato a amonio y asimilación de amonio	8
1.1.4. Regulación de la asimilación de nitrato/nitrito	10
1.1.5. Metabolismo del nitrógeno en <i>Phormidium laminosum</i> y <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1.....	13
1.2. OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO	19
2. TRANSFERENCIA GÉNICA EN CIANOBACTERIAS	21
2.1. INTRODUCCIÓN	23
2.1.1. Transferencia génica en bacterias	23
2.1.1.1. Conjugación	26
2.1.1.2. Transducción.....	26
2.1.1.3. Transformación natural.....	27
2.1.2. Técnicas de manipulación génica en bacterias	34
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.2.1. Microorganismos y condiciones de cultivo	41
2.2.1.1. <i>Phormidium laminosum</i>	41
2.2.1.2. <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1.....	41
2.2.1.3. Medida del crecimiento celular.....	43
2.2.2. Determinación de amonio	44
2.2.3. Purificación de DNA genómico de cianobacterias	45
2.2.3.1. Medida de la concentración del DNA genómico	45
2.2.4. Electroforesis en gel de agarosa	46
2.2.5. Síntesis de los casetes de conversión	47
2.2.5.1. Síntesis del casete C1	50
2.2.5.2. Síntesis del casete C2	53
2.2.6. Construcción de plásmidos de clonaje.....	55
2.2.7. Transformación de células competentes, selección y análisis de clones positivos	57
2.2.8. Secuenciación del DNA.....	57
2.2.9. Purificación del DNA plasmídico.....	58
2.2.10. Transformación natural de células de <i>T. elongatus</i> BP-1.....	58
2.2.10.1. Transformación natural con C1.....	59

2.2.10.2. Transformación natural con C2.....	60
2.2.10.3. Comprobación de mutantes	61
2.2.10.4. Crecimiento de colonias y presión selectiva	64
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
2.3.1. Estrategia para la obtención de células transgénicas de <i>T. elongatus</i> BP-1	65
2.3.1.1. Obtención de células carentes de <i>nirA</i> : <i>T. elongatus</i> BP-1 <i>nirA</i> ⁻ / <i>kat</i> ⁺ ..	67
2.3.1.2. Complementación de células de <i>T. elongatus</i> BP-1 defectivas en <i>nirA</i> , con <i>nirA</i> de <i>P. laminosum</i>	95

3. LA NITRITO REDUCTASA DE *T. ELONGATUS* BP-1..... 109

3.1. INTRODUCCIÓN.....	111
3.1.1. Nitrito reductasa: reducción de nitrito a amonio.....	111
3.1.1.1. Nitrito reductasa de <i>P. laminosum</i>	114
3.1.1.2. Nitrito reductasa de <i>T. elongatus</i> BP-1	114
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	117
3.2.1. Amplificación de DNA mediante PCR.....	120
3.2.2. Construcción del plásmido pQE-30UA-His ₆ NirA	121
3.2.3. Transformación de células competentes.....	122
3.2.4. Métodos colorimétricos.....	122
3.2.4.1. Determinación de proteína.....	122
3.2.4.2. Determinación de nitrito.....	123
3.2.5. Métodos analíticos: electroforesis y <i>Western blot</i>	123
3.2.5.1. Electroforesis.....	123
3.2.5.2. <i>Western blot</i>	125
3.2.6. Expresión y purificación de His ₆ NirA de <i>T. elongatus</i> BP-1.....	126
3.2.7. Digestión de proteínas en gel	127
3.2.8. Cromatografía líquida y espectrometría de masas.	128
3.2.9. Ensayo de la actividad nitrito reductasa.....	129
3.2.10. Caracterización de la actividad nitrito reductasa <i>in vitro</i> catalizada por His ₆ NirA	130
3.2.10.1. Efecto de la temperatura en la actividad	130
3.2.10.2. Estabilidad térmica de His ₆ NirA.....	130
3.2.10.3. Efecto del pH en la actividad	131
3.2.10.4. Propiedades cinéticas de la actividad	131
3.2.10.5. Análisis estadístico de los resultados	131
3.2.11. Obtención de anticuerpos policlonales anti-His ₆ NirA	132
3.2.12. Purificación de la nitrito reductasa de células silvestres de <i>T. elongatus</i> BP-1.....	132
3.2.12.1. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.....	132
3.2.12.2. Preparación de la columna de inmunoafinidad	134
3.2.13. Seguimiento de la expresión <i>in vivo</i> de la proteína NirA	137

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	139
3.3.1. Operón <i>nirA-nrtABCD-narB</i> de <i>T. elongatus</i> BP-1	139
3.3.2. Clonación, expresión y purificación de NirA de <i>T. elongatus</i> BP-1...140	140
3.3.3. Caracterización de His ₆ NirA	154
3.3.3.1. Características espectrales.....	154
3.3.3.2. Características de la actividad nitrito reductasa <i>in vitro</i>	159
3.3.4. Evaluación de los anticuerpos policlonales anti-His ₆ NirA	164
3.3.5. Purificación de NirA de células silvestres de <i>T. elongatus</i> BP-1.....	167
3.3.5.1. Preparación de la columna de inmunoafinidad	167
3.3.5.2. Optimización de la fuente para purificar NirA.....	170
3.3.5.3. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.....	171
3.3.5.4. Cromatografía de inmunoafinidad	173
3.3.6. Expresión de NirA <i>in vivo</i>	177
3.3.6.1. Células crecidas con amonio.....	178
3.3.6.2. Células crecidas con nitrito	180
3.3.6.3. Células crecidas con nitrato.....	182
4. DISCUSIÓN GENERAL	187
5. CONCLUSIONES	197
6. BIBLIOGRAFÍA	203

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Metabolismo del nitrógeno inorgánico en cianobacterias

Las cianobacterias, también conocidas como bacterias azul-verdosas y anteriormente como algas verde-azuladas, se consideran la forma más antigua de vida en la tierra. Existen en torno a 1500 especies de cianobacterias (Nakamura *et al.*, 2002) que desde el punto de vista evolutivo, son responsables de la presencia de O₂ en la atmósfera actual. Estos microorganismos representan un grupo de procariontes, Gram-negativos y fundamentalmente fotoautótrofos, caracterizado por un aspecto metabólico bien definido: llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Para absorber la luz, las cianobacterias poseen pigmentos que les proporcionan sus colores característicos y que permiten su rápida identificación en la Naturaleza.

Constituyen un grupo muy diverso (Madigan *et al.*, 1997), que engloba desde formas unicelulares simples, que se reproducen por fisión binaria, hasta formas filamentosas complejas, que poseen una variedad de tipos celulares muy diferenciados. Poseen sencillos requerimientos nutricionales, pudiendo crecer en ambientes que tan sólo contengan CO₂, agua, luz y algunas sales inorgánicas. Tan escasos requisitos nutricionales, hacen que presenten una distribución ecológica muy amplia, pudiéndose encontrar en nichos muy diversos, como suelos, lagos de agua dulce, océanos y fuentes termales entre otros (Sakamoto *et al.*, 1999).

Las cianobacterias son capaces de asimilar una gran variedad de compuestos nitrogenados, llegando este elemento a alcanzar entre el 5 y el 10% del peso seco celular (Flores y Herrero, 1994). Aunque las fuentes nitrogenadas más abundantes en la Naturaleza son el nitrato, el nitrito y el dinitrógeno, las cianobacterias también pueden crecer con amonio, urea, cianato y algunos aminoácidos (*L*-glutamina y *L*-arginina) como única fuente nitrogenada (Flores y Herrero, 2005). Una vez en el interior celular, se requiere poder reductor para reducir a amonio el nitrato, nitrito y N_2 . El hecho de que esta reducción suponga un gasto energético, explica que el amonio sea la fuente de nitrógeno preferida cuando está presente junto con otras fuentes de nitrógeno combinado (Muro-Pastor y Florencio, 2003).

1.1.1. Toma de amonio en cianobacterias

El amonio puede entrar al interior celular bien sea por difusión, cuando se encuentra como NH_3 , o bien transportado por permeasas específicas, (las denominadas permeasas Amt), cuando se encuentra cargado como NH_4^+ (Montesinos *et al.*, 1998; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002; Muro-Pastor y Florencio, 2003).

1.1.2. Transporte de nitrato en cianobacterias

El nitrato es la principal fuente de nitrógeno para los organismos fotosintéticos, incluyendo cianobacterias, algas y plantas (Guerrero *et al.*, 1981; Guerrero y Lara, 1987).

Prácticamente, todas las cianobacterias pueden asimilar nitrato, y por lo tanto, también nitrito. Entre las excepciones, se encuentran las cepas marinas pertenecientes al grupo *Prochlorococcus* que tienen únicamente los genes para asimilar nitrito (Rocap *et al.*, 2003), y algunas cianobacterias aisladas de fuentes termales con alta concentración de amonio (Miller y Castenholz, 2001).

El primer paso en la asimilación de nitrato es el transporte del anión al interior celular. Las cianobacterias necesitan sistemas específicos para tomar nitrato, ya que generalmente, este ión se encuentra en la Naturaleza a bajas concentraciones (en la escala μM) (Flores *et al.*, 2005). Todos los organismos que toman nitrato de forma activa, tienen como mínimo un transportador de nitrato (NRT) (Aichi *et al.*, 2006).

Hasta el año 2009, en cianobacterias se habían identificado y caracterizado dos transportadores involucrados en la toma activa de nitrato, y se había llegado a la conclusión de que las especies que son capaces de asimilar nitrato, y por lo tanto también nitrito, tenían uno o el otro (Maeda y Omata, 2009). Estos transportadores son el perteneciente a la superfamilia *ATP-binding-cassette* (ABC) (Higgins *et al.*, 1990), y el perteneciente a la superfamilia *major facilitator* (MSF) (Pao *et al.*, 1998).

1.1.2.1. El transportador ABC de nitrato/nitrito

Este transportador multicomponente (**Fig. 1.1**) es capaz de transportar con alta afinidad tanto nitrato como nitrito. En *Synechococcus elongatus* (Tischner y Schmidt, 1984; Rodríguez *et al.*, 1992) se han descrito valores de 1 a 4 μM para la afinidad del transporte de nitrato, y de 30 μM en *Anabaena sp* PCC 7120 (Meeks *et al.*, 1983). Este transportador constituye una permeasa situada en la membrana plasmática, y en la mayoría de las cianobacterias tiene la estructura NrtA, NrtB, NrtC y NrtD.

- NrtA es una de las proteínas más abundantes de la membrana citoplásmica (Sazuka, 2003). Consiste en una lipoproteína de localización periplásmica, que muestra alta afinidad para unir nitrato y/o nitrito. Su función consiste en captar cualquiera de estos aniones del espacio periplásmico y transferirlo a la permeasa de membrana constituida por dos subunidades de NrtB (Koropatkin *et al.*, 2006).
- NrtB es una proteína dimérica transmembranal muy hidrofóbica que permite el paso del nitrato/nitrito a través de la membrana plasmática y en contra del gradiente de concentración. Este transporte activo está ligado a la hidrólisis de ATP catalizada por las subunidades NrtC y NrtD.
- La subunidad NrtC está anclada a NrtB en el espacio citoplásmico y consta de dos dominios. El dominio N-terminal contiene los motivos de unión a ATP, mientras que el C-terminal muestra una elevada homología con NrtA (Omata *et al.*, 1993).

- La subunidad NrtD se localiza como NrtC, pero posee un único dominio para unir ATP análogo al de NrtC. Tanto NrtC como NrtD catalizan *in vitro* la hidrólisis de ATP (Llarena *et al.*, 2006).

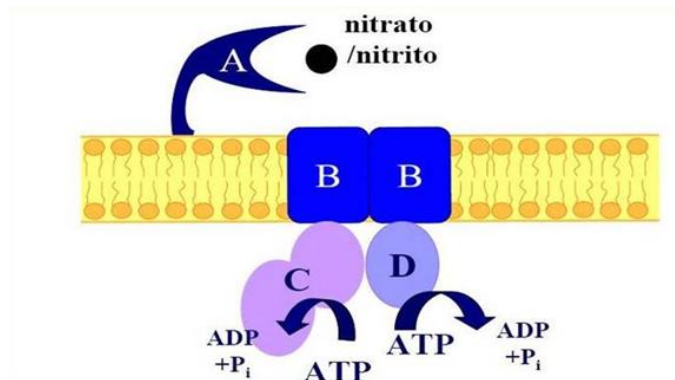


Figura 1.1. Esquema general de las subunidades integrantes del transportador ABC de nitrato/nitrito de cianobacterias. A: NrtA. B: NrtB. C: NrtC. D: NrtD (Adaptado de Omata, 1995).

1.1.2.2. El transportador MSF de nitrato/nitrito

Este transportador se ha identificado en cepas marinas de *Prochlorococcus* y algunas especies dulceacuícolas, como por ejemplo *Nostoc punctiforme* ATCC 29133 (Aichi *et al.*, 2006). Está codificado por un único gen, *nrtP*, y tiene menor afinidad por nitrito que por nitrato (Sakamoto *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000).

1.1.3. Reducción de nitrato a amonio y asimilación de amonio

Una vez incorporado el nitrato al citoplasma cianobacteriano, este anión es reducido a amonio por la acción secuencial de las actividades nitrato reductasa (ferredoxina:nitrato oxidoreductasa, EC 1.7.7.2, NaR) y de la nitrito reductasa (ferredoxina:nitrito oxidoreductasa, EC 1.7.7.1, NiR) (Guerrero y Lara, 1987).

El amonio resultante de la reducción del nitrato o del nitrito, así como el tomado directamente del medio, se combina con el *L*-glutamato en una reacción catalizada por la glutamina sintetasa (*L*-glutamato:amonio ligasa [formadora de ADP], EC 6.3.1.2, GS) para proporcionar *L*-glutamina. Este enzima supone un punto clave en la asimilación de nitrato/nitrito, encontrándose regulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Flores y Herrero, 1994). En el siguiente etapa, la *L*-glutamina obtenida reacciona con el 2-oxoglutarato para proporcionar 2 moléculas de *L*-glutamato, en una reacción catalizada por la actividad glutamato sintasa (*L*-glutamina:2-oxoglutarato amidotransferasa, EC 1.4.7.1, GOGAT) (**Fig. 1.2**).

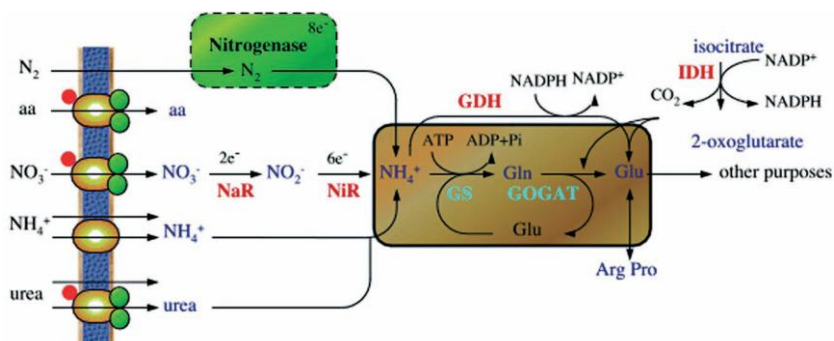


Figura 1.2. Asimilación de nitrógeno en cianobacterias. La fijación de N_2 tiene lugar sólo en algunas cianobacterias diazotrofas. aa: aminoácidos. GDH: glutamato deshidrogenasa. IDH: isocitrato deshidrogenasa (tomado de Muro-Pastor y Florencio, 2003).

Frecuentemente, los genes involucrados en la toma y reducción de nitrato/nitrito se encuentran formando un operón, que generalmente sigue la estructura *nirA-gen(es) de la permeasa-narB* (**Fig. 1.3**). Esta organización génica está muy conservada en cianobacterias, y asegura una producción equilibrada de las distintas proteínas responsables de la reducción/asimilación del nitrato, ya que la expresión de estos genes disminuye en dirección 5'-3' (Frías *et al.*, 1997).

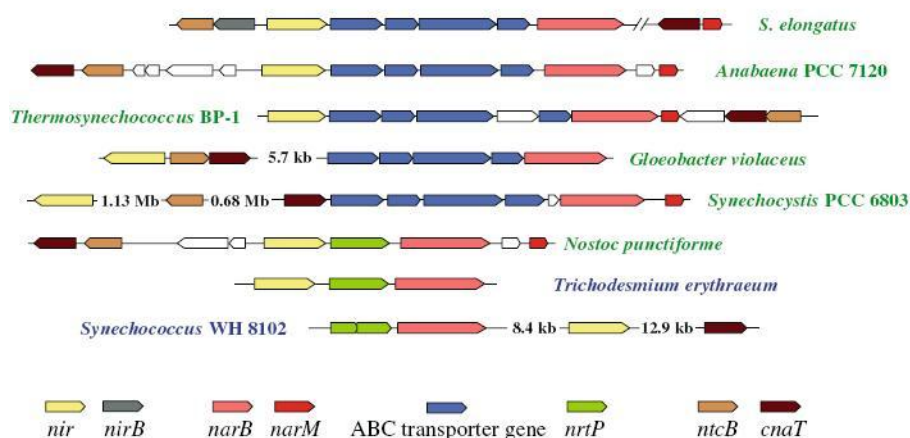


Figura 1.3. Agrupaciones de algunos genes involucrados en la asimilación de nitrato de distintas cianobacterias. *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Gloebacter violaceus* PCC 7421, *Synechocystis* sp. CC6803, *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, *Trichodesmium erythraeum*, *Synechococcus* sp. WH 8102. Los nombres en verde indican que se tratan de cianobacterias de agua dulce, excepto la cianobacteria terrestre *Nostoc punctiforme*. Los nombres en azul indican que son cianobacterias marinas. La flechas blancas señalan marcos de lectura abiertos que codifican proteínas con función desconocida (tomado de Flores *et al.*, 2005).

1.1.4. Regulación de la asimilación de nitrato/nitrito

En algunas cianobacterias, la asimilación de nitrato/nitrito se ha estudiado tanto a nivel de expresión génica como de las actividades de las proteínas implicadas. Así, estudios realizados en *Anabaena* sp. PCC7120 y *Synechocystis* sp. PCC6803 han permitido averiguar que la expresión a nivel de mRNA del operón *nirA-nrtABCD-narB* tiene lugar cuando se elimina el amonio del medio de cultivo, y que los niveles de expresión son aún mayores en presencia de nitrato en el medio (Luque *et al.*, 1994; Frías *et al.*, 1997). Estos resultados también han sido confirmados en algunas cepas de *Synechococcus*, en las que los genes que codifican la permeasa (nrtP) y las reductasas se expresan como transcritos independientes (Sakamoto *et al.*, 1999; Bird y Wyman, 2003).

A nivel de actividades enzimáticas, se ha observado que los niveles de nitrato y nitrito reductasa, son menores en células crecidas con amonio que con nitrato (Herrero y Guerrero, 1986; Arizmendi, 1989; Sanz, 2003). Sin embargo, estos niveles son distintos en células no fijadoras de N₂ atmosférico que en células diazotróficas. Mientras que en *P. laminosum* (Fresnedo y Serra, 1992; Garbisu *et al.*, 1992; Sanz, 2003) y *S. elongatus* (Suzuki *et al.*, 1993) se han detectado niveles apreciables de estas actividades en ausencia de nitrato o de nitrito, estas actividades no se detectan en cianobacterias capaces de fijar N₂ atmosférico. Este fenómeno apunta a que la expresión del operón *nirA-nrtABCD-narB* en fijadoras de N₂ atmosférico, no sólo está regulada por la represión causada por amonio, sino que también está regulada por la inducción originada por la presencia de nitrato (Flores y Herrero, 1994).

La regulación de la asimilación de nitrato/nitrito muestra pequeñas diferencias entre distintas cianobacterias. Esta heterogeneidad hace difícil establecer un único modelo de regulación para todas ellas. Sin embargo, queda patente que existen 2 puntos clave en la regulación: el efecto regulador del 2-oxoglutarato (2-OG) y de la actividad GS. En cianobacterias, la síntesis de 2-OG supone el último paso del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, dado que no existe la actividad 2-OG deshidrogenasa (Herrero *et al.*, 2001). Este oxoácido actúa como sensor del balance carbono/nitrógeno intracelular, y regula la conversión de *L*-glutamina en *L*-glutamato (Muro-Pastor *et al.*, 2001).

La actividad de la GS está regulada tanto transcripcional como post-transcripcionalmente. En este segundo caso, la regulación está ejercida por los péptidos IF7 e IF17, que a su vez son reprimidos por la proteína NtcA, una de las proteínas claves en la regulación. Así, NtcA sólo se expresa cuando es alta la relación carbono/nitrógeno. Es un conocido factor bacteriano de transcripción, tanto activador como represor, y que en su estructura contiene un motivo de unión al DNA de tipo hélice-giro-hélice.

Estudios *in vitro* han demostrado que NtcA se une a la secuencia consenso palindrómica GTAN₈TAC, que se suele encontrar a -41.5 pb respecto al inicio de la transcripción (Jiang *et al.*, 2000; Herrero *et al.*, 2001; Muro-Pastor y Florencio, 2003). Los promotores dependientes de NtcA también presentan a 22-23 pb una caja -10 (TAN₃T) similar a la de los promotores de σ^{70} de *E.coli* (**Fig. 1.4**).

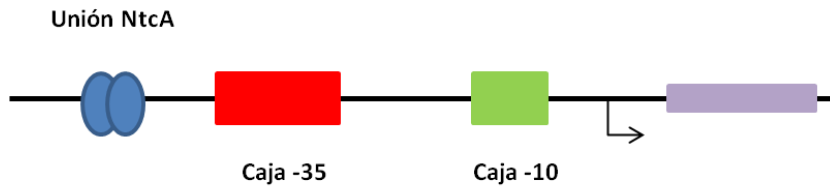


Figura 1.4. Representación esquemática de los promotores activados por NtcA. En azul la proteína NtcA unida a su promotor en su forma dimérica. En morado se muestra el gen cuya transcripción estaría regulada por NtcA. En rojo y en verde las cajas -35 y -10, respectivamente (tomado de Muro-Pastor y Florencio, 2003).

La actividad de NtcA está regulada, fundamentalmente, por dos factores: la proteína P_{II} y el 2-OG. Así, P_{II} regula negativamente la actividad de NtcA uniéndose a PipX, un coactivador de NtcA. Cuando existe limitación de nitrógeno, el 2-OG se une a P_{II} impidiendo que esta proteína ejerza su efecto negativo en la asimilación de nitrato/nitrito (Lee *et al.*, 2000; Espinosa *et al.*, 2007; Ohashi *et al.*, 2011).

Existen algunos promotores dependientes de NtcA que parecen necesitar otros reguladores adicionales de la transcripción, como por ejemplo narM (Maeda y Omata, 2004), el factor de transcripción NtcB (Aichi y Omata, 1997; Aichi *et al.*, 2001), así como la presunta glicosil transferasa CnaT (Frías *et al.*, 2003) (**Fig. 1.3**).

1.1.5. Metabolismo del nitrógeno en *Phormidium laminosum* y *Thermosynechococcus elongatus* BP-1

Phormidium laminosum es una cianobacteria termofílica, no fijadora de N₂ atmosférico, perteneciente a la Orden Oscillatoriales. Sus células son de color verde y forman filamentos simples envueltos en una vaina mucilaginosa (**Fig. 1.5**). Se reproduce por liberación de hormogonios sin vaina y móviles. En hábitats naturales, *P. laminosum* se encuentra principalmente en fuentes termales donde crece incluso a 60°C, aunque su temperatura óptima de crecimiento en laboratorio está comprendida entre 40 y 45°C.

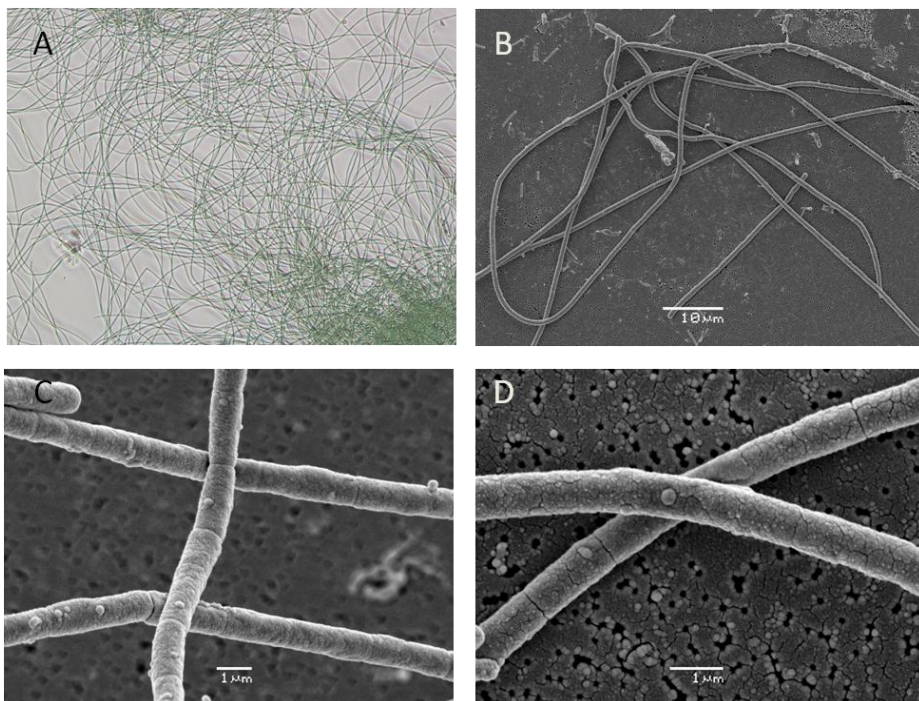


Figura 1.5. (A). Imagen de *P. laminosum* obtenida por microscopía óptica (microscopio Nikon Eclipse 50i A 20×). **(B-D).** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes de SEM (Figs 1.5 y 1.6) fueron obtenidas en el Servicio de Microscopía de la Universidad de León.

P. laminosum ha sido la cianobacteria modelo objeto de estudio durante los últimos casi treinta años en el *Grupo de Tecnología Enzimática y Celular* de la UPV/EHU en el que se ha realizado este trabajo. En la **Tabla 1.1** se resumen los logros más importantes alcanzados por el grupo investigador.

Tabla. 1.1. Principales logros alcanzados en el estudio del metabolismo del nitrógeno en *P. laminosum* como cianobacteria modelo por el Grupo de Tecnología Enzimática y Celular de la UPV/EHU. Se incluyen los principales resultados tanto de investigación básica como de algunas aplicaciones biotecnológicas.

Logro alcanzado	Referencias
Investigaciones básicas	
Caracterización del transporte de nitrato /nitrito	Garbisu <i>et al.</i> , 1992; Sanz <i>et al.</i> , 2002
Estudio del efecto de la deficiencia nitrogenada	Fresnedo <i>et al.</i> , 1991; Fresnedo y Serra, 1992; Ochoa de Alda <i>et al.</i> , 1996 a; Tapia <i>et al.</i> , 1996 b
Estudio de la regulación del metabolismo del nitrógeno	Martínez-Bilbao <i>et al.</i> , 1987; Arizmendi <i>et al.</i> , 1987; Tapia <i>et al.</i> , 1995; 1996 a; Ochoa de Alda <i>et al.</i> , 1996 b
Clonación, expresión y purificación de NtcA	Maza <i>et al.</i> , 2006
Purificación y caracterización de la nitrato reductasa	Blanco <i>et al.</i> , 1992
Purificación y caracterización de la nitrito reductasa	Arizmendi <i>et al.</i> , 1990

Purificación y caracterización de la glutamina sintetasa	Blanco <i>et al.</i> , 1989
Purificación y caracterización de la glutamato deshidrogenasa	Martínez-Bilbao <i>et al.</i> , 1988
Purificación y caracterización de la NADP-isocitrato deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Pardo <i>et al.</i> , 1999; Fernández-Plágaro <i>et al.</i> , 2002
Identificación del operón de genes para la asimilación de nitrato	Merchán, 1993; Merchán <i>et al.</i> , 1995
Clonación, expresión y caracterización de las subunidades del transportador ABC de nitrato/nitrito	Nagore <i>et al.</i> , 2003; 2006 Llarena, 2005; Llarena <i>et al.</i> , 2006
Transferencia de genes entre cianobacterias	Buxens <i>et al.</i> , 2008; 2009; 2010; 2011, Este trabajo
Aplicaciones biotecnológicas	
Fotoproducción de amonio	Martínez <i>et al.</i> , 1989
Biorremediación de aguas contaminadas con fertilizantes nitrogenados	Garbisu <i>et al.</i> , 1991; 1994

Durante el estudio del metabolismo del nitrógeno de *P. laminosum* se han encontrado algunas limitaciones impuestas, principalmente, por su morfología filamentosa, y por el hecho de que su genoma no ha sido aún secuenciado. Estas dificultades limitan la aplicación de algunas técnicas empleadas para el estudio del operón *nirA-nrtABCD-narB* en otras cianobacterias. Para superarlas, se ha propuesto cambiar de organismo modelo a una cianobacteria que no presente los inconvenientes propios de *P. laminosum*.

La cianobacteria elegida ha sido *Themosynechococcus elongatus* BP-1. Si bien se ha cambiado de cianobacteria modelo, la finalidad de este cambio era poder integrar la información adquirida anteriormente sobre el operón *nirA-nrtABCD-narB* de *P. laminosum* en *T. elongatus* BP-1.

Esta cianobacteria también termofílica y no fijadora de N₂ atmosférico, es unicelular y su genoma ha sido secuenciado y publicado (**Fig. 1.6**). *T. elongatus* BP-1 fue aislada de un manantial en Beppu, Japón (Yamaoka *et al.*, 1978) y crece en el laboratorio a una temperatura óptima de 55°C. Se trata de un organismo fotoautótrofo obligado, pigmentado con clorofila *a*, carotenoides y ficocianobilinas.

Cabe destacar que su análisis filogenético, empleando secuencias de 16S rRNA, indica que se diversificó al comienzo del origen de las cianobacterias (Nakamura *et al.*, 2002). El rasgo más distintivo de *T. elongatus* BP-1 es su acentuado carácter termofílico, y por tanto, la alta termoestabilidad de sus proteínas y complejos proteicos. Esta sobresaliente característica, junto con la disponibilidad de la completa secuenciación de su genoma (Nakamura *et al.*, 2002) han impulsado el desarrollo de estrategias de ingeniería genética específicas para su transformación (Iwai *et al.*, 2004; Onai *et al.*, 2004).

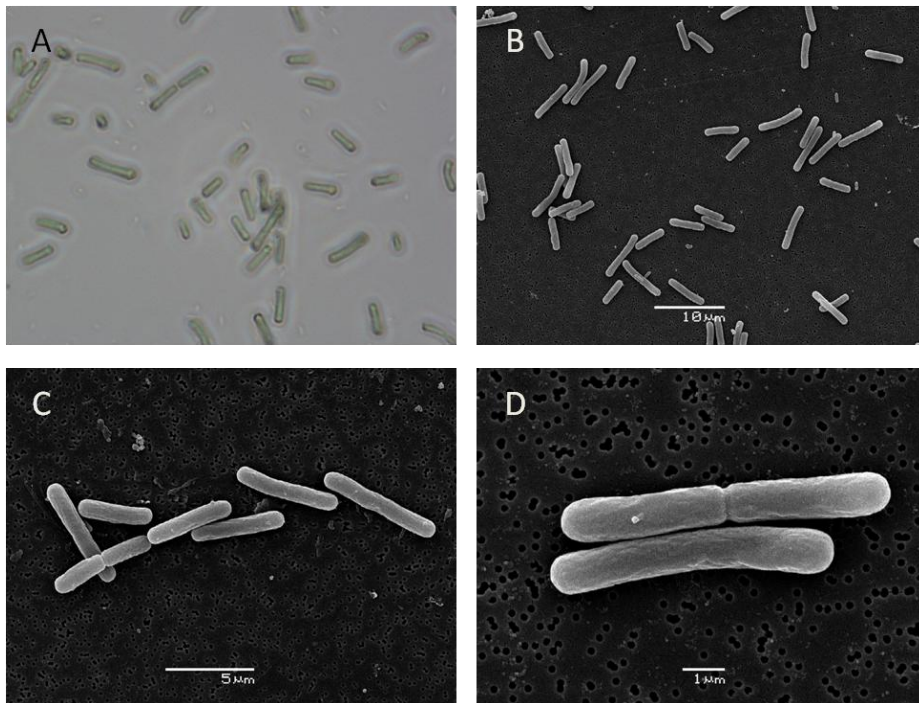


Figura 1.6. (A) Imagen de *T. elongatus* BP-1 obtenida por microscopía óptica (microscopio Nikon Eclipse 50i A 40×). (B-D). Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Aunque son similares las estructuras del operón *nirA-nrtABCD-narB* de *P. laminosum* y de *T. elongatus* BP-1 (**Fig. 1.7**) entre ambos existen dos diferencias significativas.

Así, en *T. elongatus* BP-1 existe un marco de lectura abierto entre los genes *nrtC* y *nrtD* que no se ha identificado en *P. laminosum*. Dicho marco de lectura codifica una posible transposasa (Nakamura *et al.*, 2002).

La otra diferencia importante entre ambos operones es la longitud de las regiones intergénicas. En *P. laminosum*, las zonas intergénicas son más largas que en *T. elongatus* BP-1. Las secuencias intergénicas *nirA-nrtA-nrtB-nrtC-nrtD* de *P. laminosum*, comprenden fragmentos de 267, 171, 114 y 98 pb respectivamente, y se ha determinado que debido a la ausencia de secuencias promotoras en estas zonas, estos genes se transcriben en un mismo transcrito. Sin embargo, en *P. laminosum* los genes *nrtD* y *narB*, están separados por una región de mayor longitud (623 pb), que consta de cinco bloques de aproximadamente 100 pb que presentan secuencia palindrómica. La existencia de una posible secuencia promotora en esta región, sugiere que el gen *narB* podría transcribirse de forma independiente al resto de genes que forman parte del operón (Llarena, 2005).

Aunque ya es conocido el genoma de *T. elongatus* BP-1 (Nakamura *et al.*, 2002), en esta cianobacteria todavía no ha sido estudiado el metabolismo del nitrógeno.

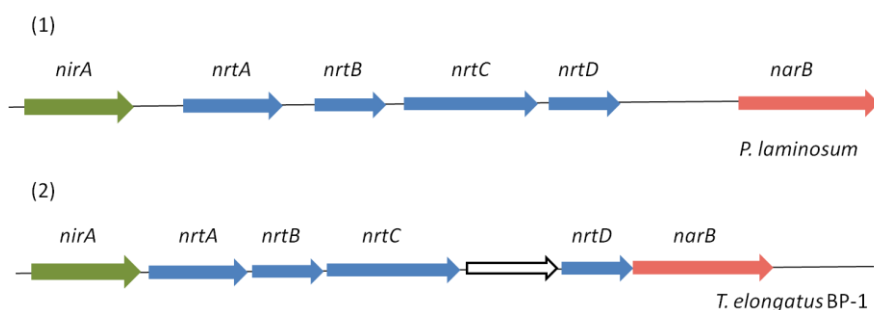


Figura 1.7. Operón *nirA-nrtABCD-narB* (1) de *P. laminosum* y (2) de *T. elongatus* BP-1. La flecha blanca señala un marco de lectura abierto

1.2. Objetivos de este trabajo

Como se ha indicado anteriormente, han sido numerosas las contribuciones en el conocimiento del metabolismo del nitrógeno en la cianobacteria *P. laminosum* realizados en el Grupo de Tecnología Enzimática y Celular de la UPV/EHU en el que se ha realizado este trabajo (**Tabla 1.1**). Sin embargo, esta cianobacteria presenta desventajas con respecto a otras, que se están imponiendo en los últimos años como modelo, tal es el caso de *T. elongatus* BP-1. Con la intención de integrar la información adquirida anteriormente en el metabolismo del nitrógeno de *P. laminosum*, además de avanzar en el conocimiento de nuevos aspectos del mismo en la cianobacteria *T. elongatus* BP-1, para el desarrollo del presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Diseñar una técnica que permitiera sustituir el gen *nirA* de *T. elongatus* BP-1 por el correspondiente gen de *P. laminosum*.
 - Optimizar la técnica de transformación
 - Caracterizar la viabilidad de las células quiméricas
2. Clonar, expresar y purificar NirA de *T. elongatus* BP-1.
3. Obtener anticuerpos contra la proteína recombinante NirA de *T. elongatus* BP-1 con el doble objetivo de:
 - Purificar por cromatografía de inmunoafinidad la NirA de células silvestres de *T. elongatus* BP-1
 - Emplear los anticuerpos para analizar la expresión *in vivo* de NirA en células silvestres de *T. elongatus* BP-1

2. TRANSFERENCIA GÉNICA EN CIANOBACTERIAS

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. **Transferencia génica en bacterias**

Los avances en el conocimiento de la transferencia de DNA en y entre bacterias, se han desarrollado en un contexto creado por la necesidad de analizar y modificar genes en el ámbito de la investigación biológica moderna. Dicho análisis persigue comprender los procesos que se dan de manera natural en y entre bacterias, para poder utilizarlos posteriormente como técnicas de manipulación genética. Dicho de otro modo, todos los procesos empleados en estas técnicas no son más que una imitación "dirigida" de lo que ocurre de forma espontánea en la Naturaleza.

Aunque muchos de los microorganismos modelo bacterianos que se han estudiado son haploides, existen bacterias que poseen organizaciones más complejas de su material genético. Así, algunos sistemas bacterianos constan de cromosomas múltiples (Baril *et al.*, 1989; Suwanto y Kaplan, 1992; Allardet-Servent *et al.*, 1993; Choudhary *et al.*, 1994; Goodner *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001), mientras que otros contienen múltiples copias de su único cromosoma (Kaneko *et al.*, 1996; Taroncher-Oldenburg y Stephanopoulos, 2000; Nakamura *et al.*, 2002). A pesar de la heterogeneidad estructural existente en bacterias, en todas ellas existe un movimiento continuo de material genético tanto si se trata de células con organizaciones genómicas simples o más complejas.

El DNA móvil puede provenir de la propia bacteria (por transferencia génica intracelular), o del exterior de la misma (por transferencia génica horizontal). En este segundo caso, el DNA adquirido proviene del liberado por células descompuestas por autólisis (Lorenz y Wackernagel, 1994), o de partículas virales y células viables, que bien lo secretan al medio extracelular (Thomas y Nielsen, 2005; Hamilton y Dillard, 2006), o lo ceden por otros mecanismos. El DNA así liberado será más o menos estable en función de la presencia y actividad de nucleasas y sustancias reactivas presentes en el medio. Para explicar la evolución de los sistemas de adquisición de DNA existen tres modelos, no excluyentes:

- Búsqueda de diversidad genética. Supone adquirir DNA a modo de información genética útil. Por ejemplo, para nuevas funciones metabólicas o genes que aportan resistencia a antibióticos.
- Reparación de daños en el DNA. Se trata de emplear DNA de bacterias semejantes como molde para reparar errores en las moléculas de su propio DNA.
- DNA como nutriente. Supone utilizar DNA como fuente de carbono, nitrógeno y fósforo.

El análisis de los genomas bacterianos revela que una cantidad significativa de su material genético ha sido adquirida de otras fuentes por transferencia génica horizontal. De esta manera, se ha identificado este mecanismo como responsable de la plasticidad de los genomas y como motor de la evolución de muchos procesos fisiológicos (Boucher *et al.*, 2003; Bordenstein y Reznikoff, 2005). La capacidad celular de adquirir DNA del exterior e incorporarlo a su información genética, está apoyado por dos grandes evidencias.

En primer lugar, los microorganismos son capaces de explotar ambientes muy diversos y de responder a diferentes presiones selectivas (Davison, 1999). Esta capacidad adaptativa es más probable que haya ocurrido por transferencia génica horizontal que por la modificación secuencial de genes como resultado de la acumulación de mutaciones puntuales. El DNA así transferido ha permitido que determinadas células puedan adaptarse y sobrevivir bajo condiciones ambientales muy diversas.

En segundo lugar, la transferencia génica queda patente por la alta frecuencia con la que se encuentran en la Naturaleza genes idénticos, o partes idénticas de genes entre organismos relacionados o no evolutivamente. Diversos estudios muestran que existen redes de intercambio génico entre bacterias y en menor medida entre bacterias y hongos, plantas y animales. El análisis genómico de bacterias y arqueas muestra que las regiones adquiridas por transferencia génica horizontal suponen una media del 6% del contenido génico total (Dufraigne *et al.*, 2005). Además, aproximadamente el 3% de los genes de la mayoría de bacterias han sido adquiridos de arqueas y eucariotas (Aravind *et al.*, 1998; Nelson *et al.*, 1999).

En bacterias se han identificado tres mecanismos para la transferencia génica horizontal: conjugación, transducción y transformación natural.

2.1.1.1. **Conjugación**

Este proceso es el que requiere un mayor número de condiciones. Para tener lugar, es necesario que exista un estrecho contacto célula-célula y que, además, existan elementos genéticos móviles capaces de replicarse de forma autónoma (plásmidos). Los plásmidos mejor conocidos son moléculas de DNA de doble hebra circulares y cerradas covalentemente. Sin embargo, también existen plásmidos de DNA monocatenario en multitud de especies (Hinnebusch y Tilly, 1993). En ambos casos se trata de un conjunto de genes, generalmente no esenciales para la célula, que se encuentran organizados en una entidad estable y autónoma que debe replicarse, controlar su propio número de copias y asegurar su herencia en cada una de las divisiones celulares (Davison, 1999).

2.1.1.2. **Transducción**

Mediante este proceso, el DNA pasa de una bacteria a otra a través de virus. Estos virus, que reciben el nombre de bacteriófagos, son una de las entidades biológicas más abundantes de la Biosfera, ya que son relativamente estables al estar protegidos por una cubierta proteica.

Los bacteriófagos pueden envolver al azar segmentos del DNA de su célula hospedadora e inyectarlo a otra donde podrá ser integrado en el genoma. Generalmente, los bacteriófagos tienen una gama reducida de hospedadores, en algunas ocasiones, incluso están limitados a una única especie bacteriana (Davison, 1999). Los genomas de los fagos pueden estar compuestos tanto de DNA monocatenario como de DNA de doble hebra, o de RNA, y sus tamaños pueden variar desde unas pocas pares de bases hasta 100 kb.

2.1.1.3. **Transformación natural**

Es el mecanismo de transferencia de DNA más antiguamente conocido y que tiene una gran importancia histórica, ya que supuso la primera evidencia de que el DNA es el material genético (Griffith, 1928). Consiste en la adquisición de DNA desnudo del ambiente extracelular y la posterior integración y expresión funcional del mismo. Es una característica exclusiva de organismos procarióticos. Aproximadamente, el 1% de las bacterias conocidas poseen esta propiedad (Thomas y Nielsen, 2005).

Los procariotas que muestran esta propiedad, poseen fisiologías muy diversas: fotolitotrofos, patógenos, termófilos, quimiolitotrofos. (Lorenz y Wackernagel, 1994; Johnsborg y Håvarstein, 2009). Entre ellos, algunas especies se hacen competentes en determinados estadios de su ciclo vital, y otras lo son siempre (Lunsford, 1998).

Al contrario que en el caso de la conjugación y la transducción, la transferencia de DNA por transformación natural es un proceso iniciado por la célula receptora, siendo el único mecanismo que potencialmente puede explicar cómo adquieren las bacterias DNA de otras especies sin elementos genéticos móviles o bacteriófagos (Thomas y Nielsen, 2005). Este proceso se podría considerar, por lo tanto, como el proceso genuino y más versátil de transferencia génica (Averhoff y Friedric, 2003)

Clásicamente, se han establecido dos modelos para explicar la transformación. Uno para bacterias Gram-negativas y otro para las Gram-positivas. En el caso de las Gram-negativas, las más estudiadas, han sido *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae* (Dubnau, 1999; Chen *et al.*, 2005; Hamilton y Dillard, 2006) **(Fig. 2.1)**, mientras que entre las Gram-positivas destacan *Streptococcus pneumoniae* y *Bacillus subtilis* (Dubnau, 1999 a; Dubnau, 1999 b; Chen y Dubnau, 2004; Chen *et al.*, 2005). Esta diferenciación, se ha hecho principalmente, debido a que en bacterias Gram-negativas existen barreras adicionales para la entrada del DNA (Chen *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha comprobado que esta aproximación es ficticia, porque muchas bacterias comparten características de los dos grupos. Por lo tanto, de manera global, la transformación natural comprende 4 etapas.

2.1.1.3.a. **Desarrollo de competencia**

Las bacterias deben desarrollar un estado fisiológico de competencia que está regulado por más de 20 proteínas codificadas por genes *com* específicos de competencia. En la mayoría de casos, este estado es de duración limitada, y está regido por condiciones específicas de crecimiento, densidad celular, y de disponibilidad o falta de nutrientes, entre otros factores.

2.1.1.3.b. Unión del DNA

La mayoría de especies bacterianas toman DNA, independientemente de su secuencia. Sin embargo, algunas especies son selectivas con el DNA que translocan a través de su membrana. Así, *Haemophilus influenzae* une e internaliza DNA de doble hebra sólo de organismos de la misma especie, o de especies relacionadas. Por otra parte, *Neisseria gonorrhoeae* requiere que en el DNA existan unos motivos particulares de unión que reciben el nombre de DUS ("DNA Uptake Sequence"), y son secuencias de unas pocas bases (10-15 pb) que se repiten con mucha frecuencia a lo largo de un determinado genoma (Smith *et al.*, 1999; Hamilton y Dillard, 2006). El proceso de unión, es un proceso inmediato. Así, en el caso de *Thermus thermophilus*, se ha demostrado que la unión entre el DNA y las células es inmediata al entrar ambos en contacto, ya que el tratamiento con DNasa inmediatamente después de la adición del DNA no impide la transformación (Schwarzenlander y Averhoff, 2006). Además de inmediato, el importe es un proceso rápido. Se ha comprobado que *B. subtilis* posee 50 puntos de unión DNA/célula, cada uno de los cuales transporta el DNA a una velocidad máxima de $80 \text{ pb} \cdot \text{s}^{-1}$ (Dubnau, 1991; Maier *et al.*, 2004). En el caso de *H. influenzae*, se han detectado de 4 a 8 puntos de unión DNA/célula y una velocidad de toma de $16 \text{ kb} \cdot \text{s}^{-1}$ (Deich y Smith, 1980).

2.1.1.3.c. **Importe del DNA**

Estrictamente hablando, se entiende como importe, el paso de DNA exógeno desde un estado sensible a la acción de DNAsas hasta un estado protegido a la acción de las mismas (Chen *et al.*, 2005). Este proceso es distinto en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En las primeras, este proceso es sinónimo al paso a través de la membrana citoplasmática. En cambio, para las Gram-negativas, esta protección se alcanza con el paso de la membrana externa. En ambos casos, solo se transporta al citoplasma una de las hebras del DNA porque la otra es degradada en nucleótidos, que son liberados al espacio extracelular en las Gram-positivas, o al espacio periplásmico en las Gram-negativas (Chen y Dubnau, 2004).

En bacterias Gram-negativas, el transporte de DNA exógeno a través de la membrana externa involucra proteínas similares al pili de tipo IV (Tfp), así como sistemas de exportación de tipo II. Este orgánulo multifuncional, cuya distribución a lo largo de las distintas bacterias sugiere que es una maquinaria antigua, forma largas estructuras filamentosas visibles al microscopio electrónico. En bacterias Gram-positivas, aunque no son las mismas proteínas las responsables del importe del DNA hasta el citoplasma, constituyen un aparato muy similar (Chen y Dubnau, 2004).

Se ha comprobado, que el importe de DNA es un mecanismo que requiere consumo de energía (Schwarzenlander y Averhoff, 2006). En concreto, en bacterias Gram-positivas se ha identificado la ATPasa capaz de generar la energía necesaria para conducir el DNA monocatenario a través del canal ComEC. Existen evidencias de que el proceso del paso de DNA a través de la membrana citoplasmática tiene lugar, preferencialmente, en los polos de la célula, donde se encuentran algunas de las recombinasas como RecN y RecA (Kidane y Graumann, 2005).

2.1.1.3.d. **Recombinación del DNA con el genoma receptor**

Salvo que el DNA sea un plásmido que se replique autónomamente, el DNA debe integrarse en el genoma bacteriano de manera estable, que le permita persistir varias generaciones. Para que tenga lugar la recombinación homóloga, el DNA ha de contener bases similares al DNA genómico, de manera que pueda integrarse en el genoma receptor vía RecA (Kooimey y Falkow, 1987; Kowalczykowski y Egelston, 1994).

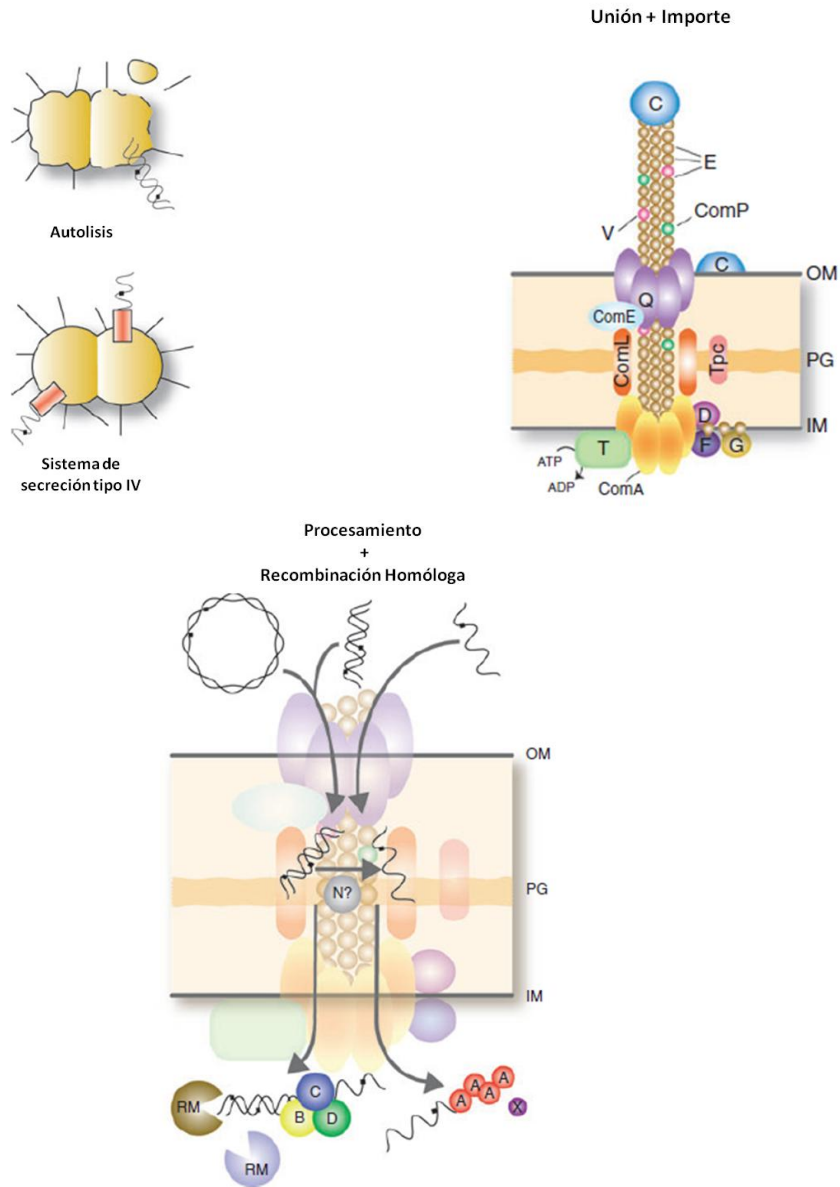


Figura 2.1. Transformación de *Neisseria gonorrhoeae* según Hamilton y Dillard (2006). La unión y el importe requieren muchas proteínas relacionadas con el pilus (las letras únicas son productos de los genes *pil*). En el paso de procesamiento y recombinación las letras corresponden a los respectivos productos de los genes *rec*. OM: membrana externa. PG: peptidoglicano. IM: membrana interna.

2.1.1.3.e. **Transformación natural en cianobacterias**

La transferencia de DNA a bacterias es un hecho completamente establecido, hasta el punto de que actualmente es una práctica común en un gran número de cepas de laboratorio muy diversas. La transformación natural, también ha quedado patente en algunas cianobacterias. En cianobacterias los estudios más detallados relacionados con la transformación natural, se han llevado a cabo en *Synechocystis* sp. PCC 6803. Esta cianobacteria, cuyo genoma ha sido uno de los primeros secuenciados de organismos fotosintéticos (Kaneko *et al.*, 1996), es transformable de forma natural con alta eficiencia (Zang *et al.*, 2007). Debido a su simple organización genética, y amplia flexibilidad metabólica (puede crecer heterótrofamente y fotoautótrofamente), este organismo se ha convertido en un excelente candidato para la manipulación genética en cianobacterias. En concreto, *Synechocystis* sp. PCC 6803, ha servido para analizar en qué medida algunos factores afectan a la transformación natural de cianobacterias. Entre los factores examinados, se han estudiado con detalle algunos como la longitud, la forma (lineal o circular) y la concentración del DNA, el tiempo de incubación de la suspensión celular con el DNA, la presencia de sustancias químicas y restos de DNA contaminantes, así como la influencia de factores propios de la cepa (Kufryk *et al.*, 2002; Zang *et al.*, 2007). El estudio de la transformación natural en esta cianobacteria, también ha permitido conocer las proteínas involucradas en el proceso (Nakasugi *et al.*, 2006), y ha supuesto el inicio del camino para entender con detalle los aspectos más relevantes de la transformación natural en otras cianobacterias.

En *T. elongatus* BP-1, tras la secuenciación de su genoma (Nakamura *et al.*, 2002), se han identificado algunos genes homólogos a los descritos como importantes para la transformación natural en *Synechocystis* sp. PCC 6803, tales como los homólogos a *recA*, *recF*, *recG*, *recJ*, *recQ*, *pilB*, *pilM*, *pilN*, *pilQ*, *comA*, *comE* y *comM* (Yoshihara *et al.*, 2001; Okamoto y Ohmori 2002; Yoshihara *et al.*, 2002). Además, a nivel experimental, K. Onai y M. Iwai (Iwai *et al.*, 2004; Onai *et al.*, 2004) demostraron que las células silvestres de *T. elongatus* BP-1 experimentaban transformación natural, aunque su eficiencia era menor que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Iwai *et al.*, 2004). Además, comprobaron que al igual que ocurre en otras cianobacterias (Stevens y Porter, 1980; Grigorieva y Shestakov, 1982), la eficiencia de la transformación era mayor cuando las células se encontraban en fase exponencial de crecimiento que cuando estaban en fase estacionaria.

2.1.2. **Técnicas de manipulación génica en bacterias**

Las estrategias que se utilizan para manipular el genoma bacteriano se basan en los procesos de transferencia génica mencionados anteriormente. Es decir, estas técnicas no son más que una réplica de lo que sucede de manera espontánea en la Naturaleza. Por lo tanto, en los ensayos basados en inserciones, mutaciones, eliminaciones e interrupciones de genes se utiliza la transformación natural, la conjugación o la transducción como método para movilizar el DNA. Este DNA ha de ser, por supuesto, muy particular para producir en el genoma receptor el efecto deseado, y no alteraciones al azar.

Existen diversas metodologías para sintetizar el DNA necesario para la manipulación genética. Hasta hace unos años, estos fragmentos de DNA se sintetizaban, mayoritariamente, empleando enzimas de restricción y ligasas. Sin embargo, los métodos disponibles para analizar y modificar el genoma dieron un salto cualitativo y cuantitativo a medida que la técnica denominada como "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR) (Mullis, 1990) se convirtió en una herramienta habitual.

A medida que la PCR se ha consolidado como una técnica rutinaria en el campo de la Biología Molecular, se han desarrollado estrategias basadas exclusivamente en ella que han permitido sintetizar constructos válidos para llevar a cabo procesos tales como mutagénesis dirigida, sustituciones, inserciones/delecciones de bases y combinación de fragmentos de DNA. Las técnicas basadas exclusivamente en la PCR, no solo han permitido superar algunas de las limitaciones impuestas hasta el momento por el empleo de enzimas de restricción, sino que también han dado lugar a técnicas más rápidas y versátiles.

Los métodos basados exclusivamente en la PCR se reportaron por primera vez en *Sacharomyces cerevisiae* (Baudin *et al.*, 1993; Wach *et al.*, 1994; Lorenz *et al.*, 1995) y supusieron una herramienta muy útil para el avance en el conocimiento de la función de diversos genes en esta levadura. Esta técnica recibe el nombre de "Short Flanking Homolgy-PCR" (SFH-PCR) y los constructos así sintetizados, también denominados casetes de conversión, están integrados por un gen marcador, limitado por dos regiones homólogas cortas de 20-100 pb (Manivasakam *et al.*, 1995).

Dado el éxito del empleo de la técnica SFH-PCR en *Sacharomyces cerevisiae*, se intentó aplicar la misma estrategia para la transformación de otros microorganismos. Sin embargo, los casetes así contruidos, no eran útiles para la transformación, o era muy baja la eficiencia de la misma. Generalmente, el hecho de que estos constructos no fueran válidos para su uso en otros microorganismos se debía a su menor tasa de recombinación homóloga con respecto a la de *Sacharomyces cerevisiae*.

Para superar esta limitación y conseguir que la técnica fuese de utilidad para ser aplicada a un mayor número de microorganismos, la técnica se modificó prolongando las regiones flanqueantes hasta longitudes mayores de 100 pb. Esta adaptación, que recibió el nombre de "*Long-Flanking-Homology-PCR*" (LFH-PCR) (Wach, 1996), supuso una nueva evolución de las técnicas basadas en la PCR, convirtiéndolas en más versátiles, y aplicables a una mayor variedad de microorganismos.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2.1. Reactivos y productos empleados agrupados por proveedores. En cada caso se indica la ciudad y el país de origen.

Proveedor	Reactivos y productos
AppliChem Darmstadt, Alemania	Carbenicilina Tetraciclina X-Galactósido
Bioline Londres, Reino Unido	dNTPmix Marcadores HyperLadder I
Biotools Madrid, España	Pfu polimerasa
Bonsaitech Madrid, España	Oligonucleótidos
Difco Detroit, MI, EEUU	Agar noble
GE Healthcare Upsala, Suecia	dNTPmix
Invitrogen Carlsbad, CA, EEUU	SYBR [®] Safe DNA Stain
Labolan Pamplona, España	BioTaq DNA polimerasa
M&B Dagenham, Reino Unido	Tiosulfato sódico

<p>Merck Darmstadt, Alemania</p>	<p>Ácido bórico Ácido sulfúrico Agar-agar Carbonato sódico Cloruro cálcico · 2H₂O Cloruro de manganeso · 4H₂O Etanol para biología molecular Fosfato sódico Hidrogeno carbonato sódico Hidrogeno fosfato potásico Hidrogeno fosfato sódico · 12H₂O Nitrato de cobalto · 6H₂O Nitrato potásico Nitrato sódico Nitrito potásico Nitrito sódico Sulfato de cobre · 5H₂O Sulfato de manganeso · H₂O Sulfato de zinc · 2H₂O Sulfato magnésico · 7H₂O</p>
<p>MWG-Biotech AG Ebersberg, Alemania</p>	<p>Oligonucleótidos</p>
<p>Panreac Barcelona, España</p>	<p>Agarosa Cloruro de cobalto · 6H₂O Cloruro potásico Cloruro sódico Fosfato dipotásico Fosfato monopotásico Glicerol Hidróxido sódico Sulfato cálcico disódico Tris(hidroximetil)aminometano</p>
<p>Probus Badalona, España</p>	<p>Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) Citrato férrico Cloruro férrico Na₂EDTA Sulfato amónico</p>
<p>Pronadisa Madrid, España</p>	<p>Extracto de levadura Tryptona</p>
<p>Quimivita Badalona, España</p>	<p>Ácido cítrico</p>

Sigma-Aldrich St.	Ácido (4-(2-hidroxietil)-piperazinetanosulfónico (HEPES)
	Azul de bromofenol
Louis, MO, EEUU	Glicina
	Kanamicina
	Lisozima
	Molibdato sódico · 2H ₂ O
	RNasa
	Tritón X-100
	Tween-20

2.2.1. **Microorganismos y condiciones de cultivo**

2.2.1.1. ***Phormidium laminosum***

La cianobacteria filamentosa no fijadora de N₂ *Phormidium laminosum* (cepa OH-1-pCl₁), también denominada *Geitlerinema* sp. PCC 8501, se aisló originalmente en el laboratorio del Prof. R.W. Castenholz (Universidad de Oregón, Eugene, OR, EEUU). Esta cianobacteria se cultivó fotoautotróficamente a 45-48°C en medio D (Castenholz, 1970) suplementado con 0,5 g/l de NaHCO₃, a una intensidad luminosa de 20-50 μE · m⁻² · s⁻¹. Las células crecieron con nitrato como única fuente nitrogenada, para lo cual el medio D se suplementó con NaNO₃ a una concentración final de 8,5 mM.

Se emplearon cultivos de 100 ml que se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de Pyrex[®] de 250 ml, en un incubador orbital Kuhner Shaker X (Basilea, Suiza) con una agitación de 140-180 ciclos/min.

2.2.1.2. ***Thermosynechococcus elongatus* BP-1**

La cianobacteria unicelular no fijadora de N₂ *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, cedida por el Prof. M. Rögner (Universidad de Bochum, Bochum, Alemania), se cultivó fotoautotróficamente a temperaturas comprendidas en el intervalo 45-55°C. En cada caso, la elección de la temperatura dependió del tipo de ensayo a realizar o del momento del mismo.

Se empleó medio de cultivo BG11 (Stanier *et al.*, 1971) carente de fuente nitrogenada (BG-11sin) suplementado con la fuente de nitrógeno pertinente en cada caso ($\text{NaNO}_3/\text{KNO}_3$ o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y esterilizado durante 20 min a 121°C en autoclave. Los cultivos se iluminaron de forma continua con lámparas fluorescentes de luz blanca y la intensidad se varió de 10 hasta $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en función del ensayo.

Para el crecimiento celular en medio líquido, se emplearon cultivos de 100 ml en matraces Erlenmeyer de Pyrex[®] de 250 ml, en un incubador orbital Kuhner Shaker X (Basilea, Suiza) con una agitación de 140-180 ciclos/min. Para el crecimiento celular en medio sólido, se utilizó medio BG-11sin (suplementado con la fuente nitrogenada apropiada en cada caso)-agar (1,5% (p/v)) empleándose en todos los casos agar noble. Las placas se incubaron en atmósfera húmeda y equilibrada de CO_2 al 1% (v/v) en las mismas condiciones de luz y temperatura que los cultivos en medio líquido.

2.2.1.2.a. **Cultivos de *T. elongatus* BP-1 con distintas fuentes de nitrógeno**

Cuando se cultivó *T. elongatus* BP-1 con nitrato como única fuente nitrogenada, el medio BG-11sin se suplementó con 17 mM de KNO_3 ó NaNO_3 (BG11). En ambos casos, los medios se esterilizaron en el autoclave durante 20 min a 121°C con la fuente nitrogenada ya incorporada. Cuando se cultivaron células con amonio como fuente de nitrógeno, el medio BG11sin se suplementó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y al medio resultante se le denominó BG11sinSA. Para la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se preparó una disolución madre de esta sal a una concentración 0,1 M que se esterilizó por filtración a través de un filtro Millex[®]-FG de 0,2 μm (Millipore Co., Bedford, MA, EEUU).

2.2.1.3. **Medida del crecimiento celular**

El crecimiento celular se siguió midiendo la concentración de clorofila *a* (MacKinney, 1941) y/o registrando la turbidez de muestras del cultivo como el valor de la absorbancia a 750 nm (para *P. laminosum*) y a 730 nm (para *T. elongatus* BP-1) en un espectrofotómetro DU[®]800 UV/Vis (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU).

2.2.2. Determinación de amonio

La determinación de amonio se llevó a cabo modificando el método descrito por Koops *et al.* (1975). Para ello, a 800 µl de muestra se añadieron 100 µl de Reactivo 1 y 100 µl de Reactivo 2 (**Tabla 2.2**). Se agitó después de cada adición y se incubó durante 15 min a 40°C. Tras enfriar los tubos en baño de agua, se registró la absorbancia a 660 nm.

Tabla 2.2. Composición de los Reactivos 1 y 2 para la determinación colorimétrica de amonio según el método de Koops *et al.* (1975), modificado parcialmente.

Reactivo	Composición	
1	Ácido salicílico	1,70 M
	NaOH	4,70 M
	Nitroprusiato sódico	5,50 mM
2	NaOH	0,17 M
	Ácido dicloroisocianúrico	31 mM

En este trabajo se han empleado algunas técnicas básicas de biología molecular cuyos protocolos se encuentran detallados en manuales de laboratorio (Sambrook *et al.*, 1989) y en las instrucciones de las casas comerciales suministradoras de kits específicos. A continuación se detallan los procedimientos y métodos empleados.

2.2.3. Purificación de DNA genómico de cianobacterias

Para la purificación de DNA genómico de *T. elongatus* BP-1 y *P. laminosum*, se partió de cultivos de cianobacterias que se encontraban al comienzo de la fase exponencial de crecimiento. Se cuantificó la concentración de clorofila *a* (MacKinney, 1941) para partir de volúmenes de cultivo adecuados. Se empleó el kit de extracción de DNA cromosómico Núcleo Spin Tissue (Macherey Nagel, Düren, Alemania) con un protocolo modificado para la extracción de DNA genómico de cianobacterias.

En el protocolo se añadió un paso adicional de lisis celular, que consistía en la incubación del cultivo en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, suplementado con 50 mM EDTA, Tritón X-100 al 1% (v/v), lisozima (20 mg/ml) y RNasa (0,3 mg/ml) (Smoker y Barum, 1988). El DNA se conservó a 4°C hasta su utilización.

2.2.3.1. Medida de la concentración del DNA genómico

La concentración de DNA se midió espectrofotométricamente registrando la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm. Una unidad de absorbancia corresponde a una concentración de DNA de 50 µg/ml. La pureza de la muestra se calculó determinando la relación existente entre los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm.

2.2.4. **Electroforesis en gel de agarosa**

En este trabajo la separación de fragmentos de DNA por electroforesis en gel de agarosa ha permitido tanto la identificación del fragmento, como su aislamiento para posteriores estudios.

Se emplearon geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE). Los geles de 50 ml de volumen contenían 5 µl del colorante de DNA SYBR[®] Safe para la posterior visualización del DNA mediante iluminación con luz ultravioleta. El DNA se suplementó con tampón de muestra, que contenía azul de bromofenol al 0,25% (p/v) y glicerol al 30% (v/v). En todos los geles se incluyeron 5 µl de marcadores de DNA HyperLadder I (10000 pb-200 pb). Las electroforesis se llevaron a cabo en una cubeta horizontal Mini-Sub[®] Cell GT (BioRad, Hércules, PA, EEUU) en tampón TAE. Los voltajes aplicados variaron entre 40-80 V durante 1-2 h.

Para la visualización de las bandas de DNA se empleó luz ultravioleta en un analizador de imágenes GenoSmart (VWR Internacional, Darmstadt, Alemania).

2.2.4.1.a. **Extracción de las bandas de DNA de los geles de agarosa**

Para recuperar los fragmentos de DNA separados electroforéticamente se empleó el kit DNA Gel Extraction Kit (Millipore Co., Milford, MA, EEUU).

2.2.5. Síntesis de los casetes de conversión

Para la obtención de células quiméricas de *T. elongatus* BP-1 se necesitaron dos casetes de transformación distintos: C1 y C2. El casete C1 se empleó para la obtención de células en las que *nirA* de *T. elongatus* BP-1 se había sustituido por *kat* (gen presente en el plásmido pKT1 proporcionado por el Prof. J. Berenguer, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España). Las células transformadas con este casete se denominaron *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺.

El casete C2 se empleó para obtener células de *T. elongatus* BP-1 en las que *kat* se había sustituido por *nirA* de *P. laminosum*.

El diseño de cada uno de los casetes necesitaba de cuatro PCRs, de las que las tres primeras tenían como objetivo obtener tres fragmentos de DNA cuyo ensamblaje (por una cuarta PCR) permitiese obtener el casete final válido para la transformación. Estos fragmentos se denominaron de forma general: “*upstream*” (U), “*downstream*” (D) y “*marcador*” (M).

El fragmento “*upstream*” (U) se denominó así por diseñarse de tal manera que tuviera una secuencia homóloga al DNA situado “*aguas arriba*” del gen a eliminar. Por el mismo argumento, el fragmento con secuencia homóloga al DNA situado “*aguas abajo*” del gen a eliminar, recibió el nombre de “*downstream*” (D).

El fragmento llamado “*marcador*”, poseía el gen que serviría como indicador de la transformación. El fragmento M sustituye, tras la transformación, al gen que se pretende eliminar (**Fig. 2.2**).

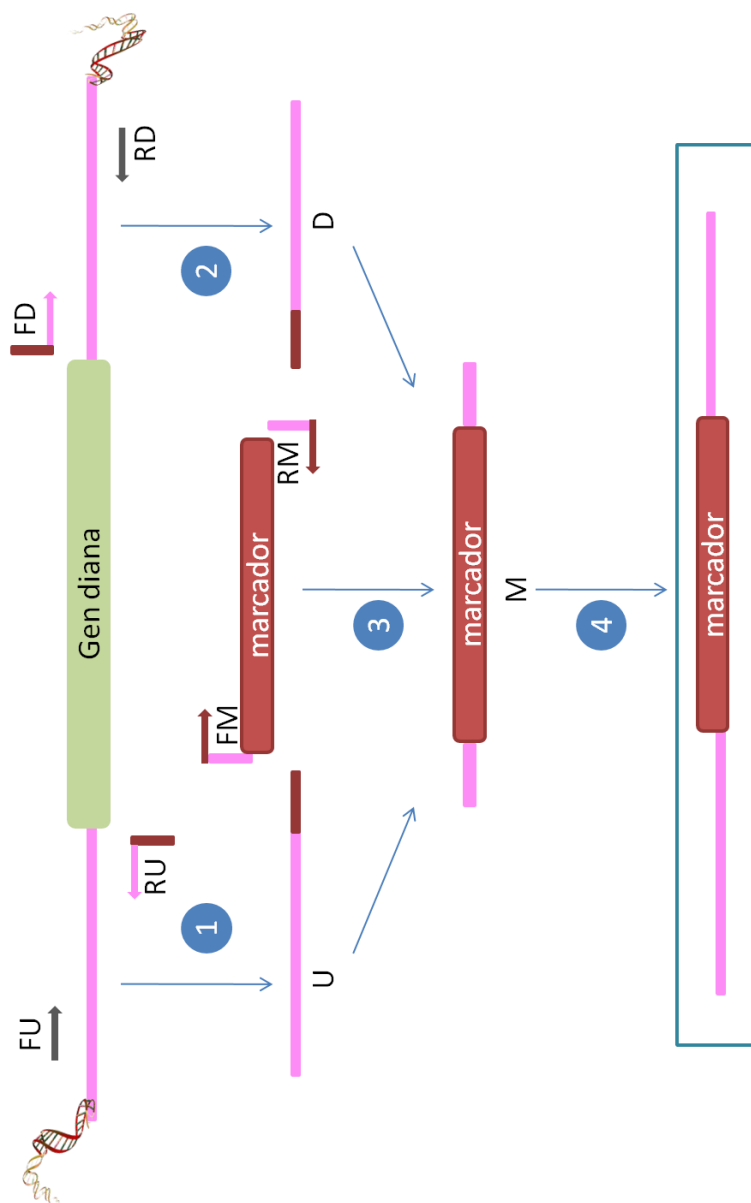


Figura 2.2. Esquema de las etapas empleadas para el diseño de los casetes C1 y C2. FU y RU: oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento "upstream" (U). FD y RD: oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento "downstream" (D). FM y RM: oligonucleótidos empleados para amplificar el "marcador" (M). 1, 2, 3 y 4: cada una de las PCRs empleadas para la síntesis del casete de conversión.

Los oligonucleótidos RU, FD, FM y RM poseen una secuencia que hibrida con el DNA molde correspondiente en cada caso, así como una extensión de oligonucleótidos que sirve para que los fragmentos U, D y M amplificados puedan unirse, con la orientación correcta, mediante una cuarta reacción de amplificación por PCR (**Fig. 2.2**). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador ThermoHybaid Px2 (Ashford, Middlesex, Reino Unido).

Las tres primeras reacciones de PCR, realizadas para la síntesis de cada uno de los dos casetes, se hicieron en volúmenes de 50 μ l que contenían: 0,2 mM de cada dNTP, 5 μ l de tampón de PCR (10x), 2 mM de $MgCl_2$, 1 μ M de cada oligonucleótido y 10-100 ng del DNA molde correspondiente en cada caso. En todas las reacciones de amplificación se empleó 1 U de *Pfu* polimerasa.

A continuación se describe el proceso de síntesis de cada uno de los casetes diseñados. Para cada uno de ellos se detallan los oligonucleótidos y las condiciones de las reacciones de PCR. Para el diseño de los oligonucleótidos empleados en la amplificación de fragmentos de DNA genómico de *T. elongatus* BP-1 se recurrió a la base de datos "cyanobacteria genome database: www.genome.kazusa.or.jp/cyanobase".

2.2.5.1. Síntesis del casete C1

2.2.5.1.a. Amplificación de los fragmentos U1 y D1

Los fragmentos U1 y D1 se amplificaron empleando como molde 10 ng de DNA genómico aislado de células silvestres de *T. elongatus* BP-1. Para amplificar U1 se emplearon los oligonucleótidos FU1 y RU1, mientras que para amplificar D1 se utilizaron los denominados como FD1 y RD1 (**Tabla 2.3**). Las condiciones de la reacción de PCR se detallan en la **Figura 2.3**.

Tabla 2.3. Oligonucleótidos empleados para amplificar los fragmentos U1 y D1. Se detalla la temperatura de fusión (T_f), la longitud y el contenido GC de cada uno de ellos.

Nombre	Secuencia 5'-3'	T_f (°C)	Longitud (pb)	% GC
FU1	gcacctgtcctaatcccttgaat	60,6	23	47,8
RU1	ggtcattcatatgcctcacaatgggtcagttgaacatc	71,6	39	46,2
Nombre	Secuencia 5'-3'	T_f (°C)	Longitud (pb)	% GC
FD1	cgcataccattttgaacggcggtattgactgtatc	71,7	37	48,6
RD1	cgactgcgggtctgatattcag	62,4	23	52,2

	T (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	2 min	
30 x	Desnaturalización	94	30 s
	Hibridación	58	1 min
	Elongación	72	2 min
	Elongación final	72	10 min

Figura 2.3. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar U1 y D1. La temperatura de hibridación adecuada para la amplificación de ambos fragmentos, 58°C, se seleccionó tras realizar un gradiente de temperaturas de hibridación desde 55°C hasta 60°C.

2.2.5.1.b. Amplificación del fragmento M1

El fragmento M1 se amplificó empleando el plásmido pKT1 como DNA molde. Los oligonucleótidos empleados para esta amplificación se detallan en la **Tabla 2.4** y las condiciones de la misma en la **Figura 2.4**.

Tabla 2.4. Oligonucleótidos empleados para la amplificación del fragmento M1. Se detalla la temperatura de fusión (T_f), la longitud y el contenido GC de cada uno de ellos.

Nombre	Secuencia 5'-3'	T_f (°C)	Longitud (pb)	% GC
FM1	gatgttcaactgaccattgtgaggcatatgaatggacc	71,6	39	46,2
RM1	gatacagtcaataccgggccgttcaaaatggtatgcg	71,7	37	48,6

	T (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	2 min	
30 x	Desnaturalización	94	30 s
	Hibridación	62	1 min
	Elongación	72	2 min
Elongación final	72	10 min	

Figura 2.4. Condiciones de la PCR para la amplificación de M1. La temperatura de 62°C se seleccionó tras realizar un gradiente de temperatura desde 55°C hasta 65°C.

Una vez amplificados y analizados los tres fragmentos de DNA por electroforesis en gel de agarosa, las bandas correspondientes se extrajeron del gel, y el DNA de cada una de ellas se concentró por evaporación al vacío en un concentrador SpeedVac (ThermoScientific, Ashford, Reino Unido). Cada fragmento se concentró hasta 50-100 ng/μl, y se comprobó dicha concentración en gel de agarosa por comparación con una concentración conocida de patrones de DNA.

2.2.5.1.c. Síntesis de C1: unión de fragmentos

Se optimizaron las cantidades a emplear de cada fragmento de DNA. Finalmente, se escogieron 200-300 ng de U1, 200-300 ng de D1 y 400-500 ng de M1 como cantidades óptimas para llevar a cabo la PCR de unión. En esta cuarta PCR, M1 actúa como DNA molde, y U1 y D1 como dos largos oligonucleótidos. Los componentes de la reacción fueron los empleados en la PCRs destinadas a amplificar U1, D1 y M1, incluyéndose además FU1 y RD1. Las condiciones de reacción se detallan en la **Figura 2.5**.

	T (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	2 min	
30 x	Desnaturalización	94	30 s
	Hibridación	60	1 min
	Elongación	72	6 min
Elongación final	72	10 min	

Figura 2.5. Condiciones de la PCR dirigida a unir los fragmentos U1, D1 y M1.

2.2.5.2. Síntesis del casete C2

2.2.5.2.a. Amplificación de los fragmentos U2 y D2

Los fragmentos U2 y D2 se amplificaron empleando como molde DNA genómico de *T. elongatus* BP-1 *nirA⁻/kat⁺*. Para amplificar U2 se emplearon los oligonucleótidos FU2 y RU2, y para amplificar D2 se utilizaron los denominados como FD2 y RD2 (**Tabla 2.5**). Las condiciones para estas dos amplificaciones son las mismas que las detalladas en la **Figura 2.3**.

Tabla 2.5. Oligonucleótidos empleados para amplificar los fragmentos U2 y D2.

Se detalla la temperatura de fusión (T_f), la longitud y el contenido GC de cada uno de ellos.

Nombre	Secuencia 5'-3'	T_f (°C)	Longitud (pb)	% GC
FU2	gcacctgtcctaatacccttgaat	60,6	23	47,8
RU2	gctggaacggtactggtcataatgggtcagttgaacatc	72,6	39	48,7
Nombre	Secuencia 5'-3'	T_f (°C)	Longitud (pb)	% GC
FD2	ttggcgcaagaccgaaatgaccgggtzttgactgtatc	72,7	38	50
RD2	cgacttcggtgctgatattcag	62,4	23	52,2

2.2.5.2.b. Amplificación del fragmento M2

El fragmento M2 se amplificó empleando como DNA molde 10 ng de DNA genómico de *P. laminosum* y los oligonucleótidos que se detallan en la **Tabla 2.6**, en las condiciones que se indican en la **Figura 2.6**. Los productos de PCR se trataron de la misma manera que en el apartado **2.2.5.1.b**.

Tabla 2.6. Oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento M2. Se detalla la temperatura de fusión (T_f), la longitud y el contenido GC de cada uno de ellos.

Nombre	Secuencia 5'-3'	T_f (°C)	Longitud (pb)	% GC
FM2	gatgttcaactgacccattatgaccagaccgttcagc	72,6	39	48.7
RM2	gatacagtcaataccgggtcatttcgggtcttgccaa	72,7	38	50

	T (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	2 min	
30 x	Desnaturalización	94	30 s
	Hibridación	63	1 min
	Elongación	72	4 min
Elongación final	72	10 min	

Figura 2.6. Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de M2. La temperatura de hibridación de 63°C se seleccionó tras realizar un gradiente de temperaturas desde 55°C hasta 65°C.

2.2.5.2.c. Síntesis de C2: unión de fragmentos

Se emplearon 200-300 ng de U2, 200-300 ng de D2 y 400-500 ng de M2 para llevar a cabo la PCR de unión.

En esta cuarta PCR, M2 actúa como DNA molde, y U2 y D2 como dos largos oligonucleótidos. Los componentes de la reacción fueron los empleados en las PCRs destinadas a la amplificación de U2, D2 y M2 y, además, se incluyeron FU2 y RD2. Las condiciones se detallan en la **Figura 2.7**.

	T (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94	2 min	
30 x	Desnaturalización	94	30 s
	Hibridación	60	1 min
	Elongación	72	8 min
	Elongación final	72	10 min

Figura 2.7. Condiciones de la PCR dirigida a unir los fragmentos U2, D2 y M2.

2.2.6. Construcción de plásmidos de clonaje

Para la transformación de células de *T. elongatus* BP-1 con DNA circular, los casetes C1 y C2 purificados del gel de agarosa, se clonaron en el vector pT7Blue (**Fig. 2.8**) empleando el kit Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen, Darmstadt, Alemania).

Este vector contiene la estructura del pUC19 (incluyendo un alto número de copias, origen de replicación y secuencias *lac*), el promotor T7, el origen de replicación f1 y múltiples regiones de clonaje. Una de estas regiones contiene un sitio EcoRV empleado para el clonaje de tipo T.

Este vector está diseñado para permitir la clonación de fragmentos amplificados con cualquier tipo de DNA polimerasa, ya que estos son previamente tratados para convertirlos en fragmentos romos y fosforilados, de tal forma que puedan ser insertados y ligados directamente.

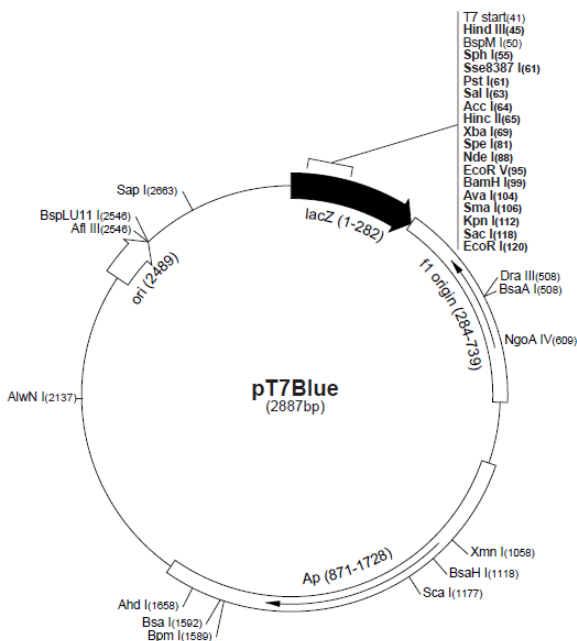


Figura 2.8. Mapa del vector pT7Blue (Novagen, Darmstadt, Alemania).

2.2.7. **Transformación de células competentes, selección y análisis de clones positivos**

La selección de las células de *E. coli* se llevó a cabo sembrando las células en placas LB-agar con IPTG, X-gal, carbenicilina y tetraciclina.

Este sistema permite el reconocimiento de colonias recombinantes mediante el fenotipo azul/blanco. El plásmido codifica el péptido α de lacZ, que complementa el fragmento ω de lacZ expresado por la cepa hospedadora (lacZ Δ M15). La β -galactosidasa resultante puede hidrolizar el sustrato X-gal, dando como resultado un fenotipo de colonias azules. Los insertos son clonados interrumpiendo el marco de lectura del péptido α y, por lo tanto, impidiendo la producción de péptido α . Como resultado las colonias obtenidas aparecen blancas.

2.2.8. **Secuenciación del DNA**

El casete C1 en forma lineal, y ambos casetes (C1 y C2) clonados en el vector pT7Blue, se secuenciaron en el Servicio General de Secuenciación y Genotipado de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

2.2.9. **Purificación del DNA plasmídico**

En el caso de necesitar DNA plasmídico puro, para llevar a cabo reacciones de secuenciación, se utilizó el kit Qiaprep®Spin Miniprep kit (Qiagen, Hilden, Alemania). Cuando se requerían mayores cantidades de DNA plasmídico puro para la transformación de células de *T. elongatus* BP-1, éste se purificó empleando el kit NucleoBond®XtraMidi Plus (Macherey Nangel, Düren, Alemania).

2.2.10. **Transformación natural de células de *T. elongatus* BP-1**

Cuando se empleó C1 lineal para la transformación, el casete C1 extraído del gel de agarosa, se purificó y concentró hasta 1,5 µg/µl. La concentración de DNA se determinó analizando la muestra en gel de agarosa y registrando el valor de $A_{260\text{nm}}$ en el espectrofotómetro. Cuando se emplearon los casetes C1 y C2 en forma circular (clonados en pT7Blue), el DNA plasmídico se purificó y concentró hasta 1,5 µg/µl. En este caso, la concentración de DNA plasmídico se calculó registrando el valor de $A_{260\text{nm}}$ en el espectrofotómetro.

Para la transformación de las células silvestres de *T. elongatus* BP-1 con C1 (lineal o clonado), se partió de un cultivo de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 crecidas en medio líquido BG11sinSA. Para la transformación de las células *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺ con C2 clonado, se partió de un cultivo de células de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺ crecidas en medio BG11sinSA suplementado con kanamicina (40 µg/ml). En ambos casos se emplearon células en fase de crecimiento exponencial ($A_{730nm}=0,6-0,8$ UA).

2.2.10.1. Transformación natural con C1

Las células de *T. elongatus* BP-1 se cosecharon por centrifugación (1500 ×g durante 5 min a 23°C) en una centrífuga Allegra™ X-22R (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU). Posteriormente, las células se lavaron y resuspendieron en un volumen de medio BG11sinSA, de tal manera que la suspensión celular tuviese un valor de A_{730nm} de 20 UA, que correspondía a 10^9 células/ml.

Se tomaron muestras de 40 µl de suspensión celular y se mezclaron con 6 µg de DNA (en el caso de DNA lineal) y con 6 µg, 12 µg, 20 µg, 30 µg y 50 µg en el caso de la transformación con DNA clonado. Como control, se sustituyó el DNA por agua ultrapura (MilliQ, Millipore, Bedford, MA, EEUU). Se hicieron 2 réplicas en ambos casos.

Se añadió 1 ml de BG11sinSA a la combinación células-DNA/agua, y ésta se incubó en un agitador orbital Kuhner Shaker X (Basilea, Suiza). Se utilizaron tubos cilíndricos de 15 ml de volumen, y la mezcla se incubó durante 24 h a 45°C, a una intensidad luminosa continua de $10 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ y con una agitación de 180 rpm.

Transcurridas 24 h, se añadieron 3 ml de BG11sin-agar 0.35% (p/v) a la mezcla, y ésta se sembró en las placas correspondientes. El control se sembró en placas BG11sinSA-agar 1,5% (p/v) y en placas BG11sinSA-agar 1,5% (p/v) suplementadas con kanamicina a una concentración final de 40 µg/ml.

La combinación células-DNA se sembró en placas BG11sinSA-agar 1,5% (p/v) suplementadas con kanamicina a una concentración final de 40 µg/ml. Las placas se incubaron a 52°C a una intensidad luminosa de $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en atmósfera húmeda y con CO₂ al 1% (v/v).

2.2.10.2. Transformación natural con C2

Las células de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺ se cosecharon por centrifugación (1500 ×g durante 5 min a 23°C) en una centrífuga Allegra™ X-22R (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU). Posteriormente, se lavaron y resuspendieron en un volumen de medio BG11sinSA, de tal manera que la suspensión celular obtenida tuviese un valor de A_{730nm} de 20 UA que correspondía a 10⁹ células/ml.

Se tomaron 40 µl de dicha suspensión y se mezclaron con 6 µg, 12 µg, 20 µg, 30 µg y 50 µg de DNA. Como control de la transformación se sustituyó el DNA por agua ultrapura (MilliQ, Millipore, Bedford, MA, EEUU). En todos los casos se hicieron 2 réplicas.

Se añadió 1 ml de BG11sin a la mezcla células-DNA/agua y se incubó en un agitador orbital Kuhner Shaker X (Basilea, Suiza). Se utilizaron tubos cilindrocónicos de 15 ml y la mezcla se incubó durante 24 h a 45°C, bajo una intensidad luminosa de $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y con una agitación de 180 rpm. Transcurridas 24 h, se añadieron 3 ml de BG11sin-agar 0,35% (p/v) a la mezcla, y ésta se sembró en las placas correspondientes. Tanto los controles, como la mezcla células-DNA, se sembraron en placas BG11-agar 1,5% (p/v). Las placas se incubaron a 48 o 52°C a una intensidad luminosa de $50 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en atmósfera húmeda y con CO₂ al 1% (v/v).

2.2.10.3. **Comprobación de mutantes**

El DNA genómico de las células transformadas se analizó mediante PCR. Para ello se tomaron colonias aisladas con una punta de micropipeta y a cada una de ella se le añadieron 50 μl de un tampón cuya composición se especifica en la **Tabla 2.7**. La mezcla se calentó 10 min a 95°C y posteriormente se centrifugó (3000 $\times g$ durante 10 min a temperatura ambiente) en una centrífuga Microfuge[®] 18 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU). Se tomaron 4 μl de cada sobrenadante, que se emplearon para realizar las PCRs analíticas de las colonias (**Fig. 2.9**).

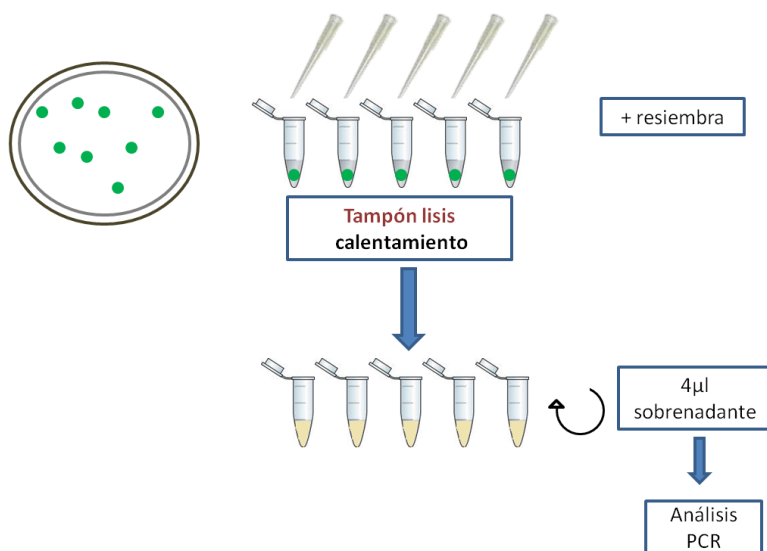


Figura 2.9. Esquema de la técnica de análisis de colonias por PCR. Las colonias analizadas se resembraron en placas iguales a las de origen para el mantenimiento de las colonias.

Tabla 2.7. Tampón de lisis. Composición correspondiente a 2 ml del tampón empleado para lisar las colonias y realizar las PCRs directamente a partir de las mismas.

Tritón X-100 al 10% (p/v)	200 µl
1 M Tris-HCl pH 8,0	40 µl
0,5 M EDTA pH 8,0	8 µl
Agua ultrapura MilliQ	1,75 ml

Tanto para el análisis por PCR de las células transformadas con C1, como para las transformadas con C2, se emplearon oligonucleótidos que hibridan en los extremos de ambos casetes. Las condiciones de estas reacciones de PCR son las mismas que las detalladas en las **Figuras 2.5** y **2.7**, respectivamente. Además, para el caso de las células transformadas con C2, se emplearon los oligonucleótidos *nirA_P|F* y *nirA_P|R* (**Fig. 2.10**).

C1	FU1
	RD1
C2	FU2
	RD2
	<i>nirA_P F</i>
	<i>nirA_P R</i>

Figura 2.10. Oligonucleótidos empleados para realizarlas PCRs de comprobación de colonias transformadas con C1 y con C2. *nirA_P|F* y *nirA_P|R* (**Tabla 2.8**) son los empleados para la amplificación de *nirA* de *P. laminosum* (**Fig. 2.11**).

Tabla 2.8. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de *nirA* de *P. laminosum*. Se detalla la temperatura de fusión (T_f), la longitud y el contenido GC de cada uno de ellos.

Nombre	Secuencia 5'-3'	T_f (°C)	Longitud (pb)	% GC
<i>nirA_P F</i>	atgaccagtaccgttcc	52,8	17	52,9
<i>nirA_P R</i>	tcatttcggtcttgccg	52,8	17	52,9

	T (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 min	
30 x	Desnaturalización	95	30 s
	Hibridación	48	1 min
	Elongación	72	1 min
Elongación final	72	10 min	

Figura 2.11. Condiciones de la reacción de amplificación por PCR de *nirA* de *P. laminosum*.

Todas estas reacciones se realizaron en volúmenes de 50 µl que contenían: 0,2 mM de cada dNTP, 5 µl de tampón de PCR (10x), MgCl₂ 2 mM, 1 µM de cada oligonucleótido y 4 µl del DNA molde correspondiente en cada caso. En todas las reacciones de amplificación se empleó 1 U de BioTaq DNA polimerasa.

2.2.10.4. **Crecimiento de colonias y presión selectiva**

Las colonias seleccionadas se resembraron en las placas correspondientes en cada caso (BG11sinSA+kan/BG11) para aumentar la densidad celular. Posteriormente, estas colonias se crecieron en el medio líquido. En el caso de las células transformadas con C1 y pT7Blue-C1, el medio líquido se suplementó con concentraciones crecientes de kanamicina para aumentar la presión selectiva.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Estrategia para la obtención de células transgénicas de *T. elongatus* BP-1

De manera general, los estudios que emplean como herramienta metodológica la transformación de bacterias se pueden englobar en dos tipos. Uno de ellos consiste en la inserción en el genoma, o fuera de él (en plásmidos), de un gen o de un conjunto de genes. En estos casos, los genes insertados son habitualmente genes de resistencia a antibióticos, o genes que codifican proteínas que aportan ventajas metabólicas a las células transformadas (Asada *et al.*, 2000; Takahama *et al.*, 2003). El otro tipo consiste en mutar, interrumpir o eliminar un gen o conjunto de genes. Dichas mutaciones, interrupciones o deleciones pueden estar motivadas por distintos objetivos, entre las que destacan comprobar el papel de determinados aminoácidos en la proteína codificada por el gen (Sugiura *et al.*, 2004), analizar el papel de un determinado gen o de un conjunto de genes, o ubicar las proteínas que codifican los genes en determinadas rutas bioquímicas (Yoo *et al.*, 2002; Iwai *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2008).

Los objetivos que se han propuesto para el desarrollo de este trabajo suponen la combinación de los mencionados anteriormente, ya que la creación de una cianobacteria transgénica requiere eliminar un gen de su genoma para después insertar otro en su lugar. Como se menciona en los objetivos, en este trabajo la transformación está dirigida a la construcción de células de *T. elongatus* BP-1 que en lugar de portar en su genoma su propio *nirA* porten el correspondiente gen de *P. laminosum*. Para llevar a cabo dicha transformación se requiere un paso intermedio en el que *nirA* de *T. elongatus* BP-1 se sustituye por un gen de resistencia a la kanamicina (*kat*). A continuación se muestran los resultados obtenidos en las distintas etapas llevadas a cabo para construir ambos tipos celulares.

2.3.1.1. Obtención de células carentes de *nirA*: *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺

El gen *nirA* codifica la actividad nitrito reductasa y está presente en una sola copia en el genoma de *T. elongatus* BP-1 (Nakamura *et al.*, 2002). La expresión de este gen permite que las células puedan reducir el nitrito a amonio. Parece que esta capacidad metabólica está asociada exclusivamente a este gen, aunque existen evidencias de que debido a la analogía estructural que existe entre los iones nitrito y sulfito, también la sulfito reductasa (producto de *sirA*) podría, en algunos casos, catalizar dicha reducción (Imamura *et al.*, 2010). Habitualmente, el cultivo en el laboratorio de *T. elongatus* BP-1 se lleva a cabo en medio BG11 con nitrato como única fuente nitrogenada. Sin embargo, en este trabajo la obtención de células de *T. elongatus* BP-1 carentes de *nirA* ha requerido la utilización de medio con amonio, ya que al carecer de actividad nitrito reductasa, las células no pueden reducir el nitrito. El medio elegido se denomina BG11sinSA, y consiste en medio BG11 sin fuente nitrogenada y suplementado con (NH₄)₂SO₄.

Se han cultivado células silvestres de *T. elongatus* BP-1 con dos concentraciones distintas de amonio: 2 mM y 4 mM (**Fig. 2.12A**). No se han empleado concentraciones superiores a 4 mM porque a estas concentraciones el amonio resulta tóxico para las células (Drath *et al.*, 2008). Simultáneamente al crecimiento, se ha seguido la evolución de la concentración de amonio disponible en el medio de cultivo para cuantificar el amonio consumido por las células durante su crecimiento (**Fig. 2.12B**).

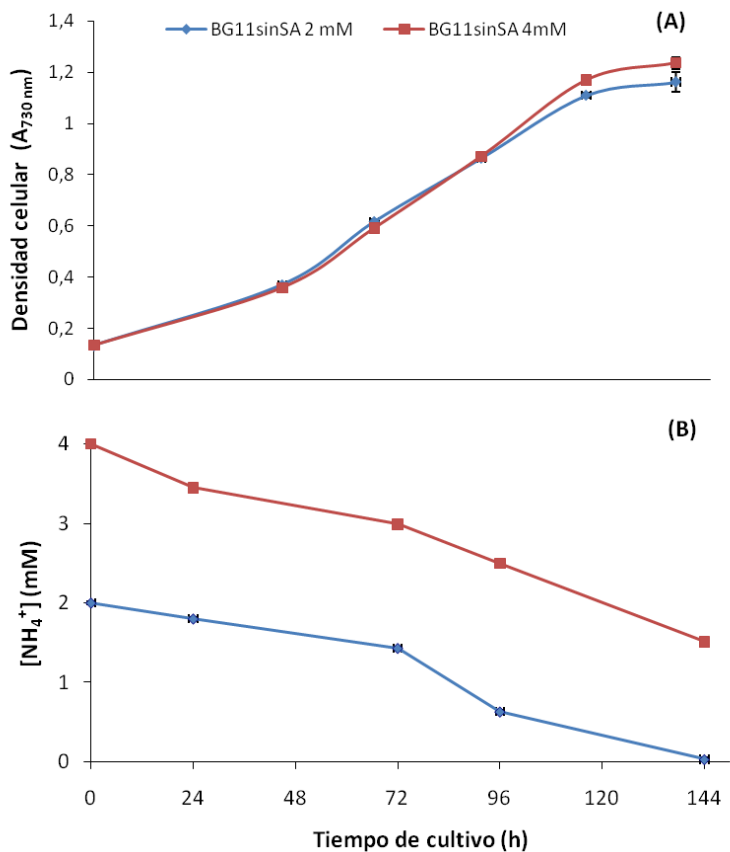


Figura 2.12. (A) Crecimiento de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 y (B) Evolución de la concentración de amonio disponible en el medio de cultivo. Las células se cultivaron con medio BG11sinSA con 2 mM y 4 mM de amonio, suplementado como sulfato amónico.

Se comprueba que el crecimiento celular y el consumo concomitante de amonio es muy similar para ambas concentraciones de amonio. A la vista de los resultados, y teniendo en cuenta que algunos factores, como la variación del pH del medio de cultivo, la temperatura y la continua agitación favorecen la conversión del amonio en amoníaco, se decidió emplear una concentración inicial de amonio de 4 mM (BG11sin SA 4 mM), y suplementar los cultivos cada 4-5 días con amonio a una concentración final de 2 mM. Cuando se cultivaron células en medio sólido, dado que resulta más complicado suplementar el medio de cultivo con amonio, se ha optado por emplear la mayor concentración inicial de amonio, 4 mM. Se ha comprobado que en medio sólido esta concentración es adecuada para el crecimiento de colonias de células silvestres durante más de dos semanas.

2.3.1.1.a. **Síntesis del casete de conversión C1**

Una vez obtenido un medio adecuado para el crecimiento de las células de *T. elongatus* BP-1 carentes de *nirA*, se procedió a construir este tipo de células. Como se ha comentado previamente, este tipo celular es intermedio entre las células silvestres de *T. elongatus* BP-1 y las que portan en su genoma el gen *nirA* de *P. laminosum* en lugar del suyo propio. La sustitución directa de un gen por el otro dificultaría mucho el proceso, ya que al codificar ambos genes proteínas con la misma actividad catalítica, sería muy complicado, por no decir que imposible, diferenciar fenotípicamente unas células de otras.

El primer paso necesario para la construcción de estas células, consiste en diseñar un fragmento de DNA muy concreto que sea capaz de unirse al genoma de *T. elongatus* BP-1 (2.6 Mb), y permita la sustitución de *nirA* por *kat*. Para que esto sea posible, este DNA, denominado casete de conversión, tiene que ser específico para sustituir del genoma exclusivamente a *nirA*, sin afectar a ningún otro gen. Las propiedades de este DNA se basan en la recombinación homóloga, proceso por el cual el DNA puede insertarse en el lugar que le corresponde dentro del genoma por acción de recombinasas presentes en *T. elongatus* BP-1 (Nakamura *et al.*, 2002).

Existen diversas estrategias para sintetizar dichos casetes de conversión. La mayoría de ellas requieren, bien sea la utilización de enzimas de restricción (Yoo *et al.*, 2002), o el tratamiento de fragmentos de DNA con enzimas (Kong y Xu, 2002; Sánchez *et al.*, 2007). En ambos casos existe, como consecuencia de la estrategia empleada, una inserción o eliminación de nucleótidos. Este hecho podría suponer un problema en la etapa de la recombinación homóloga, o en la posterior expresión de los genes.

Por este motivo, para la síntesis del casete de conversión, se ha empleado la técnica *Flanking Homology-PCR* (FH-PCR). Esta técnica, en sus distintas versiones, *Long Flanking Homology-PCR* (LFH-PCR) o *Short Flanking Homology-PCR* (SFH-PCR), se ha utilizado con éxito para diseñar casetes de conversión dirigidos a transformar diversos organismos: levaduras (Wach, 1996), bacterias (Kim y Kim, 2000) y cianobacterias (Taroncher-Oldenburg y Stephanopoulos, 2000).

El casete de conversión (C1) construido para la obtención de células de *T. elongatus* BP-1 carentes de *nirA* (*T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻) consta del gen marcador del proceso de transformación, *kat*, limitado por dos zonas homólogas al DNA que flanquean *nirA* en el genoma de *T. elongatus* BP-1 (**Fig. 2.13**).

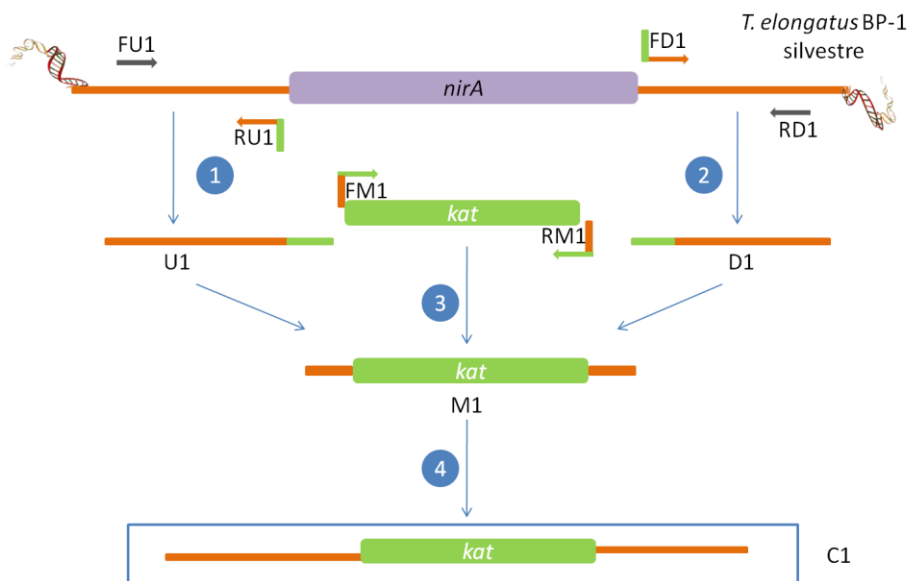


Figura 2.13. Esquema del proceso empleado para la síntesis de C1. FU1 y RU1: oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento "upstream" (U1). FD1 y RD1: oligonucleótidos empleados para amplificar el fragmento "downstream" (D1). FM1 y RM1: oligonucleótidos empleados para amplificar el "marcador" (M1). 1, 2, 3 y 4: cada una de las PCRs empleadas para la síntesis de C1.

Síntesis de C1: amplificación de las regiones homólogas

La longitud de las zonas homólogas es uno de los elementos clave para que este DNA se recombine con éxito en el DNA genómico. Existen cianobacterias para las que se conoce la longitud a partir de la cual el rendimiento de la transformación resulta favorecido (Zang *et al.*, 2007). Sin embargo, para el caso de *T. elongatus* BP-1 no existen estudios detallados al respecto, encontrándose en la literatura regiones de diversas longitudes. Por esta razón, se tomaron como referencia los resultados relacionados con la transformación natural en *T. elongatus* BP-1 (Iwai *et al.* 2004; Onai *et al.*, 2004; Iwai *et al.*, 2006) y algunos obtenidos en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Taroncher-Oldenburg y Stephanopoulos, 2000). La información disponible en esta última cianobacteria es más abundante, porque este organismo ha sido uno de los primeros cuyo genoma ha sido completamente secuenciado. Además, en el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803 existen estudios detallados de los factores que influyen en la transformación natural (Kufryk *et al.*, 2002; Zang *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se diseñaron los oligonucleótidos FU1, RU1, FD1 y RD1 necesarios para construir un casete cuyas secuencias homólogas poseían una longitud aproximada de 500 pb. En concreto, la región homóloga situada en el DNA genómico “aguas arriba” al gen *nirA* poseía 508 pb y la que se encontraba “aguas abajo” 536 pb, (**Fig. 2.14**). Se observa en la **Tabla 2.3** que los oligonucleótidos RU1 y FD1 son especialmente largos, ya que portan una extensión de nucleótidos que le sirven para unirse al molde en la PCR de unión. En todas las reacciones de PCR se empleó *Pfu* como polimerasa, ya que era crítico que el DNA amplificado no contuviese ninguna mutación (Derbise *et al.*, 2003). La exactitud de las secuencias de DNA era necesaria, tanto en el caso de las zonas homólogas para permitir la recombinación, como para que se expresara correctamente el gen marcador.

					gcac	ctgtccta
1405681	cccttgaata	ccacgettac	tgaaacgact	tctgcectac	cgcgagcgt	caacccacgg
1405741	gatgccatcc	attcgatcag	ctttgtgctg	agaagagaat	cgagcatcgg	ctcatccaaa
1405801	ctcgccaccc	gcaaaccaat	ggcatggcgg	agcgctgcaa	cggtcgcatt	gccaagattc
1405861	tgcgtgctga	gcgctttgtc	tccgctgctg	atctgcaaga	gacgctcacg	cgatacctct
1405921	ggcgctgcaa	tcaccgcatt	ccccaacgcg	ctttgggcca	catgaccccc	atcgagagac
1405981	tccgaacgtg	gcaaatggag	ggaccagagt	tgttcagttc	acaggtagat	aatgtcgcgg
1406041	gtcttgatag	ttagcaataa	atacagtttc	agaatatctg	taatacaaaa	actgtatcga
1406101	gacaagaaaa	aagtagcaaa	atttacaaat	gttcatgatt	catctggcta	aattggatgt
1406161	tcaactgacc	cattgaagac	aagggaaca	accgtgagca	acaaaattga	agccattaaa
1406221	aaagagaaag	atggccttggc	ggtcaagcaa	gaactggaga	aatttgcagc	catgggctgg
1406281	gaaaacatcc	cagaagctga	tcgcatgttc	cgctcaagt	ggctagggat	tttctttcga
1406341	ccagtcaccc	ccggccgggt	catgatgcgg	ctgcgagtac	ccaatggaat	tctcaccagc
1406401	cagcaactgc	gaaccctcgg	agcaattgtg	gatcgctatg	gcgagaacgg	caatggagac
1406461	attacgaccc	gtcaaaacat	ccagatccgt	ggcttaccca	ttgaagacat	tctgaaatc
1406521	atagagcagc	tccaagcctg	ggcctcacc	tctgttcaat	cgggaatgga	caatgtgcgc
1406581	aacctcactg	gttctcctgt	ggccggcatt	gatgcagctg	aactcattga	tactcgtccc
1406641	ctgatcatga	aattgcaggc	catgattacc	aataatggtc	aggggaatcc	ggagtttagc
1406701	aatctgcccc	gcaaatcaaa	cattgccatt	gagggagggc	gagataactc	tgtccatgcc
1406761	gaaattaacg	atgtttgcgtt	tgtgctgcc	tatcgccaag	ggcgtttggg	cttcaatggt
1406821	ttagtcggtg	gttttttctc	tgctcggcgt	tgtgctgctg	ctattcccct	tgatgcgtgg
1406881	gtgccccccg	atgatgctgt	ggtgcagctc	tcacgggcca	tccttgaat	tttccgtgac
1406941	catggtccgc	ggggcaatcg	acaaaagcg	cggctcaggt	ggctcattga	tgaatgggga
1407001	attgagaaat	tccgggcagc	ggtgggtggt	aagcttccct	ttgaactcct	cagtgtgccc
1407061	gccaaggacg	aaattgactg	ggacaagcga	gatcatttgg	gggtgcaccg	tcaaaaacaa
1407121	cggcgcctca	actacgtggg	actccatgta	cctgtggggc	gactctatgc	caccgatttc
1407181	tatgagttgg	cgcggttgc	ccaagtctat	ggccagtcag	aagtgccgct	cactgtagag
1407241	caaaacgtga	ttattcccga	tgtgcgggat	gccgttttac	cgagtctgct	gcgggaacct

```

1407301 ctctgagca agtttcggcc tgaaccccc cctctagaac ggcgccctgt ttctgtaca
1407361 ggggcagaat tttgcaactt tgccctcatt gaaacaaaga accgcgcctt tgcccttgcc
1407421 cgcctggctcg atcaacaatt ggtgctgcct caaccagtgc gcattcattg gacgggctgt
1407481 cccaactcct gtgggtcaacc gcaagtggcc gatattggcc tcatgggcac aaaaactcgc
1407541 cgcaatggtg aaacggtaga tgcggtggac ttgtacatgg gcgcaaatg gggcaaggat
1407601 gccaagttgg gcacctgtgt gaaaaaagcg attccctgtg atgaactgcc tgaggctactg
1407661 cgcaagtgc tcattgagca gtttggggca caaccaagag ggtcggaaa gcccccgta
1407721 gccacgccg cggtggccat gatggtctcc taacgtaacg ctgtctgcat ttcccggtat
1407781 tgactgtatc gactctattg attgtotaag aactgaagga tttgtaatct atggcgaatt
1407841 tttcccgcg gcgctttctc atgaccgctg ctgccacaac ggctgtgaca ttgatctccc
1407901 acggctgtgg caatagccag caaagtactg acgttgtcca accgaccacc gtagcagaaa
1407961 ccccggaagt gacgggcgca aaactcggtt ttattgccct cacggatgcg gccccctga
1408021 ttattgcaa ggaaaaagg ctatttgcca agtatgggat gcctgatgtg gaagtgttga
1408081 agcaggcgtc ttggggcaca acccgcgaca acttggattt gggttccgct aacggtggca
1408141 ttgacggtgc ccacatctc acaccgatgc cctatctaata gactgtggga aaaattaccg
1408201 gtggcaaac tgtaccatg tatactctgg cgcggttaa caccaatggt caggggatcc
1408261 tcttggcgaa tgctataaa gatctgaata tcagcaccga cagtcg

```

Figura 2.14. Secuencia de la región del genoma de *T. elongatus* BP-1 objeto de este trabajo. La zona subrayada corresponde a la secuencia del gen *nirA*. (■) Región de 508 pb amplificada “aguas arriba” del gen *nirA*. (■) Región de 536 pb amplificada “aguas abajo” del gen *nirA*.

El resultado de las PCRs destinadas a sintetizar las regiones homólogas, se verificó por electroforesis en gel de agarosa (**Fig. 2.15**). Se comprobó, que la longitud de las regiones homólogas se correspondía con las esperadas.

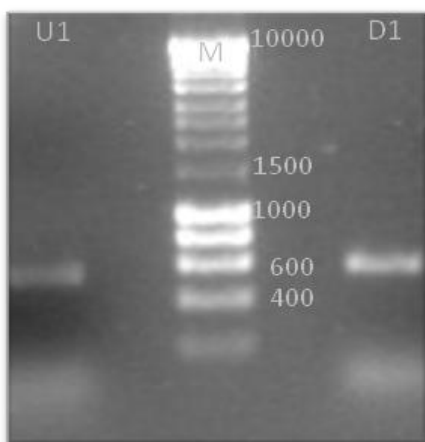


Figura 2.15. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de las PCRs realizadas para amplificar los fragmentos U1 y D1. M: marcadores HyperLadder I.

Síntesis de C1: elección y amplificación del fragmento molde

En bacterias se han descrito diversas combinaciones “gen de resistencia-antibiótico” empleadas como método de selección de las células transformadas. Preferiblemente, se escogen antibióticos con actividad bacteriostática y no bacteriolítica. La elección depende, en gran medida, de las condiciones de crecimiento celulares. Los antibióticos más empleados para la transformación de cianobacterias, son la estreptomina (Kirilovsky *et al.*, 2004), cloranfenicol (Naithami *et al.*, 2000; Iwai *et al.*, 2007), kanamicina (Chiaramonte *et al.*, 1999; Taroncher-Oldenburg y Stephanopoulos, 2000), y espectinomicina (Katoh *et al.*, 2001).

Generalmente, los genes de resistencia a antibióticos provienen de organismos mesófilos. En este trabajo, el carácter termófilo de *T. elongatus* BP-1 (temperatura óptima de crecimiento a 55°C) supuso una dificultad añadida a la transformación, teniéndose que escoger entre dos alternativas. La primera, suponía elegir como gen de resistencia uno de algún organismo mesófilo, así como emplear (a lo largo de la transformación y el posterior crecimiento de las células transformadas) la temperatura a la que se expresara adecuadamente la proteína codificada por este gen. La segunda alternativa, requería emplear un gen que codificase una proteína cuya estabilidad y actividad fuesen adecuadas a la temperatura de crecimiento de *T. elongatus* BP-1.

Teniendo en cuenta que la tasa de duplicación a de *T. elongatus* BP-1 en medio líquido a 50°C y 55°C, es mayor que a 45°C (Yamaoka *et al.*, 1978), se escogió esta segunda alternativa, y se empleó el gen *kat* (de resistencia a la kanamicina) como gen marcador del proceso de transformación. Para evaluar en qué medida impedía la kanamicina el crecimiento celular de *T. elongatus* BP-1, se siguió el crecimiento celular en medio líquido en presencia (10, 20 y 40 µg/ml) y ausencia del antibiótico (**Fig. 2.16**).

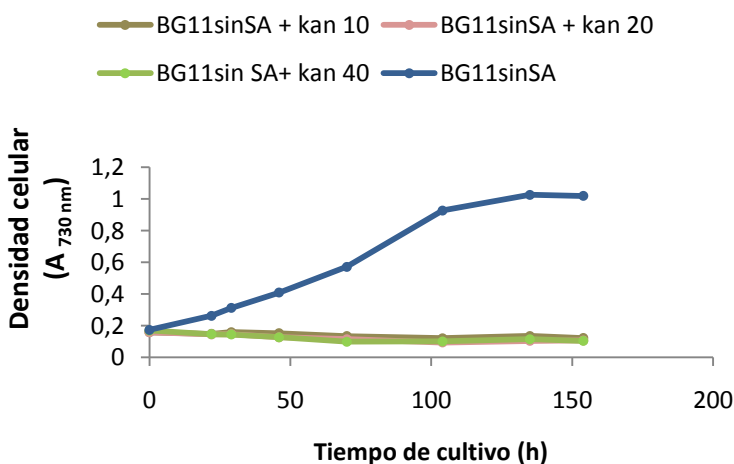


Figura 2.16. Efecto de la kanamicina en el crecimiento de células silvestres de *T. elongatus* BP-1. Los cultivos se desarrollaron en medio líquido BG11sinSA 4 mM sin suplementar y suplementado (10, 20 y 40 µg/ml) con kanamicina.

Se comprueba que una concentración de kanamicina de 10 $\mu\text{g/ml}$ es suficiente para inhibir completamente el crecimiento de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 (**Fig. 2.16**). Dado que las condiciones de cultivo incluyen altas temperaturas (45-52°C) e iluminación continua, y teniendo en cuenta la posible inestabilidad del antibiótico en estas condiciones, se seleccionó el empleo de 40 $\mu\text{g/ml}$ como concentración de kanamicina (**Fig. 2.17**) para asegurar así la presencia de antibiótico en el medio durante periodos de tiempo de cultivo más largos.

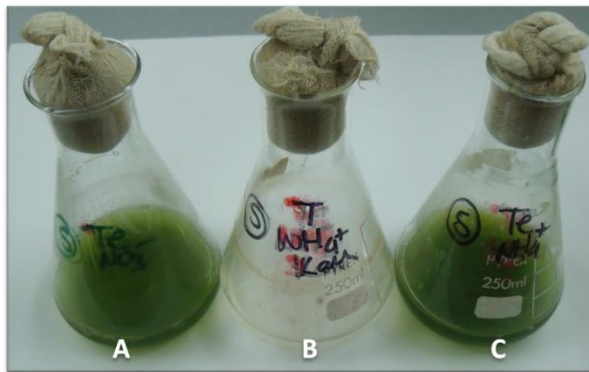


Figura 2.17. Crecimiento de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 en diversos medios líquidos. Se emplearon los medios (A) BG11, (B) BG11sinSA con 40 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina y (C) BG11sinSA.

Es importante señalar, que en este trabajo el gen de resistencia se ha insertado sin llevar consigo un promotor. Generalmente, en el lugar del gen a eliminar se inserta lo que se conoce como "casete de resistencia" (Kato *et al.*, 2001; Kong y Xu, 2002). Este casete está constituido por el propio gen de resistencia y un promotor constitutivo, de tal forma que el gen siempre se expresa en presencia del antibiótico. En este caso, el gen *kat* se expresa bajo el control del propio promotor del operón *nirA-nrtABCD-narB*. Por tanto, si el gen se expresa es porque el promotor ha permanecido intacto tras la transformación. Además, esta variación nos permite comprobar si la transcripción/expresión del operón *nirA-nrtABCD-narB* de *T. elongatus* BP-1 se reprime completamente o no cuando la fuente nitrogenada del medio de cultivo es amonio (BG11sinSA), ya que éste es el único catión con el que pueden crecer las células transformadas.

A continuación se describe la amplificación del gen *kat* empleando 1 ng de plásmido pKT1 como DNA molde (**Fig. 2.18**) y los oligonucleótidos FM1 y RM1 (**Tabla 2.4**). Se comprueba que los oligonucleótidos utilizados para dicha amplificación, al igual que RU1 y FD1, eran los adecuados, no sólo para amplificar el fragmento molde (**Fig. 2.19**), sino también para facilitar la posterior etapa de PCR de unión.

```

aaggaggtgtgagggcatatgaatggaccaataataatgactagagaagaagaatgaagattgttcatgaaattaaggaacg
aatattggataaatatggggatgatgttaaggctattgggttttatggctctcttggctcgtcagactgatgggccctattcg
gatattgagatgatgtgtgtcatgtcaacagaggaagcagagttcagccatgaatggacaaccgggtgagtggaaggtggaag
tgaatTTTTatagcgaagagatttactactagattatgcatctcaggtggaatcagattggccgcttacacatggtcaatTTTT
ctctattttgccgatttatgattcaggtggatacttagagaaagtgtatcaaactgctaaatcggtagaagcccaaagttc
cacgatgcgattttgtgcccttatcgtagaagagctgtttgaaatgacaggcaaatggcgtaaatattcgtgtgcaaggaccga
caacatttctaccatccttgactgtacaggtagcaatggcaggtgccatggttgattggctcgtcatcatcgcatctgttatac
gacgagcgcttcgctcttaactgaagcagttaagcaatcagatcttctccttcaggttatgaccatctgtgccagttcgtaatg
tctgggcaactttccgactctgagaaacttctggaatcgctagagaatTTTctggaatgggattcaggagtggaacagacgac
acggatatatagtggtgtgtcaaacgcataaccattttgaacgg
    
```

Figura 2.18. Fragmento (775 pb) del plásmido pKT1 amplificado por PCR que comprende el gen *kat*.

El resultado de la reacción de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa (**Fig. 2.19**), confirmándose que el tamaño del fragmento molde se correspondía con el esperado.

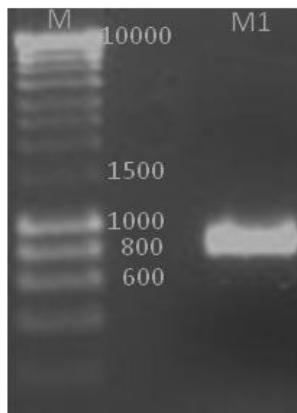


Figura 2.19. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la PCR dirigida a sintetizar el fragmento molde (M1). M: marcadores HyperLadder I.

Una vez amplificados los tres fragmentos de DNA, se llevó a cabo la PCR de unión de los mismos. El diseño de los fragmentos F1, D1 y M1 sólo permitía que estos quedasen unidos en una única disposición, así se obtuvo C1 (**Fig. 2.21**). Previamente, se necesitó purificar los tres fragmentos, porque resultados preliminares, en los que se emplearon los productos de PCR sin purificar, no proporcionaron resultados satisfactorios (resultados no mostrados). El DNA amplificado en esta PCR de unión se analizó por electroforesis en gel de agarosa (**Fig. 2.20**).

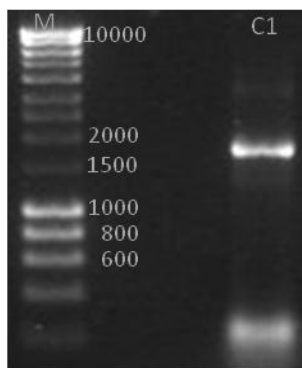


Figura 2.20. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR dirigida a sintetizar C1.

```

gcacctgtcctaatacccttgaataaccacgcttactgaaacgacttctgcccctaccggcgagcgtcaaccacg
ggatgccatccattcgatcagcttgtgctgagaagagaatcgagcatcggctcatccaaactcgccacccgc
aaaccaatggcatggccgagcgtgcaacggctgcattgccaagattctgctgctgagcgttctgtctccgc
tgctgatctgcaagagacgctcacgcgatacctctgggctgcaatcaccgcattcccacgcgcttggggc
cacatgacccccatcgagagactccgaacgtggcaaatggaggaccagagttgttcagttcacaggtagata
atgctcggggtcttgatagtttagcaataaatacagtttcagaatatctgtaatacaaaaactgtatcgagaca
agaaaaagtagcaaaatttacaaatgttcatgattcatctggctaaaattggatgttcaactgaccattgtg
aggcatatgaatggaccaataataatgactagagaagaaagaatgaagattgttcatgaaattaaggaacgaa
tattggataaataggggatgagttaaggctattgggtgtttaaggctctctggctcagactgatggggc
ctattoggatattgagatgagtgtgtcatgtcaacagaggaaagcagagttcagccatgaaatggacaaccggt
gagtggagggtggaagtgaatttttatagcgaagagattctactagattatgcatctcaggtggaatcagatt
ggccgcttacacatgggtcaatttttctctattttgccgatttatgattcaggtggatacttagagaaagtgt
tcaaaactgctaaaatggtagaagccaaaagtccacgatgogattttgtgcccattatcgtagaagagctgttt
gaatagcaggcaaatggcgtaataatctgtgtgcaaggaccgacaacatttctaccaatcttgactgtacagg
tagcaatggcaggtgccatgttgattgggtctgcatcatcgcatctgttatacgcagagcgtctcgctcttaac
tgaagcagttaagcaatcagatcttctctcaggttatgaccaatctgtgccagttcgtaatgtctgggtcaactt
tccgactctgagaaacttctggaatogctagagaatttctggaatgggattcaggagtggaacagaaacgacag
gatataatagtggtgtgtcaaaacgcataaccattttgaacggccgggtattgactgtatcgactctattgattg
tetaagaactgaaggattttgtaatctatggcgaatttttcccgccggcgctttctcatgaccgctgctgccac
aacggctgtgacattgatctcccacggctgtggoaatagccagocaaagtactgacgttgtccaaccgaccacc
gtagcagaaaccccggaagtgcaggcgcaaaaactcggctttattgcccctcaccgatgcccggccccctgatta
ttgccaaggaaaaaggctattttccaagtatgggatgcctgatgtggaagtgtgaagcaggcgtcttgggg
cacaaccccgacaaacttggtattgggttccgcataacgggtggcattgacggtgccacatcctcacaccgatg
ccctatctaatgactgtgggaaaaattaccgggtggcaaacctgtaccatgtatatcttgccgcggttaaaca
ccaatggtcagggattctcttgccgaatgcctataaagatctgaatatcagcaccgacagtcg

```

Figura 2.21. Secuencia del casete de conversión (C1) obtenido tras la PCR de unión del fragmento U1 (■) , M1 (■) y D1(■).

Se comprobó que el resultado de la PCR era específico, y el producto de unión de los fragmentos U1, M1 y D1 proporcionaba en el gel de agarosa una banda de aproximadamente 1800 pb. El producto de PCR se trató como se indica en el apartado **2.2.4.1.a** y se secuenció.

2.3.1.1.b. **Transformación natural con C1 lineal**

Una vez comprobada la secuencia de C1, se procedió a transformar las células de *T. elongatus* BP-1, bien sea con DNA lineal (Taroncher-Oldenburg y Stephanopoulos, 2000; Kufryk *et al.*, 2002; Kuwayama *et al.*, 2002), o con DNA circular (Kufryk *et al.*, 2002; Kirilovsky *et al.*, 2004; Iwai *et al.*, 2006; Iwai *et al.*, 2007). Como primera estrategia para obtener células carentes de *nirA* se optó por utilizar directamente el casete C1 (**Figs. 2.20 y 2.21**). La utilización del DNA lineal tiene la ventaja de que permite prescindir de la etapa de clonación en el proceso, sin embargo, la cantidad de DNA obtenida es más limitada.

Las células de *T. elongatus* BP-1 silvestres se transformaron como se indica en el apartado **2.2.10.1**. Una vez transformadas las células y transcurridos 10 días de cultivo, la combinación de células-DNA originó varias colonias en placas BG11sinSA-agar suplementadas con 40 µg/ml de kanamicina. Las células control no crecían en dichas placas. A la vista de estos resultados se podía afirmar que, las células transformadas habían adquirido copias del gen *kat*, mediante el proceso de recombinación homóloga, que les hacía resistentes a la kanamicina y capaces de crecer en presencia del antibiótico (**Fig. 2.22**).

Se analizó y comprobó por PCR la integración correcta del casete en el genoma de *T. elongatus* BP-1. Se escogió esta técnica porque el análisis por hibridación de DNA es mucho más lento y tedioso (Wendland, 2003).

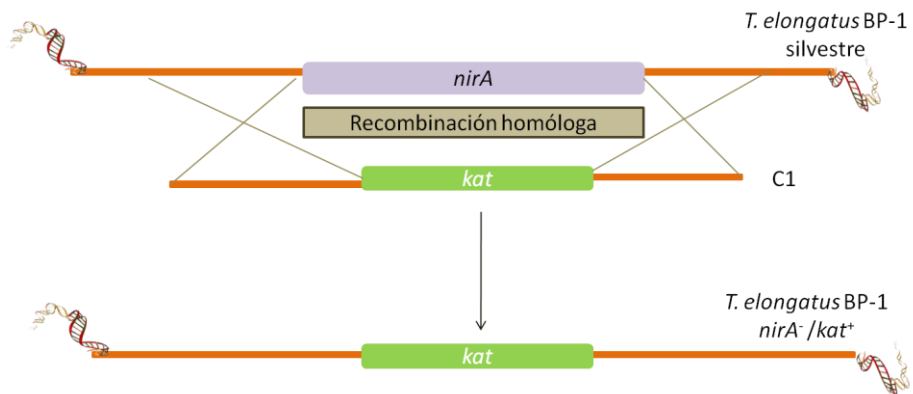


Figura 2.22. Proceso de recombinación homóloga entre C1 y el genoma de *T. elongatus* BP-1.

Para identificar las colonias transformadas, se realizaron PCRs del DNA extraído directamente de las colonias. Esta estrategia permite obtener DNA de suficiente calidad para analizar por PCR distintas colonias de forma independiente, sin necesidad de crecer células previamente en medio de cultivo líquido. Además, la PCR de colonias posibilita comprobar, a partir del medio de cultivo sólido, si las colonias crecidas han incorporado el gen *kat* en detrimento de *nirA*. De esta manera, se evita cultivar en medio líquido colonias en las que en algún caso el DNA hubiese producido un efecto distinto al esperado. Asimismo, esta técnica permite una optimización en el tiempo, ya que obtener cultivos en medio líquido a partir de colonias supone varios días de incubación.

El análisis por PCR del DNA genómico de todas las colonias transformadas que habían crecido en placas BG11sinSA-agar con 40 µg/ml de kanamicina, proporcionó el mismo resultado tras el análisis por electroforesis en gel de agarosa (**Fig. 2.23**). Se muestra, como resultado representativo, la amplificación del DNA genómico de una colonia de tipo silvestre (S), y de una de las obtenidas tras la transformación (T). Para el análisis por PCR se emplearon oligonucleótidos que hibridan a ambos extremos de C1 (**Fig. 2.13**).

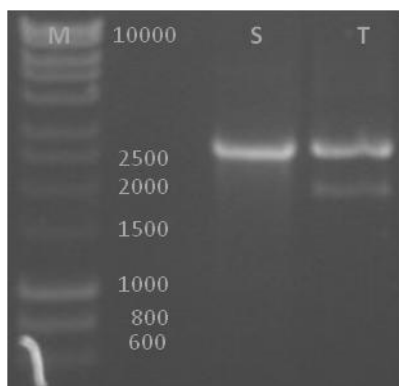


Figura 2.23. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la PCR realizada con colonias de células silvestres (S) y colonias transformadas (T) de *T. elongatus* BP-1. En ambos casos se emplearon los oligonucleótidos FU1 y RD1 (**Tabla 2.3**).

El análisis por electroforesis en gel de agarosa de la PCR realizada con DNA molde de la colonia de células silvestres proporcionaba una única banda cuya longitud era de aproximadamente 2500 pb (**Fig. 2.23**). El análisis llevado a cabo con las colonias transformadas proporcionó dos bandas. La banda más intensa tenía una longitud aproximada de 2500 pb (banda A) y la otra de 1800-1900 pb (banda B). La banda A se corresponde con la suma de las bases pertenecientes a las dos regiones homólogas (U1 y D1) y a *nirA*. La banda B aparece sólo en las células transformadas y corresponde a la sustitución de *nirA* (1560 pb) por el fragmento que porta *kat* (775 pb).

El resultado genotípico demuestra, por lo tanto, que *nirA* no ha sido sustituido completamente por *kat*. Para interpretar este resultado existen varias explicaciones, no excluyentes entre sí. Así, se ha descrito que en ocasiones en las que el gen a eliminar es esencial para el crecimiento de las células, éste gen no puede suprimirse completamente del genoma. Este no parece que sea el caso, ya que en medio de cultivo con amonio como única fuente nitrogenada, *nirA* no debería ser un gen esencial para el crecimiento celular. Otra explicación se basaría en el hecho de que existan varias copias del genoma en cada célula de *T. elongatus* BP-1 (Nakamura *et al.*, 2002). En el caso de células transformadas, sólo en algunas de las copias del genoma el gen *nirA* habría sido sustituido por *kat*. Existen datos experimentales que apoyan que *T. elongatus* BP-1 es transformable en menor medida que *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Iwai *et al.*, 2004), por lo que la cantidad de casete de conversión empleado para la transformación podría no haber sido suficiente como para que se hubiese producido una completa sustitución.

Existen otras razones que podrían explicar la baja eficiencia de transformación. Así, también podría haber sucedido que el casete de conversión hubiese sido susceptible de degradación, y por lo tanto, que del DNA disponible sólo una parte hubiera recombinado con el DNA genómico

Otra opción, aunque poco probable, es que como se ha descrito para algunas bacterias (Smith *et al.*, 199; Hamilton y Dillard, 2006) existan en *T. elongatus* BP-1 secuencias de toma de DNA (DUS). Estas secuencias son sucesiones de nucleótidos repetidas con alta frecuencia a lo largo del genoma y que condicionan, en parte o por completo, la entrada del DNA al interior celular.

Esta opción parece poco probable, porque el DNA sí es capaz de entrar al interior celular. Además otros investigadores (Iwai *et al.*, 2004; Onai *et al.*, 2004) también han insertado DNA en el interior celular de *T. elongatus* BP-1 mediante transformación natural, sin encontrar restricciones derivadas de la secuencia del DNA empleado.

Presión selectiva de las células transformadas con C1 lineal

En la literatura se han descrito otros casos en los que se han obtenido mezclas de células transformadas en distinta medida. Cuando se observan estos fenotipos parciales, generalmente, lo que se intenta es aumentar la presión selectiva (Taroncher-Oldenburg y Stephanopoulos, 2000). De este modo, se favorece la división de las células con mayor número de copias del gen marcador del proceso de transformación.

En nuestro caso, para ejercer presión selectiva, se crecieron colonias a partir de células transformadas de *T. elongatus* BP-1 en medio BG11sinSA 4 mM-agar suplementado con concentraciones crecientes de kanamicina (100, 200 y 300 µg/ml). Los resultados de la presión selectiva, mostraron que las colonias eran capaces de crecer hasta con la concentración más elevada de kanamicina, aunque el análisis por PCR de las células transformadas seguía proporcionando el mismo resultado (ver **Fig. 2.23**). Por lo tanto, en este caso la presión selectiva no parecía ser suficientemente efectiva, ya que no promovía la completa sustitución de *nirA*. El hecho de que la presión selectiva ejercida por concentraciones crecientes de kanamicina no supusiera la eliminación completa de *kat* podría deberse, fundamentalmente, a dos razones.

Así, la ineficacia de la presión selectiva podría explicarse si desde el principio de la transformación no existiese ninguna célula en la que todas las copias de su genoma hubiesen sido sustituidas. Otra explicación consistiría en los niveles de actividad de la proteína codificada por *kat*. Podría ocurrir que la expresión de unas pocas copias de *kat* podría ser suficiente para permitir que las células crecieran a concentraciones elevadas de kanamicina. En la literatura se ha descrito algún caso en el que, al igual que en este trabajo, tras la transformación con DNA lineal, la posterior presión selectiva no permitía eliminar todas las copias del gen diana (Kong y Xu, 2002).

Para comprobar si el crecimiento de las células transformadas en medio líquido nos proporcionaba más información, o permitía una mayor presión selectiva, se crecieron colonias en medio BG11, BG-11sinSA suplementado con kanamicina **(Fig. 2.24)**.

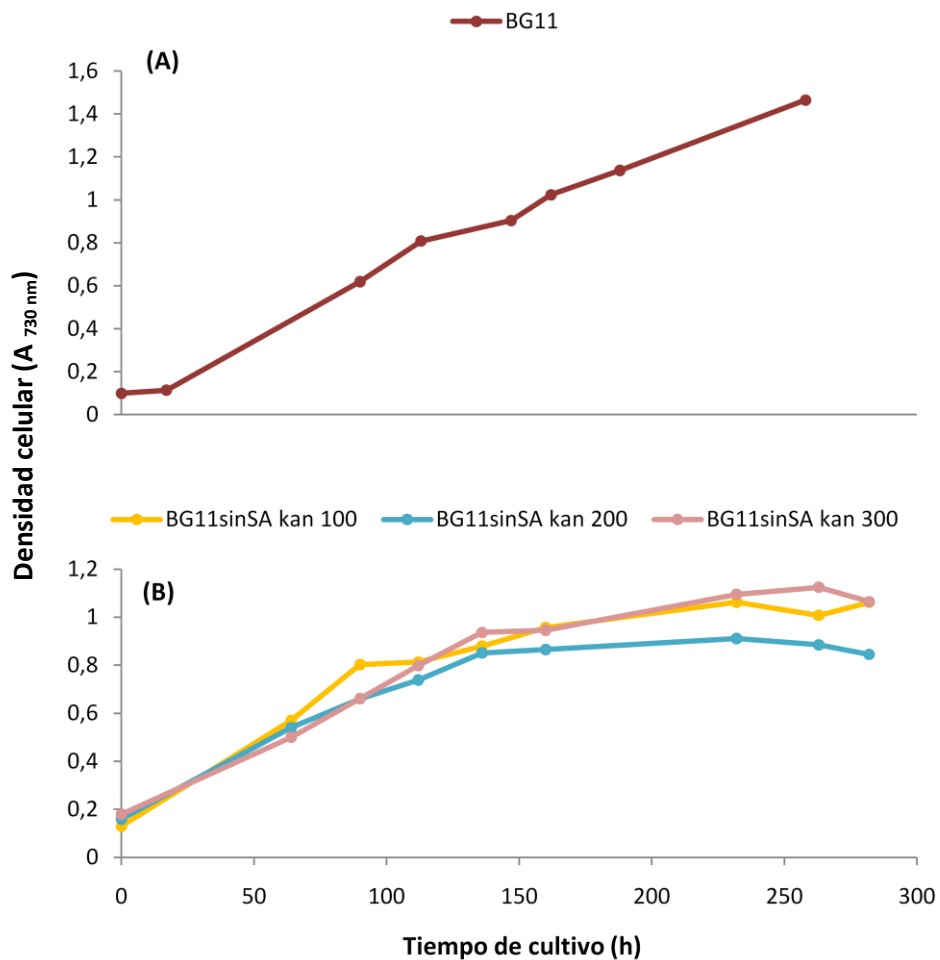


Figura 2.24. Crecimiento de células transformadas de *T. elongatus* BP-1 en (A) medio BG11 y (B) medio BG11sinSA suplementado con 100, 200 y 300 µg/ml de kanamicina.

A la vista de los resultados, se confirma que las células transformadas de *T. elongatus* BP-1 poseen un fenotipo intermedio entre las células silvestres y las células de *T. elongatus* BP-1 carentes de *nirA*, ya que crecen en medio BG11sinSA 4 mM suplementado con kanamicina, pero también lo hacen en medio BG11. Este tipo de células son por lo tanto, células merodiploides (**Figs. 2.24 y 2.25**).

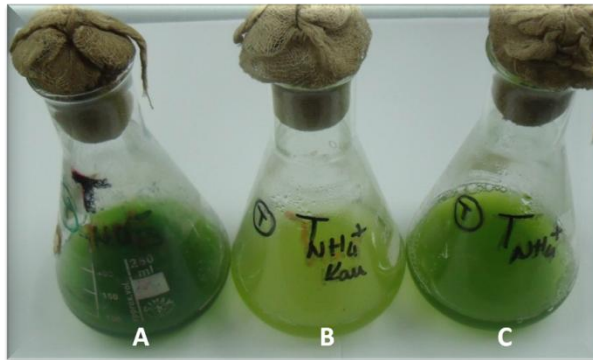


Figura 2.25. Cultivos líquidos de células transformadas de *T. elongatus* BP-1 en diversos medios. Las células se cultivaron en (A) BG11, (B) BG11sinSA suplementado con 40 µg/ml de kanamicina y (C) BG11sinSA.

El resultado obtenido, tras la transformación con DNA lineal, no era lo suficientemente bueno para seguir con la construcción de las células quiméricas, puesto que se requería obtener células de *T. elongatus* BP-1 en las que *nirA* hubiese sido completamente sustituido por *kat*.

Pese a no lograrse la construcción deseada, esta primera transformación daba indicios de que eran adecuados diversos factores. Así, era prueba de que funcionaba la transformación natural, y de que el DNA entraba al interior celular donde no era degradado (al menos no completamente).

Parecía, además, que era adecuada la longitud de las zonas homólogas empleadas para que el DNA se insertase en el lugar adecuado del genoma. Por último, el promotor del operón *nirA-nrtABCD-narB* no había sufrido mutaciones, y *kat* se expresaba correctamente a altas temperaturas, permitiendo seleccionar las células transformadas a 52°C.

Otro resultado significativo de esta transformación es, que como se señaló en el apartado **2.3.1.1.a**, *kat* se expresa bajo el propio promotor del operón *nirA-nrtABCD-narB* de células de *T. elongatus* BP-1. Según los resultados obtenidos con C1, *kat* se expresa cuando se emplea amonio como fuente nitrogenada, lo que implica que también lo hace el operón *nirA-nrtABCD-narB*. Este dato muestra que en *T. elongatus* BP-1 el amonio no reprime, por lo menos por completo, la transcripción del operón *nirA-nrtABCD-narB*.

La mayoría de los investigadores que han realizado experimentos de transformación defienden que el DNA circular puede aumentar la eficiencia de la transformación con respecto al DNA lineal. Este aumento en la eficiencia se basa, en gran medida, en la estabilidad del DNA. Así, el DNA circular es más estable que el DNA lineal frente a la degradación por nucleasas.

Teniendo en consideración este motivo, se decidió clonar el casete de conversión. Esta clonación requiere elegir un plásmido adecuado. Dado que para *T. elongatus* BP-1 se había empleado con anterioridad el vector pT7Blue (Novagen, Darmstadt, Alemania) (Iwai *et al.*, 2004; Onai *et al.*, 2004), con este mismo fin, se clonó el casete de conversión en este vector, obteniéndose un plásmido al que se denominó pT7Blue-C1.

2.3.1.1.c. **Transformación natural de *T. elongatus* BP-1 con pT7Blue-C1**

Una vez clonado C1 (pT7Blue-C1) y escogidas las colonias positivas de *E. coli*, se purificó el DNA plasmídico para realizar una nueva transformación de las células de *T. elongatus* BP-1, en este caso con DNA circular.

Se transformaron células de *T. elongatus* BP-1, y después de 10 días, la combinación de células-DNA originó varias colonias en placas BG11sinSA 4 mM con 40 µg/ml de kanamicina. Para aumentar la presión selectiva y lograr la completa segregación del genoma, se hicieron subcultivos desde un comienzo en medio sólido con concentraciones crecientes de kanamicina (a 100, 200 y 300 µg/ml). Como en otras ocasiones el DNA de las colonias transformadas y crecidas en distintas concentraciones de antibiótico se analizó por PCR (**Fig. 2.26**).

En la **Figura 2.26** se muestran resultados representativos de la amplificación por PCR del DNA de una colonia de células silvestres (S) de *T. elongatus* BP-1 y de colonias transformadas crecidas en BG11sinSA suplementado con concentraciones crecientes de kanamicina. Para la amplificación se han empleado los oligonucleótidos FU1 y RD1 con el objetivo de determinar si las células habían incorporado el casete C1. Como muestra la **Figura 2.26**, las células de *T. elongatus* BP-1 transformadas con el DNA circular, han sustituido por completo su gen *nirA* por el gen *kat* desde la concentración menor (40 µg/ml) de kanamicina.

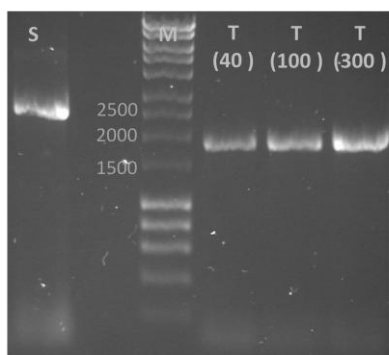


Figura 2.26. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la PCR realizada con colonias de células silvestres (S) y transformadas (T) de *T. elongatus* BP-1. M: marcadores HyperLadder I.

Se comprueba que las 3 colonias examinadas de células transformadas (T 40, 100 y 300) muestran, tras la amplificación, únicamente la banda de DNA correspondiente a aproximadamente 1800 pb. Esta banda supone la eliminación de *nirA* y la consecuente inserción de *kat* en su lugar. Según los resultados mostrados por la PCR, a diferencia de lo que sucedía en la transformación con DNA lineal, no existe heterogeneidad en la composición de las distintas copias del genoma de cada célula.

Estos resultados indican que la eficiencia en la transformación ha sido mayor que la conseguida con el DNA lineal. Este hecho también se corroboró fenotípicamente. Para ello, se crecieron colonias en medios de cultivo líquido BG11 y BG-11sinSA suplementado con 40 µg/ml de kanamicina. Las células crecían en medio BG11sinSA 4 mM suplementado con 40 µg/ml de kanamicina, pero no lo hacían en medio BG11 (**Figs 2.27 y 2.28**).

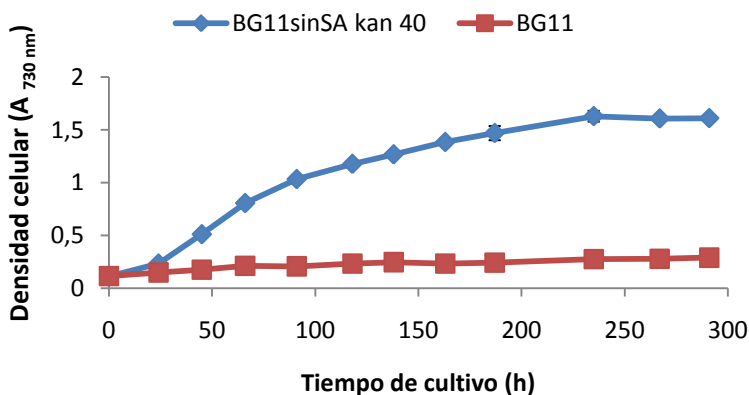


Figura 2.27. Crecimiento de células de *T. elongatus* BP-1 transformadas con pT7Blue-C1 en medio BG11 y medio BG11sinSA 4 mM suplementado con kanamicina.

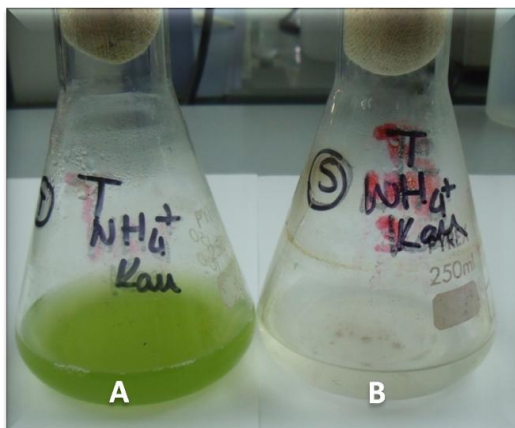


Figura 2.28. Crecimiento en medio líquido BG11sinSA 4 mM suplementado con 40 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina de (A) células de *T. elongatus* BP-1 transformadas con pT7Blue-C1 y (B) células silvestres.

Además, como se muestra en la **Figura 2.26**, no se observaron genotipos parciales en ninguna de las colonias analizadas de células transformadas.

2.3.1.2. **Complementación de células de *T. elongatus* BP-1 defectivas en *nirA*, con *nirA* de *P. laminosum***

Esta segunda transformación consiste en complementar las células de *T. elongatus* BP-1 carentes de *nirA* (en cuyo lugar se ha insertado *kat*) con el correspondiente gen de *P. laminosum*.

La complementación se realizó a nivel genómico, y permitió insertar *nirA* de *P. laminosum* en el mismo lugar del genoma de *T. elongatus* BP-1, en donde en células silvestres estaba su propio *nirA*. Existen otras estrategias para complementar células con genes exógenos. En cianobacterias, al igual que en bacterias, generalmente se emplean plásmidos que se replican autónomamente sin integrarse en el genoma (Luinenburg y Coleman, 1993; Asada *et al.*, 2000). Sin embargo, el objetivo de este trabajo era realizar la complementación a nivel genómico.

El planteamiento experimental para construir este tipo de células era el mismo que el anterior, pero en esta ocasión se tomaron como células de partida de *T. elongatus* BP-1, las carentes de su gen *nirA* (*T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺) construidas anteriormente.

En este caso, el casete de conversión C2 sintetizado por LFH-PCR (Fig. 2.29), está formado por dos zonas homólogas al DNA que flanquean al gen *kat* en el genoma de las células a complementar (*T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺) (Fig. 2.30), y en medio de ambas regiones homólogas se localizaba *nirA* de *P. laminosum* (Fig. 2.31). Dado que las zonas homólogas diseñadas anteriormente, habían sido adecuadas en la recombinación homóloga, se decidió repetir las mismas.

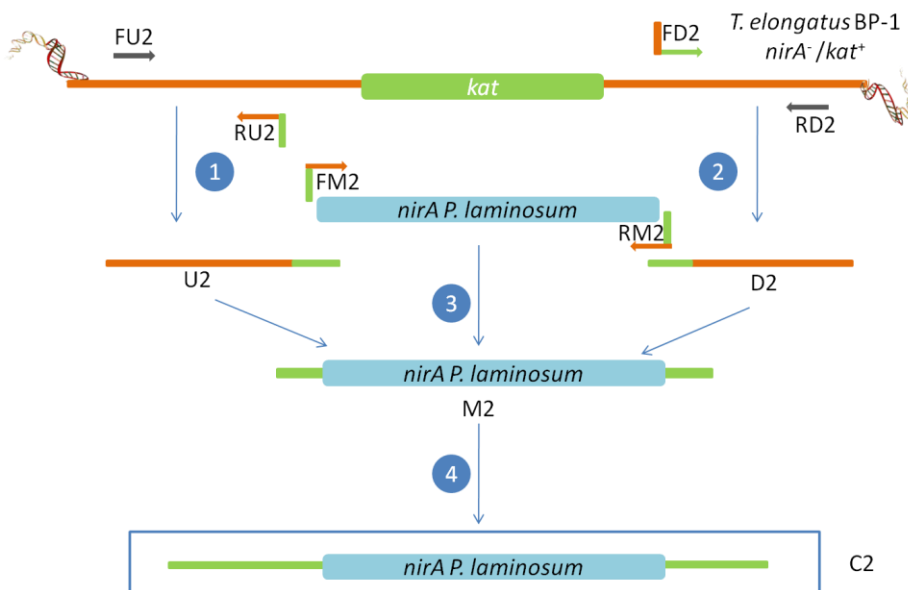


Figura 2.29. Esquema del proceso empleado para la síntesis de C2.

```

gcacctgtcctaatacccttgaataaccacgcttactgaaacgacttctgcccctaccggcgagcgtcaaccacg
ggatgccatccattcgatcagctttgtgctgagaagagaatcgagcatcggctcatccaaactcgccacccgc
aaaccaatggcatggccgagcgtgcaacggctgcattgccaagattctgctgctgagcgtttgtctccgc
tgctgatctgcaagagacgctcacgcgatacctctgggctgcaatcaccgcattcccacgcgctttgggc
cacatgacccccatcgagagactccgaacgtggcaaatggaggaccagagttgttcagttcacaggtagata
atgctcggggtcttgatagtttagcaataaatacagtttcagaatatctgtaatacaaaaactgtatcgagaca
agaaaaagtagcaaaatttacaatgttcatgattcatctggctaaaattggatgttcaactgaccattgtg
aggcatatgaatggaccaataataatgactagagaagaaagaatgaagattgttcatgaaattaaggaacgaa
tattggataaataggggatgagttaaggctattgggtgtttaggctctcttggctcagactgatggggc
ctattoggatattgagatgagtgtgtcatgtcaacagaggaagcagagttcagccatgaatggacaaccggt
gagtggagggtggaagtgaattttatagcgaagagattctactagattatgcatctcagggtggaatcagatt
ggcgccttacacatgggtcaatttttctctattttgccgatttatgattcagggtggaacttagagaaagtgt
tcaaaactgctaaaatggtagaagccaaaagtccacgatgogattttgtgccccttatcgtagaagagctgttt
gaatagtagcaggcaatggcgtaataatcgtgtgcaaggaccgacaacatttctaccaatccttgactgtacagg
tagcaatggcaggtgccatggtgattggctctgcatcactgcatctgttatacagcagagcgttcgctcttaac
tgaagcagttaagcaatcagatctctctcaggttatgaccatctgtgccagttcgtaatgtctgggtcaactt
tccgactctgagaaaactctggaatogctagagaatttctggaatgggattcaggagtggaacagaaacgacag
gatataatagtggtggtcaaaacgcataaccattttgaacggccgggtattgactgtatcgactctattgattg
tetaagaactgaaggattttgtaatactatggcgaatttttcccgccggcgctttctcatgaccgctgctgccac
aacggctgtgacattgatctcccacggctgtggoaatagccagcaaaactgactgacgttgtccaaccgaccacc
gtagcagaaaaccccggaagtgacgggcccgaactcggctttattgcccctcaccgatgcccggccccctgatta
ttgccaaggaaaaaggctattttccaagtatgggatgacctgatgtggaagtgttgaagcaggcgtcttgggg
cacaaccccgcgacaacttggtattgggttccgcctaaccggtggcattgacggtgccacatcctcacaccgatg
ccctatctaatactgctgtgggaaaaattaccggtggcaaacctgtaccatgtatatcttggcgcgggttaaca
ccaatggtcagggattctcttggogaatgcctataaagatctgaatatcagcaccgacagctcg

```

Figura 2.30. DNA genómico de células de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺. Secuencia del fragmento de DNA a partir del que se diseñaron las regiones de homología para la síntesis de C2. Fragmentos U1 (■), M1 (■) y D1 (■).

```

atgaccagta cgttccagc agaaaccagt ctgaataagt ttgaaaagct caagtccgaa
aaagacggtc tggcgggtaa gtctgaactg gaagactttg cccgtctggg ctgggaagcg
atggatgaaa cggaccggga tcatcgctg aggtggatgg gcgtgtttt tcgcccgta
agccagggta agtttatgct acggatgctg attccaatg gcattctcac cagtggccaa
attcgggttc tggcagaggt ggtcgagcgc tacggcgaag acggcaacgc cgacatcacc
acgcgcccaa acctccagct tcgcggcatt cggctagaag atattcccga catctttcga
cgttccgagc agtgggggct gaccagcatc cagtccggca tggcaaatg tcgcaacatc
acgggttcgc cgtgggagg catcgatgcc gacgagctaa tcgacactcg cggactggtt
cgcaaggtgc aagacatgat caccaacaac ggcgagggca acccgtcgtt tagtaatctg
ccgcgcaagt tcaacattgc gatcgccgga tgccgcgata actcggttca cgcgcgagtc
aacgacatcg cttttgtgcc gcctacaaa gacggcaagc tggcctttaa cgtactcgtc
ggcggattct tttcgccaa gcgctgcgaa gccgcgctgc cgtcaatgc ctgggtcgat
ccgcgagacg tggtggcct gtgcgaagcc atcctgatcg tctatcgaat cacgggctgc
ggggccaacc gccaaaagtc tcgcctgatg tggctaactg acgagtggg tatggataag
tttcgcccag aggtggagca gcagttgggt caccgcctgc aaaccgccc gcccaagat
gaaatcctct gggacaagcg cgaccacatc ggcattccacg cccaaaagaa gccagggtg
aattacgtag gctgctagt gccctcggg cggctctatg caccgatggt tgacctagct
cgcattgccg aagtctacgg cgacggcgaa atgcgtctga cggtcgaacg aaaacgtgat
cattcccga cgtcccgat gtccctcgtt gcgtccttac tcaaagagcc gctctagag
aagttttcgg tgaagtcagg cttattagtg cgatcgctcg tttcctgcac cggggcccag
ttctgcaatt tcgccctgat cgaaaccaa aatcgagcga tggcgtgat tcgagaactg
gaatccgagc tggaaactgc tcgccccgct cgcattccact ggacgggctg ccccaactcc
tcgggccagc ccaaagttgc cgacattggt ctgatgggca ccaaagtcg caaagacggt
aaagctaccg aaggcgtgga tctgtacatg ggcgccaaag tcggcaaaaca cggcgaactc
ggcaacctgt tcaaaaagg aattcctgc gatgacctca aacctatcct gcggaatctg
ctgatcgaac actttggcgc aagaccgaaa tga

```

Figura 2.31. Secuencia de *nirA* de *P. laminosum* tomada de la base de datos NCBI.

2.3.1.2.a. Síntesis del casete de conversión C2

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de las regiones homólogas se denominaron FU2, RU2, FD2 y RD2 (**Tabla 2.5**), dado que las zonas de homología son las mismas, siendo a su vez los oligonucleótidos FU2 y RD2 iguales a FU1 y RD1, respectivamente.

Se amplificaron los fragmentos U2, D2 y M2 (**Fig. 2.32**). Los oligonucleótidos RU2 y FD2 portaban una extensión de nucleótidos que servía para que, en la posterior etapa de PCR de unión (**Fig. 2.33**), estas regiones homólogas pudiesen ensamblarse a *nirA* de *P. laminosum*.

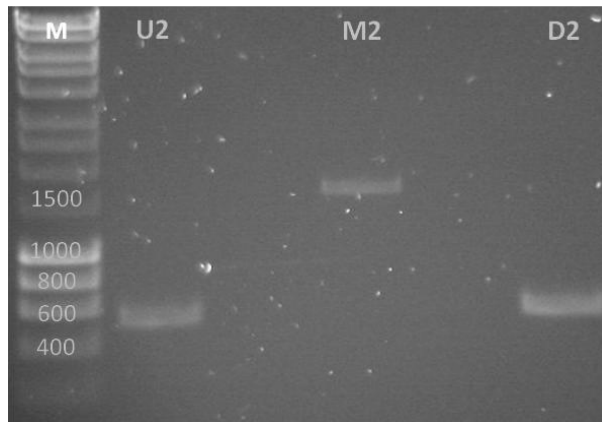


Figura 2.32. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos U2, M2 y D2 tras ser purificados a partir de geles de agarosa. M: marcadores HyperLadder I.

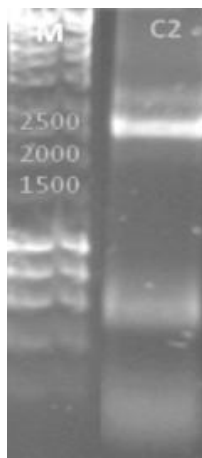


Figura 2.33. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR dirigida a sintetizar C2.

2.3.1.2.b. Transformación natural de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺ con pT7Blue-C2

Una vez comprobado en la construcción de las células de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺, que la transformación es más eficiente con DNA circular que con lineal, estas células se transformaron con el casete C2 clonado en el vector pT7Blue. Al plásmido así originado se le denominó pT7Blue-C2.

En este ensayo de complementación, el gen marcador del proceso de selección (M2) es *nirA* de *P. laminosum*. Por lo tanto, el gen marcador no es un gen de resistencia, sino un gen que aporta a las células que lo expresen, la capacidad de crecer en medio con nitrato o nitrito como única fuente nitrogenada. Para que esta ventaja sea efectiva, la selección se llevó a cabo en un medio cuya fuente nitrogenada era nitrato.

Se llevó a cabo un ensayo de complementación en el que la selección de las células transformadas se realizó, al igual que en otros casos, a 52°C. Tras la transformación y recombinación homóloga (**Fig. 2.34**), las células transformadas con pT7Blue-C2 originaban colonias en medio BG11, mientras que el control de células *nirA*⁻/*kat*⁺ no originaba colonias. Sin embargo, las colonias tardaron más de 15 días en hacerse visibles y presentaban color amarillento similar al de células de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻, o al que presentan células sometidas a deficiencia nitrogenada o bajo otras condiciones de estrés metabólico.

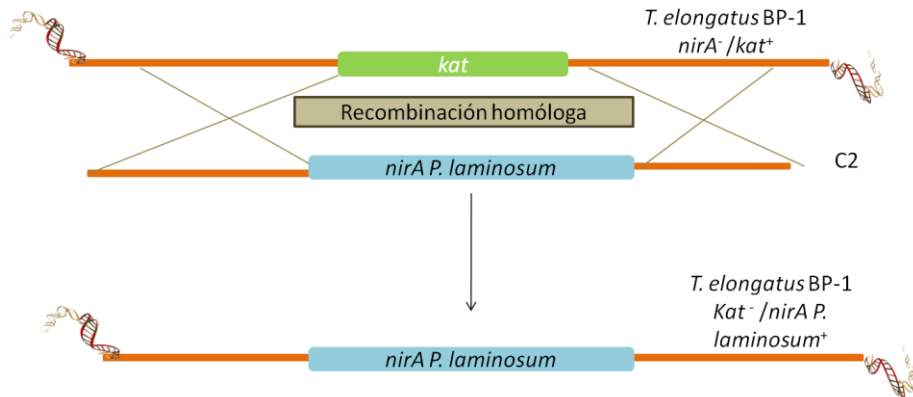


Figura 2.34. Proceso de recombinación homóloga entre C2 y el genoma de células de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺

Es importante resaltar, que en este caso, las células han pasado de crecer con amonio (antes de ser transformadas) a hacerlo con nitrato (medio de selección). El amonio es la fuente de nitrógeno más fácilmente asimilable, ya que no requiere gasto de poder reductor, ni la presencia de enzimas que lo reduzcan. Además, puede entrar al interior celular por transporte y en menor medida por difusión como NH_3 (Montesinos *et al.*, 1998; Vázquez-Bermúdez *et al.*, 2002; Muro-Pastor y Florencio, 2003). Sin embargo, nutrientes como el nitrato y el nitrito requieren la expresión de un mayor número de proteínas para posibilitar su incorporación al interior celular y su posterior reducción a amonio. Consecuentemente, cuando se sustituye una fuente nitrogenada del medio por otra menos favorable energéticamente, las células requieren un periodo de adaptación metabólica para sintetizar o adecuar los niveles de las proteínas necesarias para dicha asimilación.

Con el objetivo de facilitar la aclimatación de las células transformadas de *T. elongatus* BP-1, se realizaron subcultivos en medio BG11. En todos los casos, las células seguían mostrando el fenotipo característico de las que son incapaces de crecer en dicho medio. Estos resultados planteaban la duda de si las células habían incorporado o no el gen *nirA* de *P. laminosum*. Ante la incapacidad celular de crecer correctamente en medio BG11, se comprobó genotípicamente que las células habían incorporado el casete C2 en su genoma (**Fig. 2.35A**), así como el gen *nirA* de *P. laminosum* (**Fig. 2.35B**).

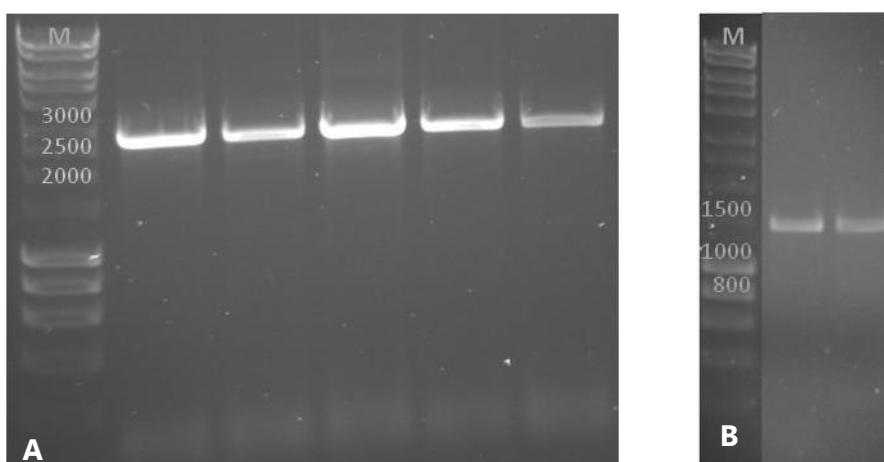


Figura 2.35. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de la PCR realizada con DNA de colonias de células transformadas de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺. Los oligonucleótidos empleados fueron (A) FD2 y RU2 y (B) *nirA*_{P₁F} y *nirA*_{P₁R}. M: marcadores HyperLadder I.

Se comprobó que las células transformadas de *T. elongatus* BP-1 habían incorporado C2, y también se detectó el gen *nirA* en dos de las cinco colonias analizadas elegidas al azar. El hecho de que sólo se detectase este gen en algunas colonias, podría deberse a que las células no habían sido lisadas correctamente, y por tanto, no era buena la amplificación. Es importante subrayar que los oligonucleótidos *nirA*_{P,I}F y *nirA*_{P,I}R hibridan justo en los extremos de *nirA* de *P. laminosum*, así como que son muy distintos a los necesarios para amplificar *nirA* de *T. elongatus* BP-1.

Existen varias explicaciones posibles al hecho de que células transformadas de *T. elongatus* BP-1 no puedan crecer adecuadamente en medio BG11. Así, podría haber sucedido, que en el proceso de clonación/transformación, *nirA* haya sufrido alguna mutación que no permitiera que la proteína codificada se expresase correctamente.

Otra explicación estaría basada en la diferente termoestabilidad de la proteína NirA de ambas cianobacterias. La selección y posteriores subcultivos de las células transformadas de *T. elongatus* BP-1 se llevaron a cabo a 52°C. Podría ser que dicha temperatura no sea óptima para la expresión y/o la actividad *in vivo* de NirA de *P. laminosum*, ya que este microorganismo (cuya temperatura óptima de crecimiento es 45°C) tiene un carácter termofílico menos marcado que *T. elongatus* BP-1.

Ensayos de estabilidad térmica realizados *in vitro* con preparaciones de NirA purificada de células silvestres de *P. laminosum* (Arizmendi y Serra, 1990) indicaban que la proteína es totalmente termoestable cuando se preincuba 10 min hasta 40°C. A partir de esta temperatura la actividad disminuye drásticamente y el enzima pierde el 96% de su actividad inicial a 60°C.

Considerando la posible inestabilidad térmica *in vivo* de NirA de *P. laminosum*, se repitió el mismo ensayo de transformación pero realizando la selección a 48°C. Además, se disminuyó la intensidad luminosa, fundamentalmente cuando la densidad celular era baja, para evitar la fotoinhibición del crecimiento celular.

Después de 10 días de la transformación, se obtuvieron varias colonias en placas con medio BG11. En general, el número de colonias era mayor que cuando la selección se llevó a cabo a 52°C. Además, esta vez se observó que el número de colonias aumentó a medida que lo hacía el DNA empleado para la transformación.

Se analizó, por PCR, la presencia de C2 en estas colonias (**Fig. 2.36A**), comprobándose la sustitución de *kat* por *nirA* de *P. laminosum*. Se observa en la **Figura 2.36A** que las colonias están transformadas en distinta medida, quedando en todas ellas alguna copia de *kat*, ya que en todos los casos aparece la banda correspondiente a 1800 pb. Además, todas las colonias analizadas han incorporado *nirA* en su genoma (**Fig. 2.36B**).

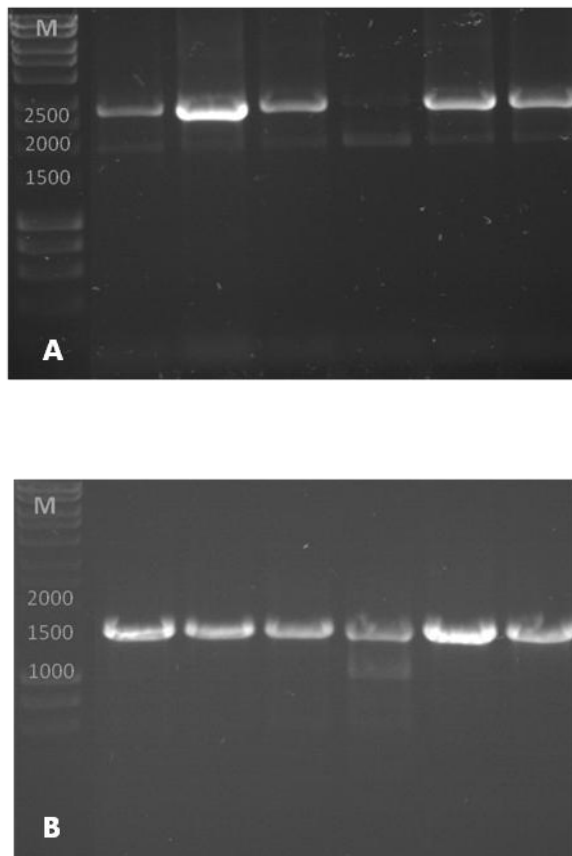


Figura 2.36. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de las PCRs realizadas con el DNA de algunas colonias de células transformadas de *T. elongatus* BP-1 que crecieron en placas BG11. La PCR se llevó a cabo con los oligonucleótidos: **(A)** FD2 y RU2. **(B)** *nirA_{P,1}F* y *nirA_{P,1}R*.

Se tomaron al azar diversas colonias de las placas en medio BG11, y una vez analizadas genóticamente (**Figs 2.36A y 2.36B**), se subcultivaron varias veces en medio sólido. Inicialmente, las colonias de células de *T. elongatus* BP-1 complementadas con el gen *nirA* de *P. laminosum*, se cultivaron en medio con amonio (BG11sinSA) para aumentar la densidad celular. Posteriormente, se cultivaron en medio con nitrato (BG11).

Tras varios subcultivos a 48°C y una intensidad luminosa baja para proteger las células del exceso de luz, crecieron algunas colonias en medio líquido BG11 mostrando un fenotipo normal de células capaces de crecer en medio con nitrato como única fuente nitrogenada. Estas células eran además incapaces de crecer en medio suplementado con kanamicina.

Finalmente, se analizó el crecimiento en medio con nitrato (BG11) de las células de *T. elongatus* BP-1 *nirA*⁻/*kat*⁺ complementadas con *nirA* de *P. laminosum*.

El crecimiento se evaluó a 45°C y a 55°C temperatura óptima de crecimiento de *P. laminosum* y de *T. elongatus* BP-1, respectivamente. Simultáneamente, se analizó el crecimiento de células de *P. laminosum* y silvestres de *T. elongatus* BP-1 (**Fig. 2.37**). De esta manera, se pretendía averiguar si el crecimiento de *T. elongatus* BP-1 estaba afectado por el hecho de que las células portasen en el genoma su propio gen *nirA* o el correspondiente de *P. laminosum*.

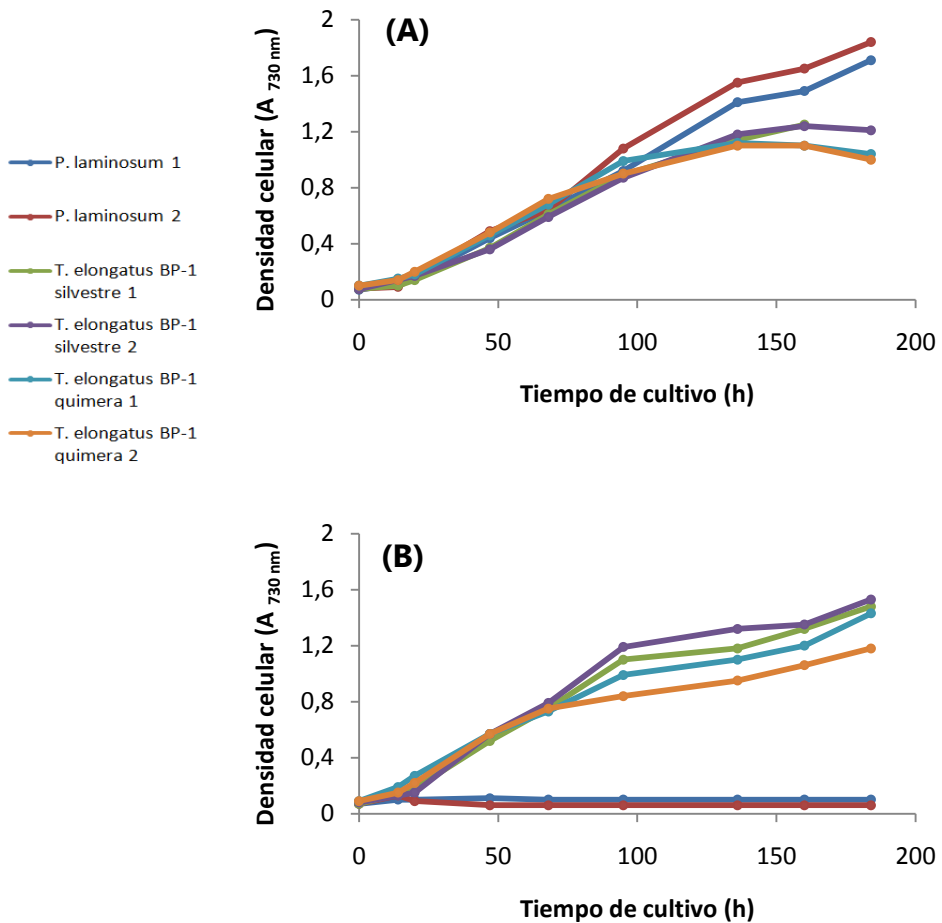


Figura 2.37. Crecimiento a (A) 45°C y (B) 55°C en medio BG11 de células de *P. laminosum*, y de *T. elongatus* BP-1 bien sea silvestres o quiméricas.

A 45°C (**Fig. 2.37A**) las células de *P. laminosum* crecen mejor que las silvestres o las quiméricas de *T. elongatus* BP-1, observándose una ligera diferencia a favor de las silvestres a partir de las 125 h.

A 55°C (**Fig. 2.37B**) se comprueba que las células de *P. laminosum* son incapaces de crecer, mientras que lo hacen de forma satisfactoria las de *T. elongatus* BP-1. Como antes, también se observan diferencias de crecimiento entre las células silvestres y quiméricas de *T. elongatus* BP-1, siendo las silvestres las que presentan un ligero mayor crecimiento.

3. LA NITRITO REDUCTASA DE *T. elongatus* BP-1

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Nitrito reductasa: reducción de nitrito a amonio

La reducción asimilatoria de nitrato a amonio es un paso clave del ciclo del nitrógeno en la Biosfera. Como se ha descrito en el apartado **1.1.3**, una vez incorporado al interior celular, el nitrato es reducido a amonio por la acción secuencial de las actividades catalíticas de la nitrato reductasa (NarB) y de la nitrito reductasa (NirA), siendo éste segundo enzima, el encargado de la reducción del nitrito a amonio (Guerrero y Lara, 1987) (**Fig. 3.1**).

NirA es un enzima homólogo al correspondiente de plantas superiores, ya que ambos emplean los electrones ($6e^-$) cedidos por la ferredoxina reducida fotosintéticamente para catalizar la reducción de nitrito a amonio (Manzano *et al.*, 1976). De manera artificial, las nitrito reductasas pueden aceptar los electrones necesarios para reducir el nitrito de otros donadores, como es el caso del metil viológeno. La unión entre la ferredoxina y NirA está mediada por interacciones electrostáticas proteína:proteína. De hecho, en diversas nitrito reductasas de microalgas y de cianobacterias se han descrito regiones ricas en aminoácidos cargados positivamente, que contribuyen a dicha interacción (García-Sánchez *et al.*, 1997; Curdt *et al.*, 2000).

Este tipo de nitrito reductasas asimilatorias necesita dos grupos prostéticos para llevar a cabo la reducción del nitrito. Por una parte, el *cluster* [Fe₄-S₄] y por otra el grupo sirohemo. En algunas cianobacterias se ha comprobado que el gen *cysG*, que codifica un enzima involucrado en la síntesis del sirohemo, se encuentra situado junto al gen *nirA* de la nitrito reductasa (Bird y Wyman, 2003). A nivel estructural, se ha descrito que el flujo de electrones comienza en la ferredoxina y se dirige de uno en uno al *cluster* [Fe₄-S₄] (Knaff y Hirasawa, 1991). Posteriormente, el electrón llega al sirohemo que coordina el nitrito, para que éste, finalmente, sea reducido a amonio (Vega y Kamin, 1977; Luque *et al.*, 1993; Swamy *et al.*, 2005).

Las nitrito reductasas de cianobacterias han sido objeto de estudio a distintos niveles (Manzano *et al.*, 1976; Yabuki *et al.*, 1985; Guerrero y Lara, 1987; Arizmendi y Serra, 1990; Luque *et al.*, 1993; Omata *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 1995) y se ha comprobado que presentan propiedades bioquímicas muy similares a las de otras nitrito reductasas asimilatorias de plantas y algas, pero son muy distintas a las caracterizadas de organismos no fotosintéticos (Méndez y Vega, 1981; Arizmendi y Serra, 1990).

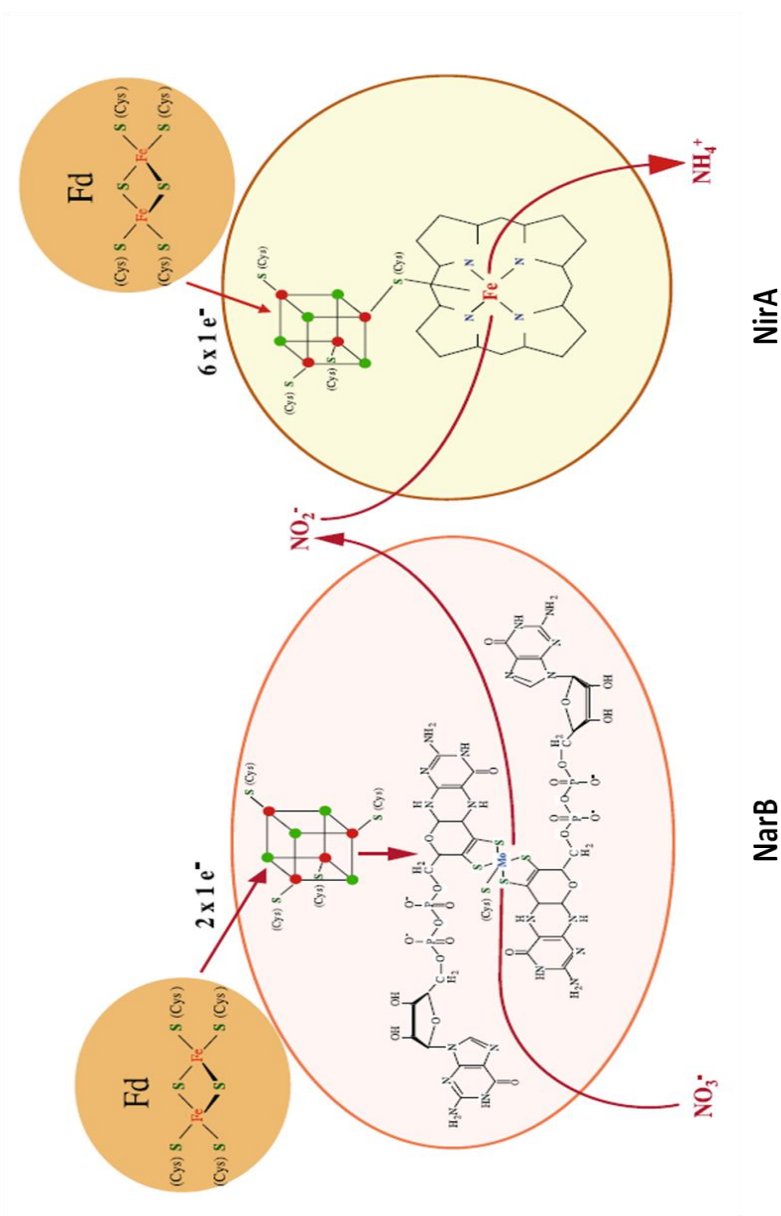


Figura 3.1. Esquema de la reducción del nitrato a amonio catalizada por la nitrato reductasa (NarB) y nitrito reductasa (NirA) de *Synechococcus elongatus* PCC 7942. Se indica el sustrato de cada una de ellas, los grupos prostéticos {cluster hierro (rojo) azufre (verde), el cofactor de molibdeno para NarB y el cofactor de sirohemo para NirA} y el flujo electrónico (tomado de Flores *et al.*, 2005).

3.1.1.1. **Nitrito reductasa de *P. laminosum***

La nitrito reductasa de *P. laminosum* ha sido purificada a partir de células crecidas en nitrato como fuente nitrogenada. El protocolo de purificación consta de 6 etapas cromatográficas, y la NirA así purificada es un enzima soluble que consiste en una única cadena polipeptídica de 54 kDa.

Este enzima, cataliza la reducción de nitrato a amonio empleando tanto ferredoxina como flavodoxina, metil viológeno y bencil viológeno reducidos como donadores de electrones. Los valores de K_m calculados para el nitrito y la ferredoxina son 40 μM y 22 μM , respectivamente.

La proteína purificada muestra los máximos de absorción a 281 nm, 391 nm (Soret), 570 nm (α) y 695 nm, característicos de las enzimas que tienen sirohemo como grupo prostético. Las características físico-químicas, catalíticas, cinéticas y espectrales del enzima indicaron que es similar al correspondiente de organismos eucarióticos fotosintéticos (Arizmendi y Serra, 1990).

3.1.1.2. **Nitrito reductasa de *T. elongatus* BP-1**

Aunque se conoce su secuencia aminoacídica, NirA de *T. elongatus* BP-1 es un enzima que aún no ha sido estudiado.

La NirA de *P. laminosum* y de *T. elongatus* BP-1 muestran una identidad del 67,1% (Fig. 3.2)

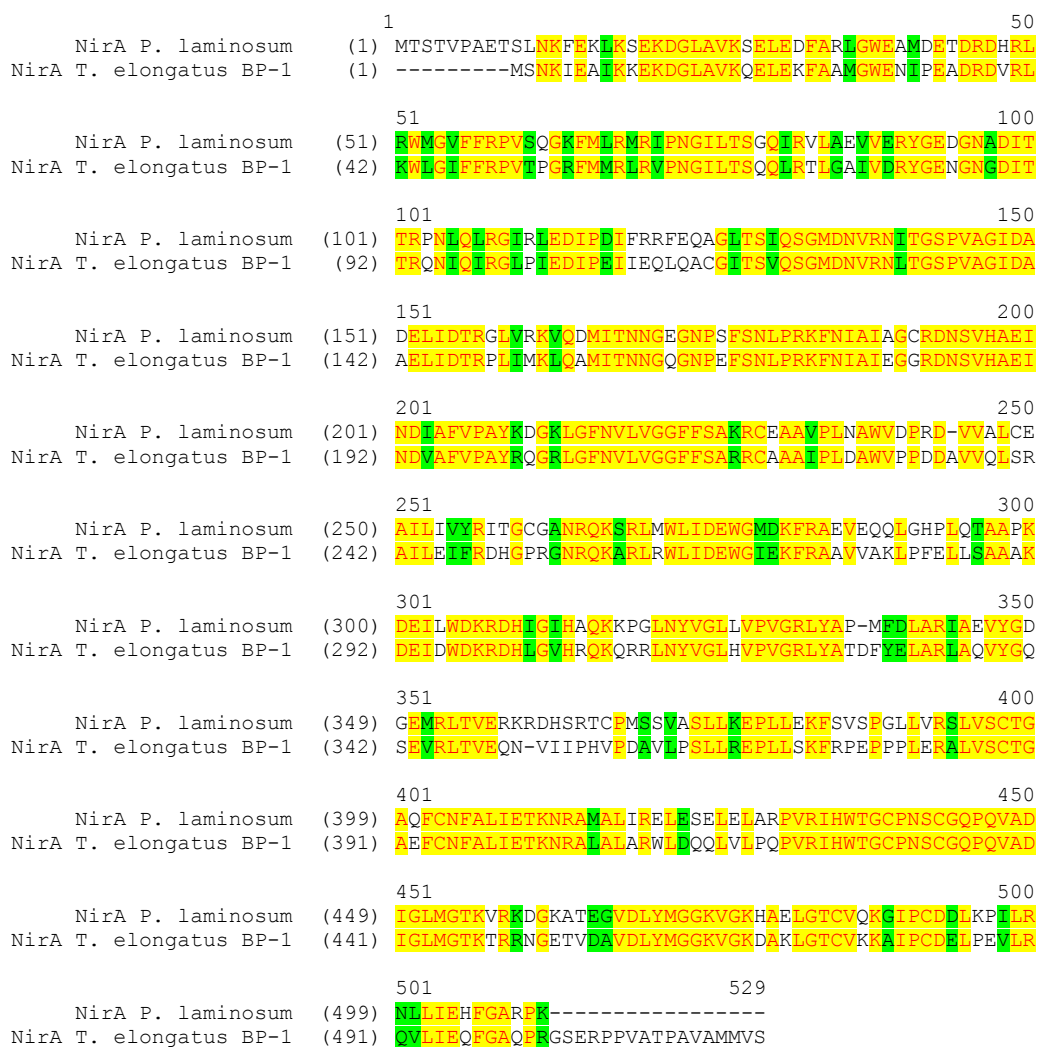


Figura 3.2. Comparación entre las secuencias de NirA de *P. laminosum* y de *T. elongatus* BP-1. Las secuencias se tomaron de la base de datos NCBI y se alinearon utilizando el programa Vector NTI™. Los aminoácidos idénticos aparecen en rojo sobre fondo amarillo, los similares aparecen en negro sobre fondo verde, y los no similares en negro.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Reactivos y productos empleados específicamente en este capítulo agrupados por proveedores. En cada caso se indica la ciudad y el país de origen.

Proveedor	Reactivos y productos
BioRad Hércules, CA, EEUU	Acrilamida/bisacrilamida 30% (p/v) Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range Reactivo de Bradford Trans-Blot membrana de nitrocelulosa Unstained Precision Plus Protein Standards
GE Healthcare Upsala, Suecia	Azul de Coomassie: PhastGel Blue R CL-4B-proteína A Sepharose IgG2a antihistidinas de ratón Sepharose™ Fast Flow Quelante
Merck Darmstadt, Alemania	Acetona Ácido tricloroacético β -Mercaptoetanol N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) Persulfato amónico Seroalbúmina bovina (BSA)
Millipore Co Bedford, MA, EEUU	Unidades de filtración por centrifugación
5Prime Gaithersburg, MD, EEUU	Taq DNA polimerasa
Quimivita Badalona, España	Ácido clorhídrico Metanol
Roche Mannheim, Alemania	Inhibidores de proteasas sin EDTA

Sigma-Aldrich St.	Anti-IgG de conejo conjugada a fosfatasa alcalina
Louis, MO, EEUU	Anti-IgG de ratón conjugada a fosfatasa alcalina Dodecilsulfato sódico (SDS) Etanolamina Glicina Imidazol Leche en polvo Metil viológeno N-(1-Naftil)etilen-diamida (NEDA) NBT-BCIP [®] solution Seroalbúmina bovina (BSA) Sulfanilamida Sulfato de níquel Tween-20
Thermo Scientific	Dimetilpimelimidato Taq DNA polimerasa
Ashford, Reino Unido	
Whatman[®]	DEAE-celulosa (DE-52)
Maidstone, Reino Unido	

Tabla 3.2. Cepas bacterianas y plásmidos empleados para la expresión heteróloga en *E. coli* de NirA de *T. elongatus* BP-1.

Cepa y plásmidos	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	derivadas de <i>E. coli</i> K12 Nal^{S} Str^{S} Rif^{S} Thi^{-} Lac^{-} Ara^{+} Gal^{+} Mtl^{-} F^{-} RecA^{+} Uvr^{+} Lon^{+} , plásmido pREP4 Km^{r}	Qiagen
pREP4	plásmido represor (derivado de pACYC con replicón p15A) $\text{lac I km}^{\text{r}}$	Qiagen
pQE-30 UA	vector de expresión Ap^{r}	Qiagen
pQE-30 UA nirA	pQE-30UA Ap^{r} codifica His_6NirA	Este trabajo

Para la clonación de NirA se seleccionó el vector pQE-30UA (**Fig. 3.3**). Este vector permite el clonaje directo de productos de PCR, evitando el empleo de enzimas de restricción. Para que puedan ligarse el plásmido y el inserto, es necesario o bien emplear para la amplificación del inserto una polimerasa que no posea actividad exonucleasa 3'-5', o bien tratar el producto amplificado con una polimerasa de alta fidelidad, para que porte una adenina (A) en sus extremos 3'. De esta manera la A de los extremos 3' del inserto se une por complementariedad con el vector, produciéndose así la ligación de ambos.

Este vector contiene además el gen *bla*, que codifica la β -lactamasa y le confiere resistencia a la ampicilina, y una secuencia que codifica para la expresión de una etiqueta de 6 residuos consecutivos de histidina en el extremo N-terminal de la proteína de fusión. Esta etiqueta de hexahistidinas permite la posterior purificación de la proteína recombinante por IMAC (Immobilized-Metal Affinity Chromatography).

La expresión de los genes clonados en los vectores de la serie pQE requiere altos niveles del represor lac. Las células de *E. coli* M15, empleadas como hospedadoras de los vectores pQE, contienen un plásmido pREP4 que codifica *lacI*. El represor lac se une a la secuencia promotora, lo que impide a la RNA polimerasa de la célula hospedadora transcribir la secuencia clonada. Para inducir la expresión de proteínas recombinantes clonadas en vectores pQE se emplea isopropil- β -D-tiogalactósido (IPTG). Este inductor se une al represor lac, bloqueando así su unión a la región promotora, de forma que la RNA polimerasa es capaz de transcribir la secuencia clonada tras el promotor.

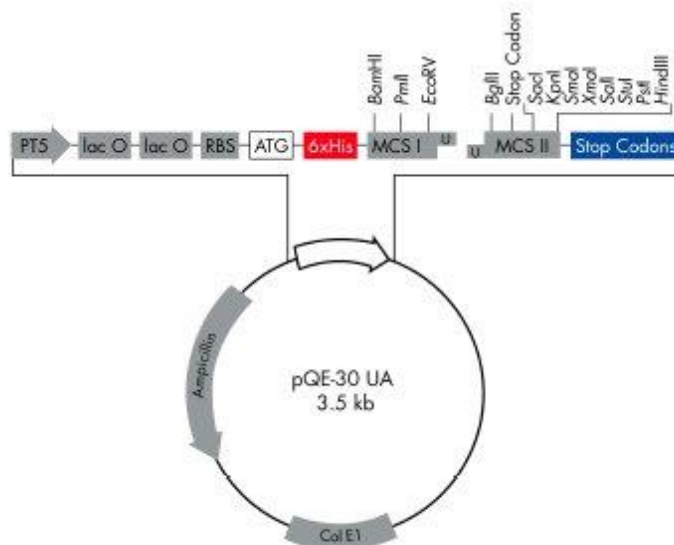


Figura 3.3. Mapa del vector pQE-30UA (Qiagen).

3.2.1. Amplificación de DNA mediante PCR

Las reacciones de amplificación de DNA por PCR se llevaron a cabo en un termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Hybaid, Ashford, Middlesex, Reino Unido). El gen *nirA* se amplificó empleando los oligonucleótidos *FnirA* y *RnirA* diseñados a partir de la secuencia de *nirA* publicada en la base de datos CyanoBase: www.genome.kazusa.or.jp/cyanobase/Thermo.

Las condiciones del programa de PCR aparecen detalladas en la **Figura 3.4**. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 50 μ l, que contenía como molde 30 ng de DNA genómico de *T. elongatus* BP-1, 0,4 μ M de cada oligonucleótido (**Tabla 3.3**), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, 5 μ l de tampón de PCR (10x) y 1 U de Taq DNA polimerasa.

Tabla 3.3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de *nirA* de *T. elongatus* BP-1. Se detalla la temperatura de fusión (T_f), la longitud y el contenido GC de cada uno de ellos.

Nombre	Secuencia 5'-3'	T_f (°C)	Longitud (pb)	% GC
<i>FnirA</i>	gtgagcaacaaaattgaagc	53,2	20	40
<i>RnirA</i>	ttaggagaccatcatggcca	57,3	20	50

	T (°C)	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	5 min	
30 x	Desnaturalización	95	30 s
	Hibridación	*	1 min
	Elongación	68	2 min
	Elongación final	68	10 min

Figura 3.4. Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación de *nirA* de *T. elongatus* BP-1. Se realizó un gradiente de temperaturas de hibridación desde 44,8°C hasta 52,3°C.

El tamaño del fragmento amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) como se detalla en el apartado 2.2.4. El fragmento de DNA correspondiente a *nirA* se purificó a partir del gel de agarosa (como se indica en el apartado 2.2.4.1.a).

3.2.2. Construcción del plásmido pQE-30UA-His₆NirA

El vector linealizado y el producto de PCR amplificado se incubaron durante 16 h a 16°C en la mezcla de reacción, que contenía 4 µl de producto de PCR, 1 µl de vector pQE-30UA y 5 µl de solución de ligación (Ligation Master Mix, Qiagen).

3.2.3. **Transformación de células competentes**

Para la expresión de la proteína NirA recombinante se utilizaron células de *E. coli* M15 [pREP4] (**Tabla 3.2**). La mezcla de reacción de ligación se utilizó para la transformación por choque térmico a 42°C durante 90 s de células de *E. coli* [pREP4] que se hicieron competentes mediante el método que emplea RbCl y CaCl₂, descrito por Qiagen (2003).

Las células transformadas se seleccionaron en placas LB agar 1,5% (p/v) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina. La cepa de *E. coli* M15 [pREP4] es resistente a kanamicina, y los plásmidos de la serie pQE a la ampicilina, de tal forma que en presencia de ambos antibióticos sólo crecen las células que han incorporado el vector, bien con inserto o bien sin él. Para identificar las colonias positivas, éstas se analizaron como se detalla en el apartado **2.2.10.3**.

3.2.4. **Métodos colorimétricos**

3.2.4.1. **Determinación de proteína**

La concentración de proteína total se determinó según Bradford (1976) empleando seroalbúmina bovina (BSA) como proteína patrón. Se añadieron 200 µl del reactivo comercial de Bradford a 800 µl de muestra, y se leyó la absorbancia a 595 nm. Para determinar la concentración de proteína en las muestras, previamente, se realizó una recta patrón de BSA (0-17 µg), empleándose una disolución madre de 0,25 mg/ml de BSA.

3.2.4.2. **Determinación de nitrito**

El nitrito se determinó según el método descrito por Snell y Snell (1949). A 400 μ l de muestra, se adicionaron 400 μ l de sulfanilamida 58 mM en HCl al 10% (v/v) y 400 μ l de N-(1-naftil)etilen-diamina (NEDA) 3,9 mM. La muestra se incubó durante 10 min para que se desarrollase el color y posteriormente se leyó la absorbancia a 540 nm. Para determinar la concentración de nitrito en las muestras, previamente, se realizó una recta patrón de 0-10 μ M de nitrito.

3.2.5. **Métodos analíticos: electroforesis y Western blot**

3.2.5.1. **Electroforesis**

Para la electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) se utilizó una cubeta Mini-PROTEAN[®] 3 de Bio-Rad (Hercules, PA, EEUU). Se emplearon geles de 1 mm de espesor, con 10-12% (p/v) de poliacrilamida en el gel separador y 4% (p/v) en el concentrador. Como tampón de electrodos se empleó Tris 3,0 % (p/v), glicina 14,4% (p/v) y SDS 1% (p/v). El tampón de muestra, cuya composición se detalla en la **Tabla 3.4**, se añadió en una proporción 1:2 (v/v) con respecto al volumen de la muestra, y la mezcla se calentó durante 5 min a 95°C.

Para la separación electroforética se utilizó un voltaje inicial de 50-60 V (hasta que las muestras superaron la frontera entre el gel concentrador y el separador) y después se ascendió hasta 100-150 V hasta que concluyó la electroforesis.

En los geles se cargaron marcadores de masa molecular sin teñir, en el caso de que los geles fuesen a ser teñidos posteriormente, o preteñidos, si los geles eran empleados para la detección de proteínas mediante *Western blot*.

Tras finalizar la electroforesis, y según cual fuese su finalidad, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie, o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para la posterior detección de las proteínas diana mediante *Western blot*.

Tabla 3.4. Composición del tampón de muestra. Antes de usarlo se suplementó con 50 μ l de β -mercaptoetanol por cada 950 μ l de tampón de muestra.

Compuesto	Concentración
Tris- HCl, pH 6,8	62,5 mM
Glicerol	25% (v/v)
SDS	2% (p/v)
Azul de bromofenol	trazas

3.2.5.2. **Western blot**

Los geles se equilibraron, junto con las membranas de nitrocelulosa, durante 20 minutos en tampón de transferencia (Tris 0,30% (p/v), glicina 1,44% (p/v), metanol 20% (v/v)). Para la transferencia se empleó un equipo Multiphor II (GE Healthcare, Upsala, Suecia). El gel, junto con la membrana, se colocaron sobre la base anódica de grafito rodeados ambos de papeles de filtro 3 MM de Whatman (Maidstone, Reino Unido) empapados en tampón de transferencia. Se conectó el equipo a una fuente de alimentación ECPS 3000/150 (GE Healthcare, Upsala, Suecia) y se transfirieron las proteínas durante 1 h a una intensidad de 150 mA.

La membrana se lavó con TBS (Tris 0,05 M, NaCl 150 mM, pH 7,5) y se incubó 16 h a 4°C en tampón de bloqueo (BSA al 1% (p/v), leche descremada al 1% (p/v) y Tween 20 al 0,3% (p/v) en TBS).

Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario en tampón de bloqueo, y se incubó 1 h a temperatura ambiente y con agitación suave. Se lavó la membrana 5 veces durante 5 min cada vez con TBS, y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o de ratón, conjugado a fosfatasa alcalina, a una dilución 1/2000 (v/v) en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavó la membrana de nuevo con TBS, y se procedió a su revelado. El tipo y concentración de anticuerpo primario empleado se detalla en los aparatados correspondientes

Para visualizar la localización de la proteína diana, se incubó la membrana en 5 ml de solución de detección (0,1 M de Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M de NaCl, 50 mM de $MgCl_2$ y 100 μ l de NBT-BCIP[®]) con agitación hasta que apareció la banda indicativa de la actividad fosfatasa alcalina. La reacción se detuvo lavando la membrana abundantemente con agua destilada.

3.2.6. **Expresión y purificación de His₆NirA de *T. elongatus* BP-1**

Las células transformadas de *E. coli* se cultivaron durante 16 h a 37°C en medio LB (2 x 100 ml), suplementado con 25 μ g/ml de kanamicina y 100 μ g/ml de ampicilina. El cultivo se escaló a 1 l, y se incubó a 37°C hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,6-0,8 unidades. Se indujo la expresión a 25°C con IPTG a una concentración final de 0,3 mM durante 90 min. Las células se cosecharon por centrifugación a 8000 $\times g$ durante 10 min, a 4°C, en una centrífuga Kubota 7820 (Kubota Corporation, Tokio, Japón), y se resuspendieron en 25 ml de tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 7,3. La suspensión celular se incubó con lisozima (0,1% p/v) durante 1 h a 4°C. Las células se lisaron por ultrasonación durante 15 min a una amplitud del 14% (60 s on/30 s off) en un ultrasonador Branson Sonifier[®] 250 (Danbury, CT, EEUU). El lisado celular se centrifugó a 9500 $\times g$ durante 30 min a 4°C.

El sobrenadante obtenido se cromatografió en una columna de Sepharose quelante Fast-Flow, previamente activada con Ni^{2+} y preequilibrada con tampón de lisis. La cromatografía se llevó a cabo en un equipo ÄKTA UPCBasic controlado mediante el software UNICORN 5.1. (GE-Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). La columna se lavó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 7,3 y la elución de His₆NirA se llevó a cabo con un gradiente de imidazol lineal (de 20 mM a 250 mM) de 30 ml a un flujo de 1 ml/min en tampón Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7,3. La pureza de las fracciones de 1,5 ml recogidas se analizó mediante SDS-PAGE.

Las fracciones activas se juntaron y almacenaron a 4°C ó a -20°C. En la mayoría de los casos, debido a que la proteína presentaba una alta tendencia a formar agregados de color blanco constituidos por proteína insolubilizada, las fracciones se diluyeron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,3, hasta una concentración final de aproximadamente 0,1 mg proteína/ml.

3.2.7. **Digestión de proteínas en gel**

Las bandas correspondientes a las proteínas se recortaron del gel y se sometieron a digestión trípica siguiendo el método de Shevchenko *et al.* (1996). Una vez deshidratadas con acetonitrilo, se sometieron a digestión *in situ* con tripsina (12.5 ng/ μ l) (Roche Diagnostics, Manheim Alemania) durante 16 h a 37°C.

Los péptidos así obtenidos se extrajeron del gel empleando primero una solución al 50% (v/v) de acetonitrilo (ACN), y después con ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) en ACN. Estas muestras se secaron por centrifugación a vacío, y antes del análisis los sedimentos se resuspendieron en 10 μ l de ácido fórmico (FA) al 0,1% (v/v) y se aplicaron directamente en el sistema de cromatografía líquida.

3.2.8. **Cromatografía líquida y espectrometría de masas.**

Los espectros de masas en tándem se obtuvieron en el Servicio General de Proteómica de la UPV/EHU utilizando un espectrómetro de masas SYNAPT HDMS (Waters™ Corporation, Milford, MA, EEUU) conectado a un sistema de cromatografía NanoAcquity UPLC (Waters).

Se tomaron 8 μ l de la muestra de péptidos generados en la digestión tríptica y se cargaron en una precolumna Symmetry 300 C18, 180 μ m x 20 mm (Waters™). Se lavó la precolumna con FA 0.1% (v/v) durante 3 minutos a un flujo de 5 μ l/min, y se conectó a una columna BEH130 C18, 75 μ m x 200 mm, 1,7 μ m (Waters™) equilibrada en ACN 3%, FA 0,1%. El flujo se ajustó a 0,3 μ l/min, y los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 30 min entre 3% y 60% de ACN directamente en la punta capilar del nano-electrospray. El voltaje del capilar se ajustó entre 3000-3500 V para obtener la mejor relación señal/ruido.

Para la obtención de espectros MS/MS, el espectrómetro de masas se programó en modo DDA (*Data Dependent Acquisition*) en el cual se fragmentan los 3 precursores más intensos de cada barrido en un intervalo de m/z entre 350-1990, que contengan 2, 3 o 4 cargas positivas, y con una intensidad superior a 20 cuentas/barrido. Los espectros de masas se procesaron con el programa VEMS (Matthiesen *et al.*, 2004) y se contrastaron frente a la base de dato pública NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el motor de búsqueda MASCOT (Matrixscience). Para la identificación de las proteínas se establecieron los siguientes parámetros de búsqueda: carboxiamidometilación completa de cisteínas, oxidación variable de metioninas, error máximo en la masa peptídica 50 ppm, error máximo en la masa de los fragmentos, 0,1 Da, digestión con tripsina y omisión de lugares de corte, 1.

Tanto la digestión de proteínas en gel como la cromatografía líquida y la espectrometría de masas fueron realizadas en el Servicio General de Proteómica de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

3.2.9. **Ensayo de la actividad nitrito reductasa**

La actividad NirA se ensayó empleando como donador artificial de electrones metil viológeno reducido con ditionito sódico. A un volumen de 1 ml, que contenía el enzima en tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, se le adicionaron 500 μ l de tampón que contenía Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 con 8 mM de NaNO₂ y 9,6 mM de metil viológeno. La mezcla se preincubó 5 min a 45°C, y posteriormente se inició la reacción con la adición de 100 μ l de una disolución de ditionito sódico 320 mM en NaHCO₃ 0,3 M.

La reacción se detuvo, al cabo de 15 minutos, agitando vigorosamente los tubos hasta decolorar el metil viológeno reducido con el objetivo de oxidar por completo el ditionito sódico. Como controles se emplearon tubos a los que el ditionito sódico se adicionó previamente oxidado.

Se tomaron 100 µl de las muestras y se llevaron a un volumen final de 5 ml con agua destilada. Posteriormente, se tomaron 400 µl de esta dilución para la determinación del nitrito.

3.2.10. Caracterización de la actividad nitrito reductasa *in vitro* catalizada por His₆NirA

3.2.10.1. Efecto de la temperatura en la actividad

Para determinar la temperatura óptima de actividad, se realizaron ensayos a distintas temperaturas: 30°C, 35°C, 40°C, 45°C y 50°C.

3.2.10.2. Estabilidad térmica de His₆NirA

Se analizó el efecto que tenía sobre la estabilidad de la actividad nitrito reductasa la preincubación del enzima a distintas temperaturas. La preincubación (10 min) se realizó en ausencia y en presencia de NaNO₂.

3.2.10.3. **Efecto del pH en la actividad**

Para determinar el pH óptimo de actividad, se ensayó la actividad empleando tampones 0,1 M de fosfato sódico y 0,1 M de Tris-HCl ajustados a distintos valores de pH. El pH que se consideró para la representación gráfica era el registrado al final de la reacción empleando un pHmetro 3510 Jenway (Essex, Reino Unido).

3.2.10.4. **Propiedades cinéticas de la actividad**

La actividad nitrito reductasa catalizada por His₆NirA se determinó con distintas concentraciones de NaNO₂ (2,5 μM, 10 μM, 50 μM, 100 μM, 250 μM). El ajuste de los datos cinéticos obtenidos se realizó por regresión no lineal a una hipérbola rectangular equilátera empleando el Excel con la herramienta Solver. Con los datos obtenidos se calcularon los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$).

3.2.10.5. **Análisis estadístico de los resultados**

Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces y las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado.

3.2.11. **Obtención de anticuerpos policlonales anti-His₆NirA**

Para llevar a cabo el protocolo de inmunización de dos conejos, se empleó una preparación purificada de His₆NirA obtenida por IMAC en la elución de la columna equilibrada con Ni²⁺.

Los sueros obtenidos tras el proceso de inmunización se purificaron por cromatografía de afinidad en una columna de agarosa en la que se inmovilizó una muestra soluble de His₆NirA obtenida en la elución de la columna de IMAC equilibrada con Ni²⁺ (Abyntek, Derio, España).

3.2.12. **Purificación de la nitrito reductasa de células silvestres de *T. elongatus* BP-1**

3.2.12.1. **Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa**

Cultivos de células silvestres de *T. elongatus* BP-1, crecidas con nitrato en medio BG11 y luego sometidas a deficiencia nitrogenada en medio BG11sin, se cosecharon y lavaron 2 veces con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, a 4°C por centrifugación durante 5 min a 1500 ×g en una centrífuga Allegra™ X-22R (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU). Finalmente, las células se resuspendieron en 50 ml de tampón de lavado, se adicionó lisozima al 0,1% (p/v) y se incubó la suspensión celular durante 1 h a 4°C. Se adicionaron 2 pastillas de inhibidores de proteasas y la preparación se ultrasonó durante 25 min (60 s *on*/30 s *off*) a una amplitud del 14% mediante un ultrasonador Branson Sonifier® 250 (Danbury, CT, EEUU). El lisado celular se centrifugó 2 veces a 9500 ×g durante 30 min a 4°C en la misma centrífuga que la utilizada para el lavado de las células.

El lisado celular se aplicó a un flujo de 0,1 ml/min a una columna (1,6 × 8 cm) de DEAE-celulosa (DE-52) previamente equilibrada en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. La cromatografía se llevó a cabo en un equipo ÄKTA UPCBasic controlado mediante el software UNICORN 5.1. (GE-Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). La columna se lavó con tampón de equilibrado, y las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente lineal de 40 ml de KCl de 0-1 M en tampón de equilibrado a un flujo de 1 ml/min.

Se recogieron fracciones de 5 ml que se analizaron por SDS-PAGE seguida de *Western blot*. Las fracciones activas seleccionadas para la siguiente cromatografía de inmunoafinidad se juntaron y se dializaron durante 16 h a 4°C frente a tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0.

3.2.12.2. Preparación de la columna de inmunoafinidad

Se pesaron 0,4 g de resina Sepharose CL-4B-Proteína A y se hidrataron sobre 40 ml de agua ultrapura (MilliQ, Millipore, Bedford, MA, EEUU). La resina se agitó suavemente con una pipeta de vidrio y se incubó 16 h a 4°C. Transcurrido este tiempo se decantó el líquido y se añadieron 750 µl de Tampón de Unión (borato sódico 0,1 M, pH 9,0) y 2 mg de anti-His₆NirA. La mezcla se agitó 1 h a temperatura ambiente mediante un Intelli-Mixer-RM-2L (Elmi, Riga, Letonia). Posteriormente, la resina se sedimentó, se decantó el sobrenadante, y la resina se lavó con 20 ml de tampón borato sódico 0,1 M, pH 9,0, por centrifugación a 500 ×g, empleándose una centrífuga Allegra™ X-22R (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU). Tras decantar nuevamente el sobrenadante se añadió el agente entrecruzante dimetilpimelimidato (DMP) a una concentración final de 20 mM en tampón borato sódico 0,1 M, pH 9,0. La mezcla se incubó durante 45 min empleándose el sistema de agitación anterior. Transcurridos 45 min, se dejó sedimentar la resina y se añadieron 5 ml de tampón etanolamina 0,1 M, pH 8,2, para bloquear el exceso de grupos reactivos y detener así la reacción de entrecruzamiento. La resina se incubó con este tampón durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se dejó sedimentar la resina, se decantó el tampón de bloqueo y se lavó 3 veces la resina con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, mediante sedimentación-decantación.

3.2.12.2.a. **Cromatografía de inmunoafinidad**

Las fracciones seleccionadas de la cromatografía de intercambio iónico se dializaron durante 16 h frente a 1 l de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, y se concentraron empleando unidades de filtración de 50000 MWCO centrifugando a 2000 $\times g$ en una centrífuga Allegra™ X-22R (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU). Finalmente, la preparación se cromatografió en la columna de inmunoafinidad empleándose un equipo ÄKTA UPC Basic controlado mediante el software UNICORN 5.1. (GE-Healthcare Bio-sciences AB, Uppsala, Suecia). Se empleó un flujo de 0,2 ml/min para la carga de la muestra, y tras ésta, la columna se lavó con Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Posteriormente, se realizó una elución ácida con glicina 100 mM, pH 2,5 seguida de otra básica con trietilamina 100 mM, pH 11,5. Las fracciones de 1 ml recogidas se neutralizaron con 1 ml de tampón Tris-HCl, 1 M, pH 8,0 (Harlow y Lane, 1998).

Precipitación de proteína con ácido tricloroacético (TCA) y acetona

Para analizar las muestras obtenidas en la cromatografía de inmunoafinidad se precipitó la proteína de las mismas. Para ello, se tomó 1 ml de cada fracción eludida en la cromatografía de inmunoafinidad, y se añadió TCA al 20% (v/v). Las muestras se agitaron y posteriormente se incubaron durante 1 h en baño de hielo. El sobrenadante se retiró tras centrifugar la muestra a 15000 $\times g$ durante 15 min (Microfuge® 18; Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU).

Se añadieron 50 μl de una mezcla acetona en HCl al 0,2% (v/v) mantenida a -20°C y las muestras se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones que anteriormente. Se repitió un segundo lavado con otros 50 μl de acetona en HCl al 0,2% (v/v), y finalmente se retiró la acetona dejando las muestras en reposo durante 30 min para que el disolvente se evaporase completamente.

3.2.13. Seguimiento de la expresión *in vivo* de la proteína NirA

Se realizaron 3 cultivos de 100 ml de volumen de células de *T. elongatus* BP-1 en medios con diferentes fuente nitrogenada. Uno de ellos con amonio (BG11sinSA), otro con nitrito (BG11sinSNI), y el tercero con nitrato (BG11). En todos los casos, la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo era de 4 mM. Las células así cultivadas, se cosecharon en fase de crecimiento exponencial por centrifugación (durante 5 min a temperatura ambiente, a 1500 $\times g$) empleándose una centrífuga Allegra™ X-22R (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU). Las células se lavaron 3 veces por centrifugación con medio carente de fuente nitrogenada (BG11sin) en las mismas condiciones que las anteriormente descritas. Las células provenientes de cada uno de los tres tipos de cultivos se emplearon para inocular cultivos de 100 ml de medios BG11sinSA, BG11sinSNI, BG11 y BG11sin (**Fig. 3.5**). De nuevo, la concentración de la fuente de nitrógeno era 4 mM, salvo en los cultivos carentes de fuente nitrogenada. Los cultivos se incubaron a 48°C bajo una intensidad luminosa de 30 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Al cabo de 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h y 96 h se tomaron muestras de 2 ml de cada cultivo. Uno de ellos se empleó para determinar el valor de turbidez de los cultivos (registrando la absorbancia a 730 nm). Las células del ml restante se cosecharon por centrifugación (a 2000 $\times g$ durante 5 min a temperatura ambiente) empleando una centrífuga Microfuge® 18 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, EEUU) y se almacenaron a -80°C.

Finalizado el experimento, las muestras, estas se descongelaron y se les añadió tampón de carga para SDS-PAGE para solubilizarlas. El tampón de carga se añadió en proporción a la densidad celular registrada. Las muestras se calentaron durante 5 min a 95°C y después se centrifugaron durante 10 min a 12000 $\times g$. Se recogieron los sobrenadantes, y se cargaron (10 μ l) en los geles de poliacrilamida. Tras la separación electroforética la detección de las bandas se llevó a cabo por *Western blot* empleando como anticuerpo primario una dilución de anti-His₆NirA 1/1000 (v/v) en TBS.

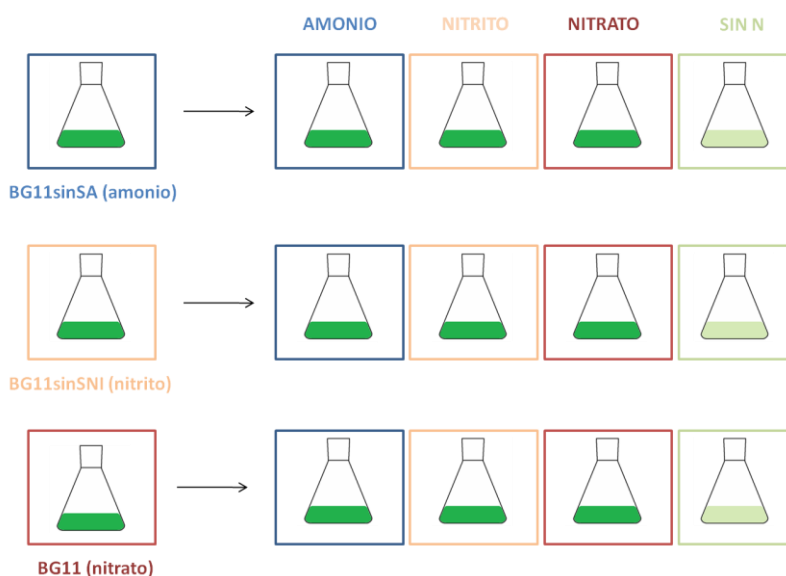


Figura 3.5. Cultivos empleados para el estudio de la expresión de NirA *in vivo*.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Operón *nirA-nrtABCD-narB* de *T. elongatus* BP-1

El operón *nirA-nrtABCD-narB* de *T. elongatus* BP-1 presenta una secuencia de la zona promotora típica de las cianobacterias en las que la transcripción de dicho promotor está regulada por NtcA (**Fig. 3.6**).

```
GGGCGTGCAATCACCGCATTCCTCCCAACGCGCTTTGGGCCACATGACCCCC
ATCGAGAGACTCCGAACGTGGCAAATGGAGGGACCAGAGTTGTTTCAGTTC
ACAGGTAGATAATGTCGCGGGTCTTGATAGTTAGCAATAAATACAGTTTC
AGAATATCTGTAATACAAAACTGTATCGAGACAAGAAAAAAGTAGCAA
ATTTACAAATGTTTCATGATTCATCTGGCTAAATTGGATGTTCAACTGACC
CATTGAAGACAAGGGCAACAACCGTGAGCA
```

Figura 3.6. Secuencia de la zona promotora del operón *nirA-nrtABCD-narB* en *T. elongatus* BP-1. En verde se señala la secuencia palindrómica consenso (GTAN₈TAC) para la unión de NtcA, en azul la caja -10 (TAN₃T) y en rojo el codón correspondiente al inicio de NirA.

Una de las mayores ventajas de conocer el genoma de *T. elongatus* BP-1 supone disponer de la secuencia de los genes de interés, sin necesidad de recurrir a la comparación de secuencias con los correspondientes a otros organismos. En este caso, a diferencia de lo que sucede habitualmente, el conocimiento del gen precede a la proteína. Es decir, el flujo de información sigue una dirección contraria a la habitual permitiendo clonar la proteína directamente sin tener que realizar estudios de homología con otras NirA de cianobacterias. En este caso, se ha utilizado esta información para clonar en *E. coli* la proteína NirA de *T. elongatus* BP-1.

3.3.2. Clonación, expresión y purificación de NirA de *T. elongatus* BP-1

La elección de los oligonucleótidos y de la polimerasa a emplear fueron los pertinentes para que el producto amplificado pudiese ser clonado en el vector pQE-30UA, y el resultado de dicha amplificación se correspondiese con *nirA*. Para dicha amplificación, se llevó a cabo un gradiente de temperaturas para el paso de hibridación (**Fig. 3.7**). En todos los casos, se obtuvieron 2 productos de amplificación, aunque la cantidad del producto de menor número de bases disminuía a medida que aumentaba la temperatura de hibridación.

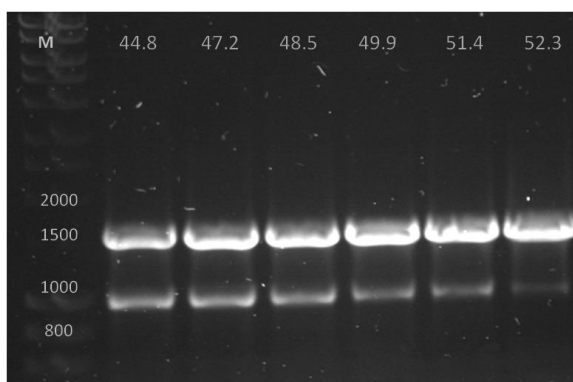


Figura 3.7. Amplificación de *nirA* de *T. elongatus* BP-1 con los oligonucleótidos *FnirA* y *RnirA*. Se detalla la temperatura de hibridación utilizada en cada caso. M: marcadores HyperLadder I.

Tras purificar del gel de agarosa la banda de 1536 pb, correspondiente al fragmento *nirA* de *T. elongatus* BP-1, y cuantificar la concentración de DNA de la misma, esta se clonó en el vector pQE-30UA.

Se seleccionaron las colonias de células transformadas de *E. coli* como se detalla en el apartado **2.2.10.3**. El extracto obtenido a partir de 1 l de células de *E. coli* se cromatografió en una columna de Sepharose™ Fast Flow quelante, previamente equilibrada con Ni²⁺. La proteína recombinante se eluyó con un gradiente lineal de imidazol (**Fig. 3.8**). Las fracciones recogidas en el gradiente, así como las correspondientes al lavado con Tris-HCl 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, al extracto cargado en la columna y a la proteína no retenida, se analizaron por SDS-PAGE (**Fig. 3.9**).

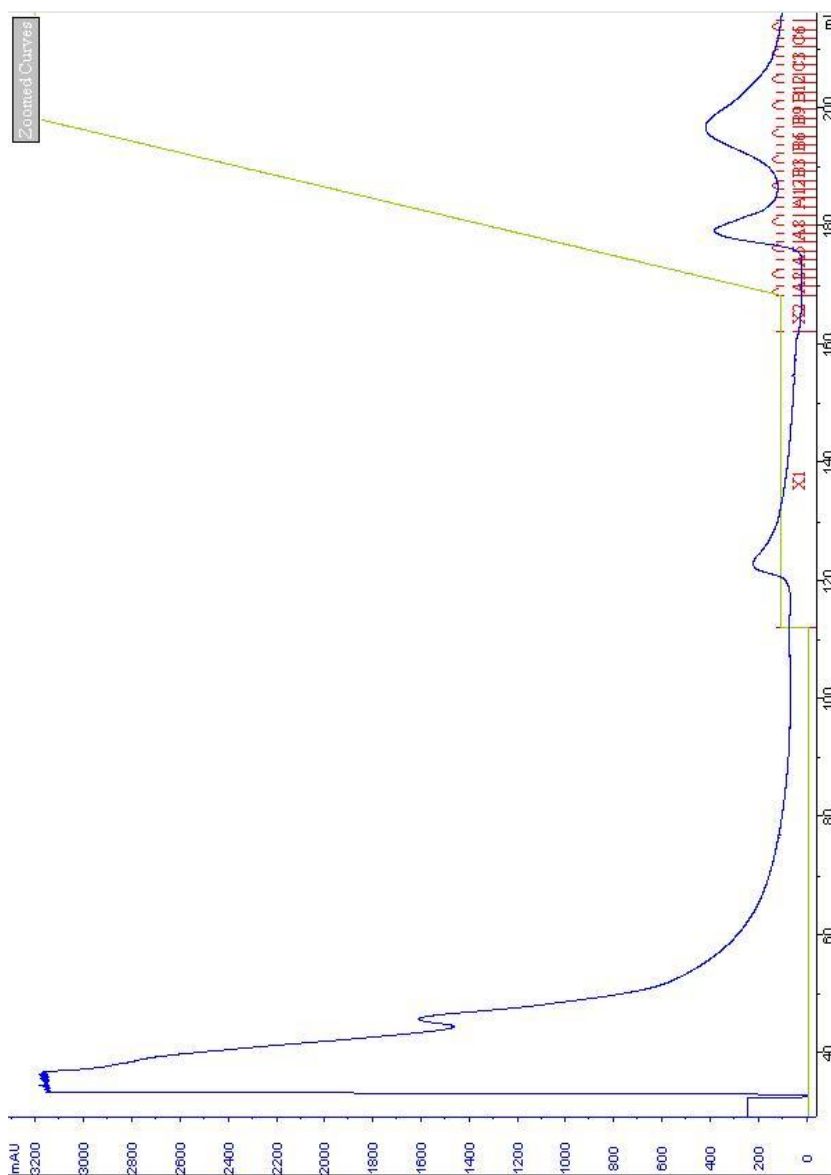


Figura 3.8. Cromatograma obtenido en la purificación por IMAC del extracto proveniente de 1 l de células de *E. coli* transformadas con el vector pQE-30 UA NirA.
(-) Registro de la absorbancia a 280 nm. (-) Gradiente de imidazol.

Al cromatografiar la preparación en la columna de IMAC, la mayoría de las proteínas no se retenían y aparecían en el eluato (**Fig. 3.9**). Con el lavado eluyeron proteínas que habían quedado débilmente retenidas en la resina. En la elución con el gradiente lineal de imidazol, His₆NirA eluyó a 250 mM de imidazol (**Fig. 3.8**). Las fracciones que eluyeron a las concentraciones más elevadas de imidazol, es decir las que contenían las proteínas que habían quedado fuertemente retenidas en la resina activada con Ni²⁺, presentaban dos proteínas. Una proteína mayoritaria de aproximadamente 58 kDa, y otra en menor concentración de aproximadamente 44 kDa. El rendimiento de la purificación era de 6 mg de proteína pura por cada litro de cultivo de *E. coli*.

Las nitrito reductasas de la mayoría de los organismos fotosintéticos consisten en una única cadena polipeptídica de masa molecular que oscila entre 52 y 75 kDa (Vega y Kamin, 1977; Guerrero y Lara, 1987; Merchán *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 2005). En este caso, la masa molecular teórica de 58.487 kDa calculada para His₆NirA de *T. elongatus* BP-1 se corresponde con la banda superior.

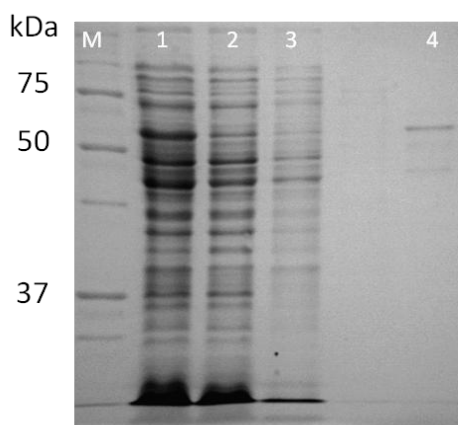


Figura 3.9. Expresión y purificación de His₆NirA. Se muestra el análisis por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12% (p/v) teñido con azul de Coomassie. **(M)** Marcadores de masa molecular (SDS-PAGE Precision Plus Protein Standards) **(1)** Fracción de proteína soluble total tras la ruptura por ultrasonación. **(2)** Fracción de proteína no retenida en la columna equilibrada con Ni²⁺. **(3)** Elución con imidazol 20 mM. **(4)** Fracción de proteína pura.

Se comprobó, como se detalla en el apartado **3.2.9**, que las fracciones presentaban actividad nitrito reductasa. El hecho de que la proteína His₆NirA expresada en *E. coli* presente actividad nitrito reductasa implica que el sirohemo está unido correctamente a la proteína, y que los niveles del mismo son adecuados para que se manifieste la actividad. Sin embargo, es probable, que como ocurre en la sobreexpresión en *E. coli* de otras nitrito y sulfito reductasas, no toda la proteína recombinante sea activa, bien porque algunas moléculas hayan perdido el sirohemo durante la purificación (Vega y Kamin, 1977), o porque los niveles de sirohemo y/o del *cluster* [Fe₄-S₄] sintetizados por *E. coli* no sean suficientes para dotar de grupos prostéticos a la apoproteína recombinante. Para facilitar la síntesis de sirohemo en células de *E. coli* se han hecho algunas variantes en la sobreexpresión y purificación de este tipo de proteínas. Así, en la NirA de espinaca (Bellissimo y Privalle, 1995) se ha analizado el efecto sobre la actividad de la adición al medio de cultivo de precursores del grupo hemo, como el ácido δ-aminolevulínico (Warren *et al.*, 1994). Para la sobreexpresión de la SirA de *E. coli* (Wu *et al.*, 1991) o de la NirA de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Curdt *et al.*, 2000), se ha coexpresado CysG, una proteína necesaria para catalizar la síntesis del sirohemo en *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Woodcock *et al.*, 1998).

En el caso de la expresión y purificación de NirA de *T. elongatus* BP-1, la detección de actividad nitrito reductasa empleando metil viológeno reducido con ditionito como donador artificial de electrones, confirma que se ha purificado la proteína deseada. Sin embargo, la banda de menor masa molecular (44 kDa) que coeluye en la IMAC con la proteína NirA no parece ser una impureza de *E. coli*, porque queda fuertemente retenida en la resina cargada de Ni²⁺. Para averiguar si la proteína de 44 kDa era una forma degradada de la de 58 kDa, se analizó una de las fracciones que contenía ambas proteínas por SDS-PAGE seguida de *Western blot* empleando anticuerpos antiHis₆ (**Figura 3.10**).

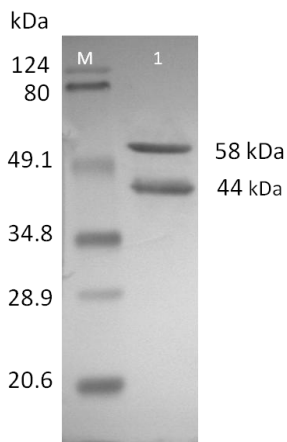


Figura 3.10. Purificación de His₆NirA.

(1) *Western blot* de la proteína purificada utilizando anticuerpos monoclonales anti-cola de histidinas.

(M) Marcadores preteñidos de masa molecular (SDS-PAGE Standards broad range)

Se comprobó que la banda de aproximadamente 44 kDa también posee la etiqueta de hexahistidinas, ya que es detectada por los anticuerpos antiHis₆ (**Fig. 3.10**). Este resultado indica que la proteína de 44 kDa puede ser un producto de degradación de NirA a lo largo del proceso de la purificación. Para inhibir la posible proteólisis de NirA, se repitió la misma cromatografía empleándose inhibidores de proteasas. Sin embargo, el resultado de la purificación era parecido, y la inhibición de las proteasas no suponía un descenso en la cantidad detectada de proteína de 44 kDa. Este resultado sugiere que la presencia de esta proteína no es consecuencia de la degradación de His₆NirA durante el proceso de purificación.

Para conocer el punto de corte en que se hidrolizó His₆NirA, se digirieron con tripsina ambas proteínas, extraídas de un gel de poliacrilamida, y se analizaron por espectrometría de masas (**Figs 3.11 y 3.12**), como se detalla en los apartados **3.2.7 y 3.2.8**.

1	MSNKIEAIKK	EKDGLAVKQE	LEKFAAMGWE	NIPEADRDVR	LKWLGIFFRP
51	VTPGRFMMRL	RVPNGILTSQ	QLRTLGAIVD	RYGENGNGDI	TTRQNIQIRG
101	LPIEDIPEII	EQLQACGITS	VQSGMDNVRN	LTGSPVAGID	AAELIDTRPL
151	IMKLQAMITN	NGQGNPEFSN	LPRKFNIAIE	GGRDNSVHAE	INDVAFVPAY
201	RQGRLGFNVL	VGGFFSARRC	AAAIPLDAWV	PPDDAVVQLS	RAILEIFRDH
251	GPRGNRQKAR	LRWLIDEWGI	EKFRAAVVAK	LPFELLSAAA	KDEIDWDKRD
301	HLGVHRQKQR	RLNYVGLHVP	VGRLYATDFY	ELARLAQVYG	QSEVRLTVEQ
351	NVIIPHVPDA	VLPSLLREPL	LSKFRPEPPP	LERALVSC TG	AEFCNFALIE
401	TKNRALALAR	WLDQQLVLPQ	PVRIHWTGCP	NSCGQPQVAD	IGLMGTKTRR
451	NGETVDAVDL	YMGKVGKDA	KLGT CVK KAI	PCDELPEVLR	QVLIEQFGAQ
501	PRGSERPPVA	TPAVAMMVS			

Figura 3.11. Secuencia de NirA. En rojo los péptidos de NirA identificados en la banda de aproximadamente 58 kDa. En azul se señalan los residuos de cisteína.

1	MSNKIEAIKK	EKDGLAVKQE	LEKFAAMGWE	NIPEADR	DVR	LKWLGIFFRP
51	VTPGRFMMRL	RVPNGILTSQ	QLRTLGAIVD	RYGENGNGDI	TTRQNIQIRG	
101	LPIEDIPEII	EQLQACGITS	VQSGMDNVRN	LTGSPVAGID	AAELIDTRPL	
151	IMKLQAMITN	NGQGNPEFSN	LPRKFNIAIE	GGRDNSVHAE	INDVAFVPAY	
201	RQGRLGFNVL	VGGFFSARRC	AAAIPLDAWV	PPDDAVVQLS	RAILEIFRDH	
251	GPRGNRQKAR	LRWLIDEWGI	EKFRAAVVAK	LPFELLSAAA	KDEIDWDKRD	
301	HGVHRQKQR	RLNYVGLHVP	VGRLYATDFY	ELARLAQVYG	QSEVRLTVEQ	
351	NVIIPHVPDA	VLPSLLREPL	LSKFRPEPPP	LERALVSCTG	AEFCNFALIE	
401	TKNRALALAR	WLDQQLVLPQ	PVRIHWTGCP	NSCGQPQVAD	IGLMGTKTRR	
451	NGETVDAVDL	YMGKVGKDA	KLGTVCVKAI	PCDELPEVLR	QVLIEQFGAQ	
501	PRGSERPPVA	TPAVAMMVS				

Figura 3.12. Secuencia de NirA. En rojo los péptidos de NirA identificados en la banda de aproximadamente 44 kDa.

El análisis de péptidos de ambas bandas (**Figs 3.11 y 3.12**) confirma que la proteína de menor masa molecular es una forma truncada de His₆NirA. En concreto, de una proteína carente de los últimos 135 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal (estimación aproximada). El hecho de que exista un patrón tan claro de proteólisis, que origina una proteína de 44 kDa como el producto mayoritario de degradación, sugiere que en la secuencia de NirA existe una zona particularmente expuesta o especialmente sensible a la acción de proteasas. La presencia de una proteína similar de 40 kDa se ha descrito en la purificación de NirA de células silvestres de *P. laminosum*. En este caso, la presencia de la proteína truncada se ha asociado a la degradación de NirA durante el proceso de purificación (Arizmendi, 1989)

Para comprobar si este supuesto producto de degradación de la proteína recombinante existe antes o después de la ruptura celular de *E. coli*, se han analizado por SDS-PAGE seguida de *Western blot* células de *E. coli* solubilizadas con detergente y cosechadas a distintos tiempos de inducción con IPTG (**Fig. 3.13**). El *Western blot* con anticuerpos anti-His₆NirA (apartado 3.2.5.2) proporciona una señal especialmente intensa para ambas proteínas desde los instantes iniciales tras la adición de IPTG. También se comprueba que existen otros productos de degradación de menor masa molecular, pero es especialmente intensa la señal de His₆NirA y de la forma truncada de 44 kDa.

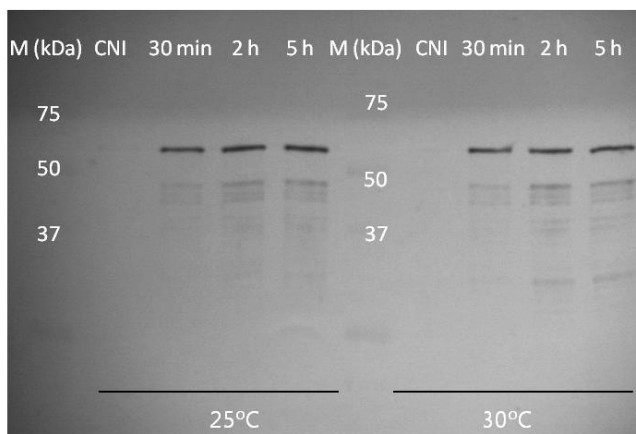


Figura 3.13. Inducción con IPTG de la expresión de NirA en células de *E. coli* transformadas con pQE-30UA-nirA. *Western blot* de células de *E. coli* transformadas con pQE-30UA-nirA cosechadas antes de la inducción con IPTG (CNI) y a distintos tiempos de la misma (30 min, 2 h y 5 h). La inducción se llevo a cabo a 25°C y 30°C. Las células se solubilizaron con tampón de carga y como anticuerpos primarios se emplearon anti-His₆NirA (1/10000 (v/v) en TBS).

Resultados similares se obtuvieron en la expresión de la NirA de espinaca en *E. coli* (Bellissimo y Privalle, 1995). En este caso, también se detectó por *Western blot* que NirA era degradada durante la inducción con IPTG, y que también existía una banda proteica de degradación predominante.

Los primeros estudios detallados de la estructura de las nitrito y sulfito reductasas asimilatorias de plantas, bacterias y cianobacterias, se llevaron a cabo con sulfito reductasas asimilatorias. Los estudios se centraron en la subunidad hemoproteica de la sulfito reductasa de *E. coli* y de *Salmonella typhimurium* (Ostrowski *et al.*, 1989) así como la de *Mycobacterium tuberculosis* (Schnell *et al.*, 2005)

En muchos casos, existe una alta homología entre las sulfito reductasas y nitrito reductasas, pudiendo en algunos casos catalizar la reducción de ambos sustratos, si bien cada una de ellas muestra una mayor afinidad por su respectivo sustrato (Crane y Getzoff, 1996). La sulfito reductasa asimilatoria, es un enzima complejo formado por 2 péptidos distintos que originan estructuras oligoméricas de tipo $\alpha_4\beta_4$, siendo la subunidad α una flavoproteína (que contiene FMN y FAD) y la β una hemoproteína (HP) que porta el *cluster* $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ y el grupo sirohemo. En la hemoproteína se han detectado 4 residuos de cisteína clave para el anclaje de los grupos prostéticos (Ostrowski *et al.*, 1989). Estas mismas cisteínas se encuentran conservadas en varias sulfito y nitrito reductasas de plantas, bacterias y cianobacterias (señaladas en rosa sobre fondo gris en la **Figura 3.14**). En particular, en la NirA de espinaca se ha comprobado que estas 4 cisteínas forman parte de uno de los 3 dominios de la misma (Swamy *et al.*, 2005).

Resultados y discusión

Nir Mycobacterium	(1)	-----MSA
Nir Anabaena sp	(1)	-----
Nir Espi	(1)	-MASLFPVNKIIPSSSTLLSSNNRRRRNNSIRCQKAVSPAETAAVSPS
Nir maize	(1)	MASSASLQRFLLPSPHAAATAASPSRLRRTGRARAAVS-VPPPAAGEQ
Nir P. lamin	(1)	-----
Nir Synec	(1)	-----
Sir HP E. coli	(1)	-----
Nir T. elong	(1)	-----
Nir T. elong trunc	(1)	-----
Consenso	(1)	-----
Nir Mycobacterium	(4)	KENPQMTTARPAKARNEGQWALGHLEP LNANEEKKKAG--NPLDVERIE
Nir Anabaena sp	(1)	-----MTDVTTPKASLNKFEKFAEK--DGLAIKSEIE
Nir Espi	(50)	VDAARLEPRVEERDG-FWVLKEEFSGLNPAEKVKLEKDPMKLFTLEGLS
Nir maize	(50)	VPTERLEPRVEERAGGYWVLKEKYFAGLNPEKVKLEKPEPMALFMEGGTQ
Nir P. lamin	(1)	-----MTSTVPAETS LNKFEKLEKSEK--DGLAVSELE
Nir Synec	(1)	-----MAQATATTEKLNKFEKLEKLEK--DGLAVRDQIQ
Sir HP E. coli	(1)	-----MSEKHPGPLVVEGKLTDAERMKLESNYLRTLAEDIN
Nir T. elong	(1)	-----MSNIEALKKEK--DGLAVKQELE
Nir T. elong trunc	(1)	-----MSNIEALKKEK--DGLAVKQELE
Consenso	(51)	R LNK EKLKLEK DGLAVKDEIE
Nir Mycobacterium	(52)	N-----IYAKQCFDSIKKIDLR--G--RFRWVGLYTQREQGYDGT
Nir Anabaena sp	(33)	-----KIASLGWEAMDATDR-----DHLKRWGVFFRPVTP----
Nir Espi	(99)	-----DLATLSMTEVVKSKHKNKDDIDVRLKWLGLFHFRRKHHY
Nir maize	(100)	-----DLARVPMQIDAAKLTKDDVDVRLKWLGLFHFRRKHQY----
Nir P. lamin	(32)	-----DFARLGWEAMDEIDR-----DHLRRLWVGVFFRPVTSQ----
Nir Synec	(32)	-----HFASTLGWEAMDPGDR-----DHLRKLWGLGIFFRPVTP----
Sir HP E. coli	(38)	DGLTGGFKGDNFLLIRHGMVQDDR-----DIAERAEQKLEFRHA-
Nir T. elong	(23)	-----KFAAMGWENIPEADR-----DVRKLWGLGIFFRPVTP----
Nir T. elong trunc	(23)	-----KFAAMGWENIPEADR-----DVRKLWGLGIFFRPVTP----
Consenso	(101)	FA LGWEAMD TDR DVRLKWLGLFFRPVTP
Nir Mycobacterium	(88)	WTGDDNIDKLEAKYFMRRVRCDCGALSAAALRTLGQSTEFARD-TADIS
Nir Anabaena sp	(64)	-----GKFMRRMRPNGLILTSQMRVLAEVVQRVYGDGNADIT
Nir Espi	(136)	-----GRFMMRLKLPNGVTTSEQTRYLASVVKKYKDGCAVIT
Nir maize	(137)	-----GRFMMRLKLPNGVTTSEQTRYLASVVEAYGADGCAVIT
Nir P. lamin	(63)	-----GKFMRRMRPNGLILTSQMRVLAEVVQRVYGDGNADIT
Nir Synec	(63)	-----GRFMARLRIPSGILIQSQQLNALNFQRVYGDQASIDIT
Sir HP E. coli	(80)	-----MLLRCRLEPGVITTKWQALDKFAGENTIYSESIRLIT
Nir T. elong	(23)	-----KFAAMGWENIPEADR-----DVRKLWGLGIFFRPVTP----
Nir T. elong trunc	(23)	-----KFAAMGWENIPEADR-----DVRKLWGLGIFFRPVTP----
Consenso	(151)	GRFMMRLRLPENGILTS QLR LA VV RYGDG ADIT
Nir Mycobacterium	(137)	DRQNVQYHWIIEVENVPEIWRRLDDVGLQTEACGDCPRVVLGSP-----
Nir Anabaena sp	(102)	TRQNIQIRGIRIEDLPHIFNFHAVGLTSVQSGMDNVRNITGSP-----
Nir Espi	(174)	TRQNIQIRGIRVLPDVPEIILKGLSVGLTSVQSGMDNVRNITGSP-----
Nir maize	(175)	TRQNIQIRGIRVLPDVPEIILDGLRAYGLTSVQSGMDNVRNITGSP-----
Nir P. lamin	(101)	TRPNLIQIRGIRLEDIPDLFRFEQAGLTSVQSGMDNVRNITGSP-----
Nir Synec	(101)	TRQNIQIRGIRLEDIPDLFRHAYGLTSVQSGMDNVRNITGSP-----
Sir HP E. coli	(116)	NRQTFQFHGILKKNVKNHQMHSVGLDIALATANDMNRNVLCTSNPYESQ
Nir T. elong	(92)	TRQNIQIRGIRLEDIPETIEQLQACGITSVQSGMDNVRNITGSP-----
Nir T. elong trunc	(92)	TRQNIQIRGIRLEDIPETIEQLQACGITSVQSGMDNVRNITGSP-----
Consenso	(201)	TRQNIQIRGI LEDVPEIIL AVGLTSVQSGMDNVRNITGSP
Nir Mycobacterium	(181)	-----LAGESLDEVLPPTWALTEEVRRYIG---KFDLADLPRK
Nir Anabaena sp	(146)	-----LAGLDADELYDTRLELVCQIQDMITNKGEGNRFNSLPRK
Nir Espi	(218)	-----LAGIDPHEIVDTRPFTNLSSQFVANSRGNLSITNLPRK
Nir maize	(219)	-----LAGVDPHEIVDTRPYTNLSSYVNNQGNFTITNLPRK
Nir P. lamin	(145)	-----VAGIDADELIDTRGLVRKIQDMITNNGEGNRFNSLPRK
Nir Synec	(145)	-----VAGLDAELFDTRSLICALQDDLTAAQCGNSEFTNLPRK
Sir HP E. coli	(166)	LHAEAYEWAKKISEHLLPRTRAYAEVLDQEKVATDDEEPILGQVYLPK
Nir T. elong	(92)	TRQNIQIRGIRLEDIPETIEQLQACGITSVQSGMDNVRNITGSP-----
Nir T. elong trunc	(92)	TRQNIQIRGIRLEDIPETIEQLQACGITSVQSGMDNVRNITGSP-----
Consenso	(251)	LAGIDA ELIDTR LIN IQ MITNNG GNPEFTNLPRK

Nir Mycobacterium	(428)	IEFCKLSFAETVRAQHLPPELERRLEDINSQLDVPFTVNINGCPNSCAR
Nir Anabaena sp	(417)	AQFCNFALIETKNRALEMKGLEAETFTFT-----PVRIHWTGCPNSCGQ
Nir Espi	(476)	SQFCGQALIETKARALKVTEVQRLVSVTR-----PVRMHWTGCPNSCGQ
Nir maize	(478)	NOFCGQALIETKARALQVAEVEKRWAVPR-----PVRMHWTGCPNSCGQ
Nir P. lamin	(399)	AQFCNFALIETKNRAMALIRELESELELAR-----PVRIHWTGCPNSCGQ
Nir Synec	(399)	SYCFNFALIETKQRALAAQSLEAELDIP-----PVRIHWTGCPNSCGQ
Sir HP E. coli	(437)	FPTCPAMAAERFLPFDNLDNLMAKHG-VSDEHVMRVVCGPNCGR
Nir T. elong	(391)	AFCNFALIETKNRALALARWLDQQILVLPQ-----PVRIHWTGCPNSCGQ
Nir T. elong trunc	(391)	
Consenso	(551)	AQFCNFALIETKNRALALIRELE L L R PVRIHWTGCPNSCGQ
Nir Mycobacterium	(478)	IQLADIQFKCQMIDDGHCQSVVEGFQVHLGGHLGLDAGFCRKLROHKVTSI
Nir Anabaena sp	(462)	PQVADIGLMGTAKRK-NGKAVEGVDIYMGKVGKDAHLGSCVQKGI PCDD
Nir Espi	(521)	VQVADIGFMGCMTFDENCKPCPEGADVFVGGRIQSDSHLGDIIYKKAIPCKD
Nir maize	(523)	VQVADIGFMGCLTFDSDGKIVFAADIFVGGRVGSDSHLADVYKSNVPCDD
Nir P. lamin	(444)	PQVADIGLMGTKVRK-DGKATBQVDLYMGKVGKHAELGTCVQKGI PCDD
Nir Synec	(444)	PQVADIGLMGAKVRK-DCQMVEGVDFLGGKVGYDAHLGKAMTGMACEP
Sir HP E. coli	(486)	AMLAEVCLVCKAPGR-----YNHLGGNR-IGTRIPRMYKENTTEPE
Nir T. elong	(436)	PQVADIGLMGTKTRK-NQETVDAVDLYMGKVGKDAKLGTCVKAIP CDE
Nir T. elong trunc	(436)	
Consenso	(601)	PQVADIGLMG K RK GK VEGVDIFLGGKVG DAHLG VKKGI PCDD
Nir Mycobacterium	(528)	ELGDYIDRVVNRNVKHRSEGFRFAQWVIRAEEDDLR-----
Nir Anabaena sp	(511)	LHLVLRDLLITNFGAKPQAEALVTSQ-----
Nir Espi	(571)	LVPVVAEILINQFGAVPFREREAE-----
Nir maize	(573)	LVPIVADLLVEREGAVPFREREDEE-----
Nir P. lamin	(493)	LKPLLRNLLIEHFGARPK-----
Nir Synec	(493)	LPDVLQQLLIERFGAQAASH-----
Sir HP E. coli	(527)	LIASIDELLGRWAKEREAGEGFGDFTVRAGIIRPVLDPARDLWD
Nir T. elong	(485)	LPEVLRQVLLIEQFGAQPFGSRRPPVATPAVAMMVS-----
Nir T. elong trunc	(485)	
Consenso	(651)	LL VLRDLLIENFGA PR E

Figura 3.14. Comparación de secuencias de la NirA y SirHP de algunas bacterias, cianobacterias y plantas superiores. Nitrito reductasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Nir Mycobacterium). Nitrito reductasa de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Nir Anabaena sp). Nitrito reductasa de espinaca (Nir Espi). Nitrito reductasa de maíz (Nir maize). Nitrito reductasa de *P. laminosum* (Nir P. lamin). Nitrito reductasa de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Nir. Synec). Subunidad hemoproteica de la sulfito reductasa de *E. coli* (Sir HP E. coli). Nitrito reductasa de *T. elongatus* BP-1 (NirA T. elong). Nitrito reductasa de *T. elongatus* BP-1 truncada obtenida tras la purificación por IMAC (NirA T. elong trunc). Las secuencias se tomaron de la base de datos NCBI y se alinearon utilizando el programa Vector NTI™. Los aminoácidos idénticos en todas aparecen en rojo sobre fondo amarillo. Los aminoácidos conservados aparecen en azul sobre fondo turquesa. Los aminoácidos poco similares aparecen en verde, los similares aparecen en negro sobre fondo verde, y los no similares aparecen en negro.

Estudios realizados con algunas de las proteínas alineadas en la **Figura 3.14** han mostrado, que los cuatro residuos de cisteína mencionados son responsables de unir tanto el *cluster* [Fe₄S₄] como el grupo sirohemo. En concreto, las cuatro cisteínas unen el *cluster*, y además, una de ellas une también el sirohemo (Luque *et al.*, 1993; Schnell *et al.*, 2005; Swamy *et al.*, 2005).

De este modo, se forma un puente entre ambos grupos prostéticos, lo que permite que los electrones cedidos por la ferredoxina reducida lleguen al nitrito.

La degradación, en el caso de la clonación, expresión y purificación de NirA de *T. elongatus* BP-1 podría estar basada en la propia estructura de las nitrito/sulfito reductasas, y por la conformación que estas presentan en función de si tienen unidos o no los grupos prostéticos. Los niveles de sirohemo sintetizados por *E. coli*, podrían no ser suficientes para que todas las moléculas de la apoproteína recombinante His₆NirA tuviesen sirohemo unido. De este modo, las moléculas que no poseen el sirohemo unido, pueden presentar la posible zona de unión más expuesta y accesible a las proteasas, siendo por tanto más susceptible de ser degradada por la acción de éstas.

Por este mismo motivo, la actividad nitrito reductasa estaría catalizada, exclusivamente, por la proteína de 58 kDa y no por la de 44 kDa, resultado de la degradación de la de mayor tamaño. La de 44 kDa no debería presentar actividad nitrito reductasa al carecer de los residuos de cisteína necesarios para el anclaje covalente de los grupos prostéticos. Considerando que la actividad nitrito reductasa depende exclusivamente de la proteína de 58 kDa, se cuantificó a partir de geles de poliacrilamida la proporción relativa entre las formas completa y truncada. Para este fin, se emplearon geles teñidos con azul de Coomassie, tinción cuya intensidad es proporcional a la proteína teñida. Mediante el análisis de varios geles (software de análisis GeneSoft, VWR Internacional, Darmstadt, Alemania) se tomó como valor promedio que la proteína de 58 kDa representaba el 76% de la proteína total frente al 24% de la proteína truncada de 44 kDa.

3.3.3. **Caracterización de His₆NirA**

3.3.3.1. **Características espectrales**

La proteína recombinante His₆NirA de *T. elongatus* BP-1 en estado oxidado muestra un espectro de absorción UV-Vis (**Fig. 3.15A**) similar a otras nitrito/sulfito reductasas que contienen sirohemo y [Fe₄-S₄] como grupos prostéticos (Murphy *et al.*, 1974; Vega y Garrett, 1975; Vega y Kamin, 1977; Arizmendi, 1989; Bellissimo y Privalle, 1995; Schnell *et al.*, 2005).

Así, se detectan la banda de Soret (a 390 nm) y la banda α (a 575 nm). En los registros realizados con otras sulfito/nitrito reductasas, se observa además, otro máximo característico a 690-710 nm, que en todos los casos presenta valores de absorbancia muy pequeños en comparación con los de las bandas Soret y α (Vega y Kamin, 1977; Arizmendi, 1989; Schnell *et al.*, 2005). En el registro realizado con His₆NirA de *T. elongatus* BP-1, prácticamente no se detecta el máximo a 690-710 nm que muestran otras sulfito/nitrito reductasas, probablemente debido a la baja concentración de proteína empleada. La relación entre los valores de absorbancia a 281 nm y 390 nm es 2,2, valor similar al calculado para la NirA purificada de células silvestres de *P. laminosum* (Arizmendi y Serra, 1990).

Se registraron espectrofotométricamente los efectos de la adición secuencial de nitrito y ditionito en el espectro de absorción UV-Vis de preparaciones puras de His₆NirA de *T. elongatus* BP-1 (**Fig. 3.15B** y **Fig. 3.16**).

La adición de ditionito para reducir químicamente al enzima provoca dos efectos claros: el desplazamiento de la banda de Soret (**Fig. 3.15B**) y la pérdida del máximo observado a 575 (banda α) (**Fig. 3.16B**). En otros casos descritos, la adición de ditionito también provoca la desaparición del máximo a 690-710 nm detectado con el enzima oxidado.

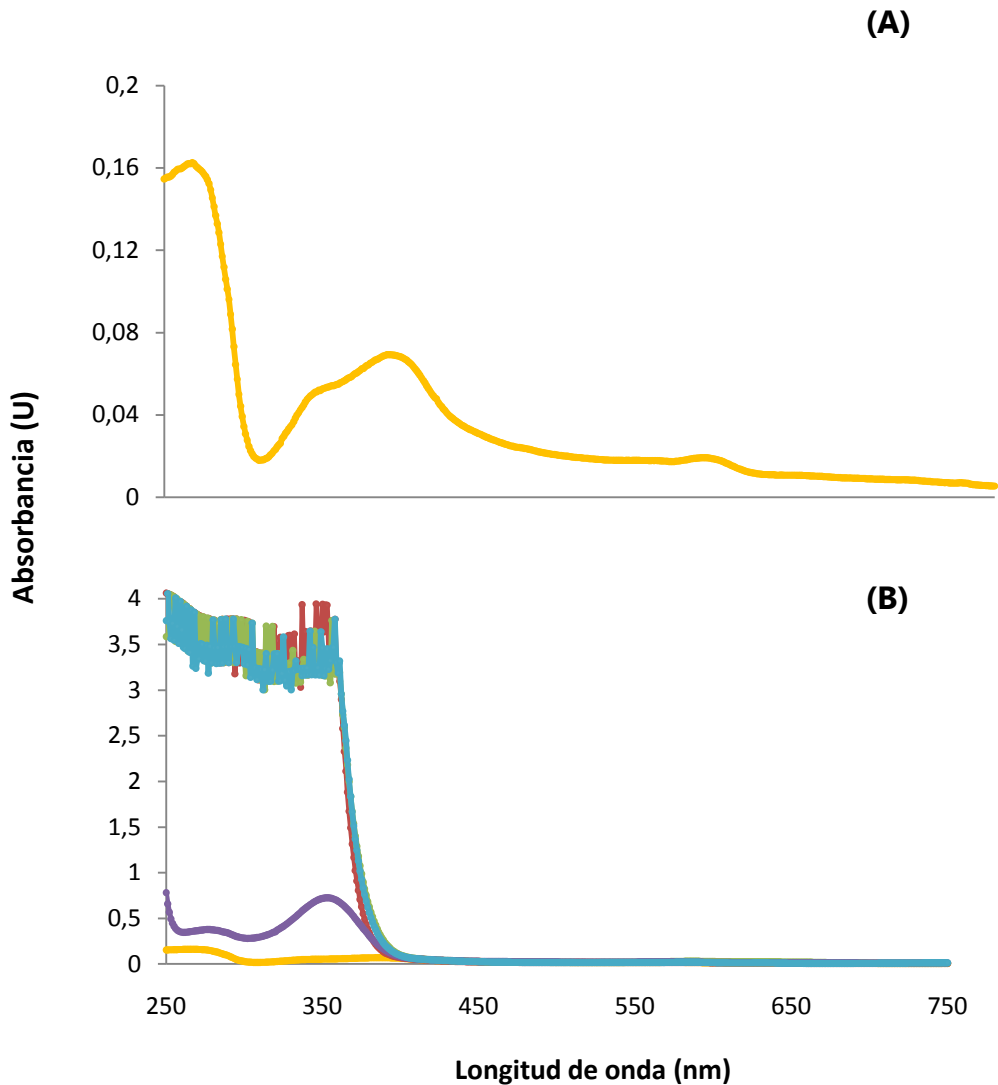


Figura 3.15. Espectro de absorción UV-Vis de la His₆NirA de *T. elongatus* BP-1. La preparación purificada del enzima tenía una concentración proteica de 0.15 mg/ml en Tris-HCl 50 mM, 300 mM de NaCl, 250 mM de imidazol. **(A)** Antes y **(B)** después de la adición de ditionito y/o nitrito a 1 mg/ml. Se señala en amarillo el enzima sin adiciones, en morado el enzima con nitrito, en rojo el enzima con ditionito, en verde el enzima con ditionito y posterior adición de nitrito, en azul el enzima con nitrito y posterior adición de ditionito.

En el caso de His₆NirA de *T. elongatus* BP-1, este efecto es muy tenue, porque como se ha señalado anteriormente, en el registro del enzima oxidado, no se detecta ningún máximo de absorbancia entre 690-710 nm.

La adición de nitrito al enzima previamente reducido con ditionito, restaura el pico de 575 nm, desplazándolo a 585 nm (**Fig. 3.16B**).

Los cambios espectrales producidos por la reducción del enzima, y la posterior adición de nitrito, son similares a los descritos en otras NirA (Vega y Kamin, 1977; Arizmendi *et al.*, 1990). El sirohemo puede ser reducido por ditionito y, posteriormente, oxidado por la adición de nitrito, lo cual indicaría la existencia de un flujo de electrones desde el sirohemo hasta el nitrito.

Cuando la adición se realiza en orden inverso, es decir, se adiciona primero el nitrito, se desplaza la banda de Soret a 360 nm, se desplaza a 565 nm la banda α (575 nm) y se anula la absorbancia a partir de 640 nm (**Fig. 3.16C**).

La posterior adición de ditionito a la mezcla de enzima y nitrito, desplaza la banda α de 565 nm a 585 nm (**Fig. 3.16C**).

Estos resultados indican que el grupo sirohemo del enzima está implicado en la unión del nitrito a His₆NirA, tanto en presencia como en ausencia de ditionito.

En la **Figura 3.16C** se observa un pico a 740 nm en todos los casos en los que la muestra se ha reducido con ditionito. La presencia de este pico no se ha descrito en otros casos. Es importante subrayar que His₆NirA ha sido expresada en un sistema heterólogo y porta una extensión de 6 residuos de histidina que podrían producir cambios en el comportamiento espectral con respecto a otras nitrito/sulfito reductasas silvestres de plantas o cianobacterias.

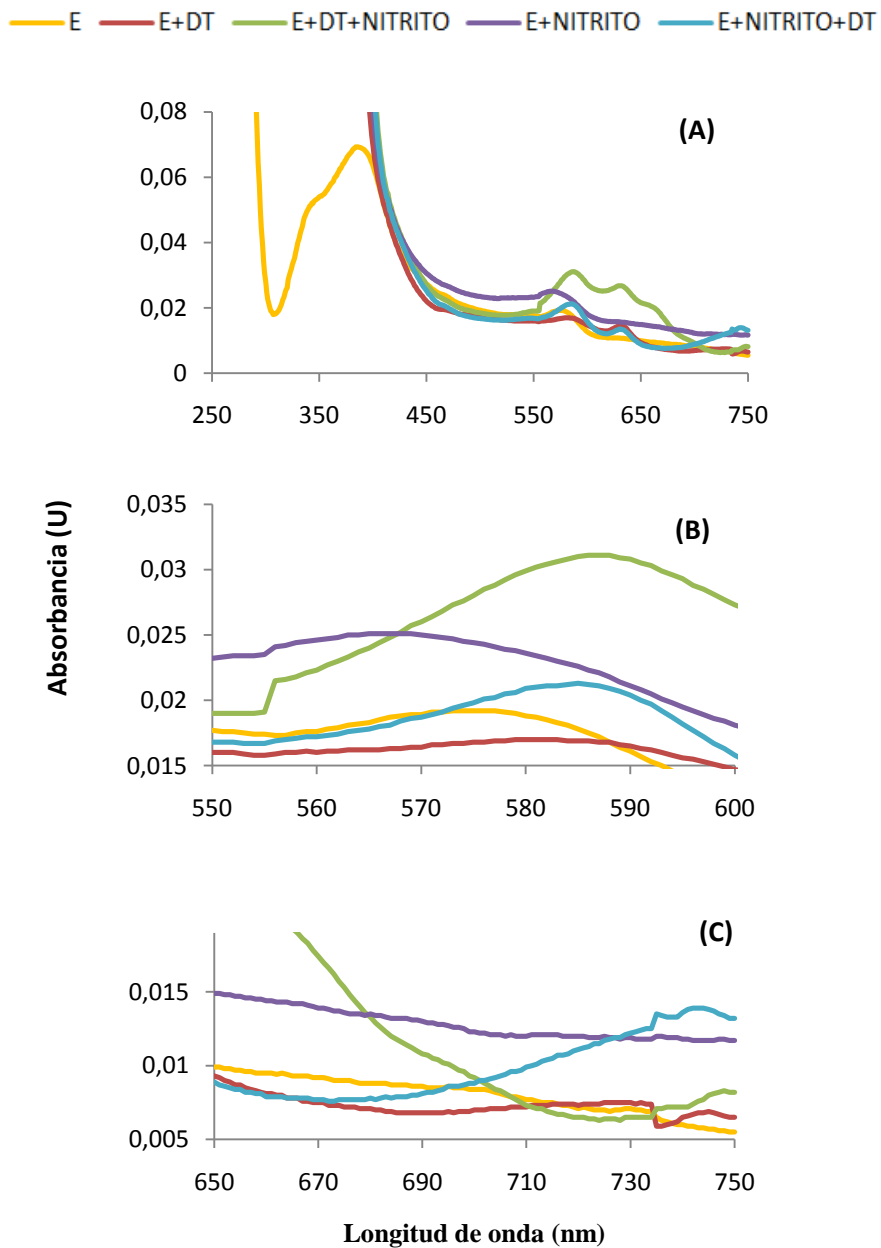


Figura 3.16. Espectro de absorción UV-Vis de la His₆NirA de *T. elongatus* BP-1 tras la adición de ditionito y/o nitrito a 1 mg/ml (Ampliación de Fig. 3.15B). Detalles en la región del espectro UV-Visible que comprende las longitudes de onda (A) 250-750 nm, (B) 550-600nm y (C) 650-750 nm.

3.3.3.2. Características de la actividad nitrito reductasa *in vitro*

Efecto de la temperatura en la actividad

Se determinó la temperatura óptima de actividad nitrito reductasa ensayando la actividad a temperaturas comprendidas entre 30 y 50°C.

Se comprobó que la actividad específica de la nitrito reductasa aumentaba proporcionalmente con la temperatura de incubación (**Figura 3.17**), alcanzándose su valor máximo a 50°C. Al tratarse de un enzima de una cianobacteria cuya temperatura óptima de crecimiento es 55°C, podría esperarse valores superiores de actividad *in vitro* a temperaturas más elevadas.

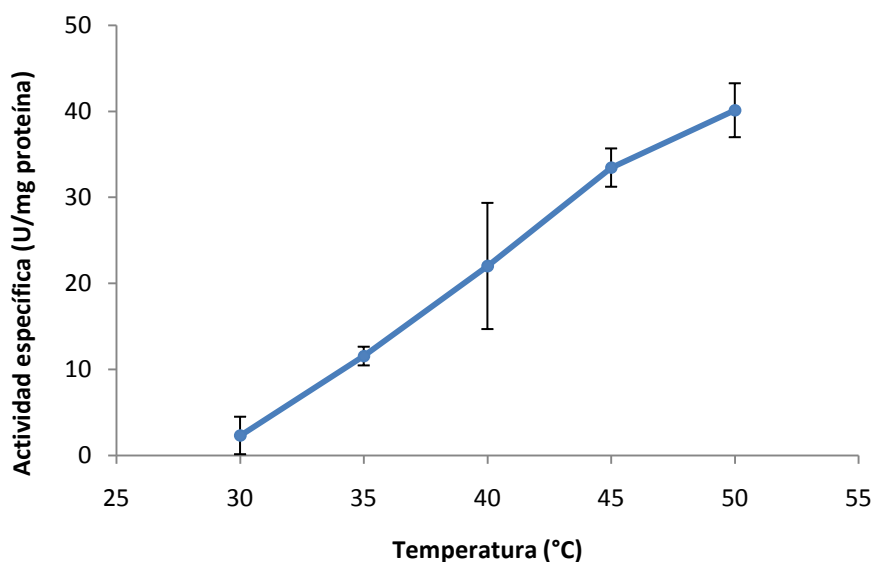


Figura 3.17. Efecto de temperatura de incubación sobre la actividad His₆NirA de *T. elongatus* BP-1. Para cada determinación se empleó 30 µl de una preparación 0,1 mg/ml de His₆NirA. La actividad se determinó con metil viológeno reducido con ditionito.

Sin embargo, no se muestran resultados de los ensayos *in vitro* realizados a temperaturas superiores a 55°C, porque a partir de 50-55°C los productos de descomposición del ditionito interfieren significativamente en la determinación colorimétrica de nitrito, originando valores poco fiables y reproducibles.

Estabilidad térmica de la actividad

Se analizó el efecto que tenía la preincubación del enzima a distintas temperaturas en la estabilidad térmica de la actividad nitrito reductasa *in vitro* (Fig. 3.18).

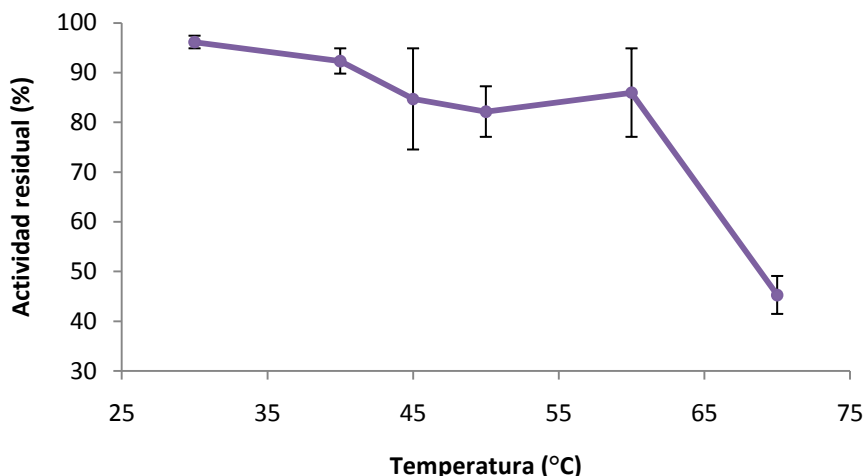


Figura 3.18. Estabilidad térmica de la actividad nitrito reductasa catalizada por His₆NirA de *T. elongatus* BP-1 en presencia de nitrito. Para cada determinación se empleó 30 µl de una preparación 0,1 mg/ml de His₆NirA. La actividad se determinó con metil viológeno reducido con ditionito.

Previamente, se comprobó que la presencia de nitrito estabilizaba el enzima frente a la temperatura, proporcionando valores de actividad residual superiores a los obtenidos en ausencia de sustrato. La preincubación de His₆NirA durante 15 min en presencia de nitrito a temperaturas comprendidas entre 30°C y 60°C no afectaba significativamente los valores de actividad residual ensayada a 45°C. Sin embargo, la actividad disminuyó significativamente cuando el enzima se preincubaba a temperaturas mayores de 60°C. Así, la preincubación de His₆NirA a 70°C producía una disminución de la actividad del 60%.

Cabe señalar que el índice de inestabilidad calculada para esta proteína es de 48,08 (Expasy ProtParam tool), lo que la clasifica como una proteína inestable.

Efecto del pH en la actividad

Para determinar el pH óptimo de actividad nitrito reductasa se ensayó el enzima empleando tampones 0,1 M de fosfato sódico y de Tris-HCl (**Fig. 3.19**) ajustados a los valores de pH indicados. El pH que se representa en la gráfica era el medido en la mezcla de incubación al final de la reacción.

Los máximos valores de actividad se midieron en el intervalo de pH 7,6-7,8, obteniéndose valores ligeramente superiores en tampón Tris-HCl. Este valor está dentro del intervalo de pH 7-8 en el que se encuentran los valores de pH óptimo de actividad de otras nitrito reductasas (Arizmendi *et al.*, 1990).

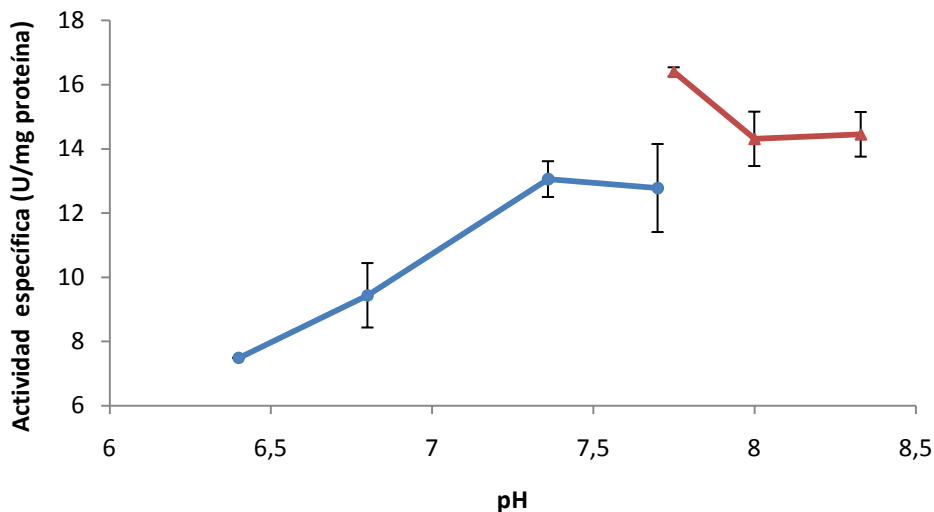


Figura 3.19. Efecto del pH en la actividad nitrato reductasa catalizada *in vitro* por His₆NirA de *T. elongatus* BP-1. Para cada determinación se empleó 50 µl de una preparación 0,07 mg/ml de His₆NirA. La actividad se determinó con metil viológeno reducido con ditionito. El pH de la mezcla de reacción se ajustó en tampón fosfato (trazo azul) y Tris-HCl (trazo rojo).

Afinidad del enzima por nitrato

La afinidad por nitrato mostrada por His₆NirA se determinó ensayando *in vitro* la actividad nitrato reductasa con concentraciones finales de NaNO₂ comprendidas entre 2,5 µM y 250 µM. Con los datos obtenidos se calcularon los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y de la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$).

La representación directa (**Fig. 3.20**) muestra que el enzima presenta un comportamiento aparentemente Michaeliano respecto al nitrato. A partir de los datos obtenidos se calcularon valores de K_m para al nitrato y de $V_{m\acute{a}x}$ de 53,62 µM y 5,34 U/mg de proteína, respectivamente.

Se ha descrito que la afinidad por el nitrito de la NirA de organismos fotosintéticos ensayada con metil viológeno reducido con ditionito está comprendida entre valores de K_m de 40 μM y 0,8 mM (Vega y Kamin, 1977; Arizmendi *et al.*, 1981; Ida y Mikami, 1986; Arizmendi *et al.*, 1990; Bellissimo y Privalle, 1995). Sin embargo, se han descrito valores superiores e inferiores de K_m , en función de si se ha empleado ferredoxina o metil viológeno reducido como donador de electrones (Ida y Mikami, 1986), así como del tipo de ensayo y análisis empleado (velocidades iniciales o curvas de progreso) (Hucklesby *et al.*, 1972; Fry *et al.*, 1982).

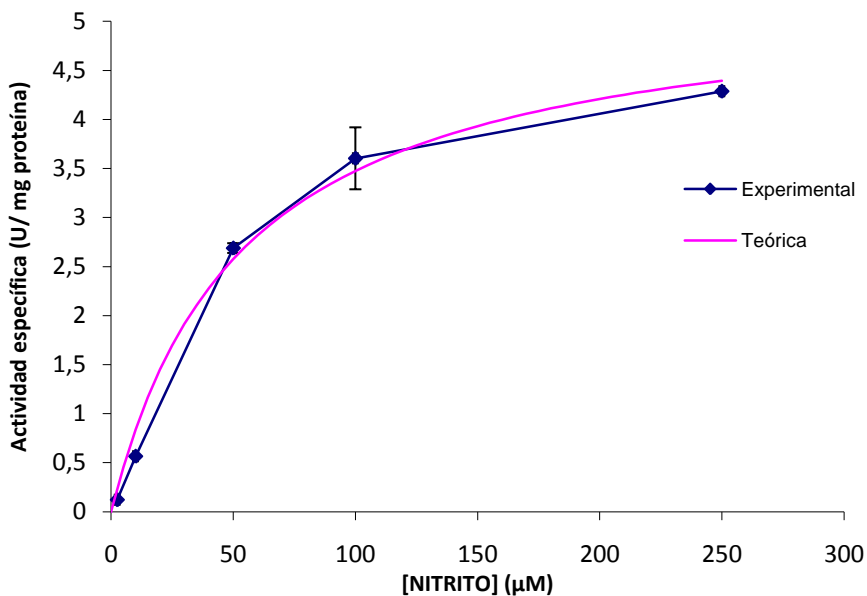


Figura 3.20. Determinación de la afinidad de His₆NirA por el nitrito. Los datos experimentales se han ajustado por regresión no lineal a una hipérbola rectangular equilátera.

3.3.4. Evaluación de los anticuerpos policlonales anti-His₆NirA

Para conseguir el doble objetivo de purificar NirA nativa a partir de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 y hacer un seguimiento de la expresión *in vivo* de NirA en células silvestres de *T. elongatus* BP-1, se emplearon anticuerpos policlonales anti-His₆NirA (**Fig. 3.21**). Estos anticuerpos se obtuvieron empleando como inmunógeno una preparación purificada de la proteína recombinante que contenía tanto His₆NirA como la forma truncada de la misma.

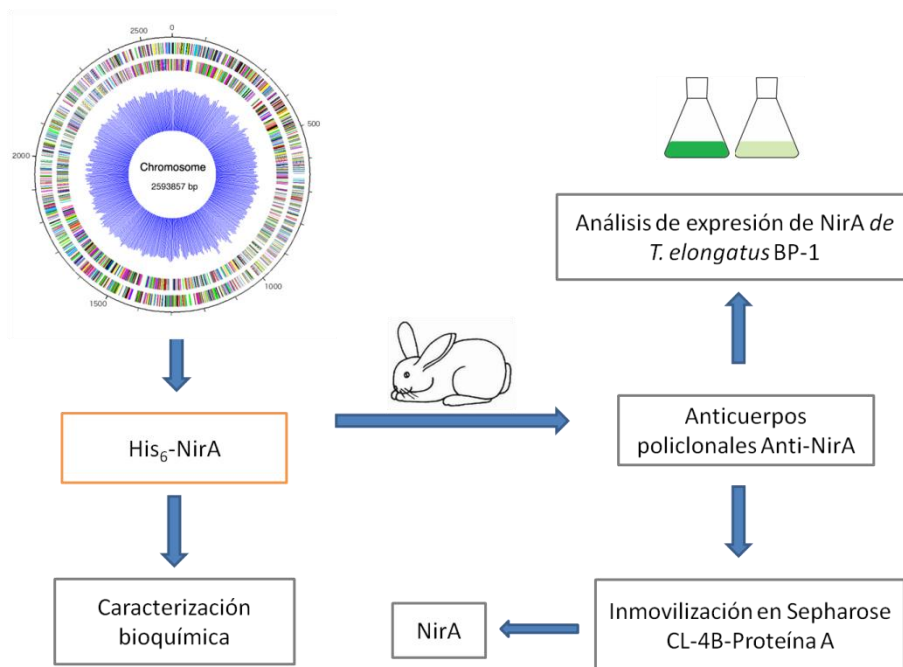


Figura 3.21. Obtención de anticuerpos policlonales anti-His₆NirA y aplicaciones de los mismos.

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-NirA para detectar NirA nativa a partir de extractos de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 crecidas en medio BG11 (**Fig. 3.22**). Para evaluar la especificidad y afinidad de los anticuerpos se realizaron diluciones (1:1, 1:10 y 1:20 v/v) de un extracto (cuya concentración de proteína total era de 0,1 mg/ml) y de los anticuerpos primarios anti-His₆NirA (1/500, 1/1000 y 1/2000 v/v).

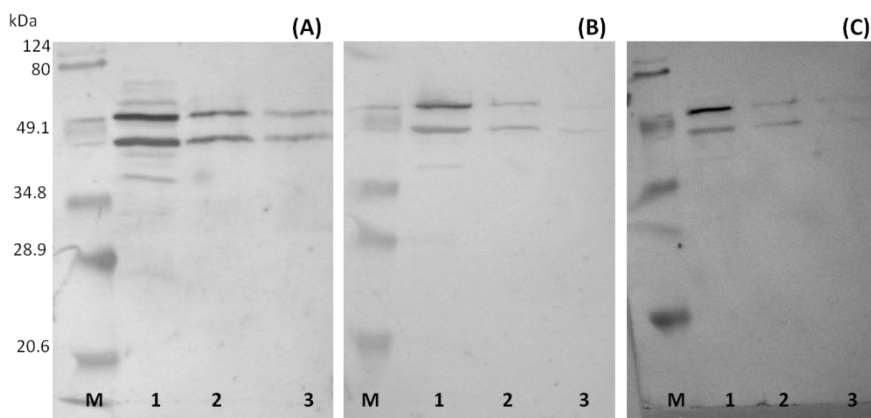


Figura 3.22. Western blot de extractos de células de *T. elongatus* BP-1. (1) Dilución 1:1 (v/v); **(2)** dilución 1:10 (v/v) y **(3)** dilución 1:20 (v/v). Detección con dilución de anti-His₆NirA en tampón TBS **(A)** 1/500 (v/v). **(B)** 1/1000 (v/v) y **(C)** 1/2000 (v/v).

También se comprobó la capacidad de los anticuerpos anti-His₆NirA para detectar la presencia de NirA en células silvestres de *T. elongatus* BP-1 solubilizadas con tampón de muestra (se detalla en el apartado **3.3.6**). En todos los casos, los anticuerpos anti-NirA detectaban la proteína nativa de 58 kDa y otra de aproximadamente 44 kDa de masa molecular. (**Fig. 3.22**). Aunque no se puede asegurar que la proteína de menor tamaño coincida con la forma truncada de NirA detectada tras la expresión en *E. coli* de His₆NirA, parece probable que así sea. En tal caso, estos resultados demostrarían que la proteína NirA truncada aparece tanto *in vivo* como al ser expresada *E. coli*, aunque su origen e implicación fisiológica puede que sean completamente distintos en ambas situaciones.

Los ensayos anteriormente descritos demuestran la capacidad de los anticuerpos para detectar la proteína nativa tanto en extractos acelulares como en preparaciones de células totalmente solubilizadas en tampón de carga. Los anti-His₆NirA suponen, por lo tanto, una herramienta muy útil para el estudio de la proteína NirA y de su expresión *in vivo*.

3.3.5. Purificación de NirA de células silvestres de *T. elongatus* BP-1

3.3.5.1. Preparación de la columna de inmunoafinidad

Los anticuerpos anti-His₆NirA se inmovilizaron covalentemente a la resina Sepharosa CL-4B-Proteína A (apartado 3.2.12.2). El rendimiento de la inmovilización se analizó registrando la absorbancia a 280 nm y por análisis de las IgGs mediante SDS-PAGE (**Fig. 3.23**).

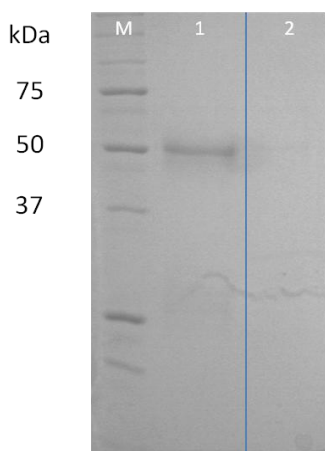


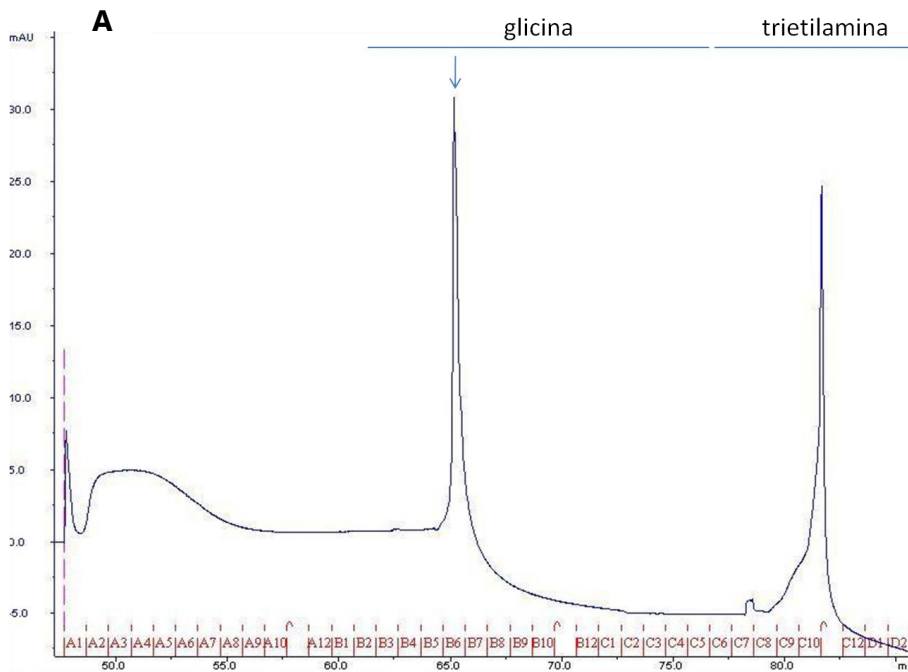
Figura. 3.23. Seguimiento por SDS-PAGE de la inmovilización de los anticuerpos anti-His₆NirA a la resina Sepharose CL-4B-Proteína A. (M) Marcadores de masa molecular Precision Plus Protein Standards. **(1)** 10 μ l de la muestra ofrecida a la resina. **(2)** 10 μ l de la muestra no retenida.

Se detecta una banda de aproximadamente 50 kDa que corresponde a la cadena pesada de las IgGs (calle 1 **Fig. 3.23**). Una vez inmovilizados los anticuerpos, analizando la muestra no retenida (calle 2 **Fig. 3.23**), se observa que esta banda desaparece indicando que los anticuerpos han quedado inmovilizados en la resina de proteína A.

3.3.5.1.a. **Evaluación de la columna con His₆NirA**

Como ensayo preliminar, para evaluar la capacidad de los anticuerpos inmovilizados en la columna de inmutioafinidad para retener NirA, se cromatografiaron 50 µg de proteína recombinante (His₆NirA a 10 µg/ml) purificada por IMAC (**Fig. 3.24A**). Dado que los anticuerpos anti-His₆NirA detectan tanto la proteína nativa como la recombinante, este ensayo permitía determinar si los anticuerpos estaban orientados correctamente y eran capaces de retener la proteína. Después de aplicar la muestra y lavar la columna con tampón de equilibrado, la proteína fuertemente retenida se eluyó con un lavado ácido (con glicina) seguido de otro básico (con trietilamina) como se indica en el apartado **3.2.12.2.a**.

La proteína de las fracciones obtenidas en ambas eluciones se precipitaron con TCA (apartado **3.2.12.2.a**) y analizaron posteriormente por SDS-PAGE (**Fig. 3.24B**).



B

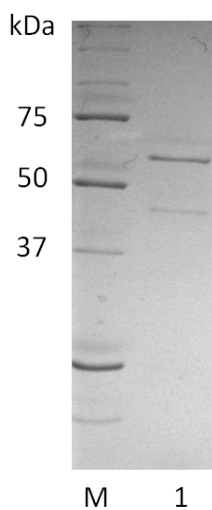


Figura 3.24. Purificación de His₆NirA por cromatografía de inmunoafinidad. (A) Cromatograma obtenido en la purificación de His₆NirA. (-) Registro de la absorbancia a 280 nm. Fracciones correspondientes a la elución ácida (con glicina) y básica (con trietilamina). La fracción analizada por SDS-PAGE se señala con una flecha. **(B) (1)** Análisis por SDS-PAGE de la fracción B6 de proteína correspondiente a la elución con glicina. **(M)** Marcadores de masa molecular Precision Plus Protein Standards.

En la fracción de a la elución ácida analizada por SDS-PAGE se detectó tanto His₆NirA como la forma troncada de la misma (de 44 kDa). Se comprobó que la columna de inmunoafinidad era útil para purificar His₆NirA. Los anticuerpos parecían estar orientados, y por tanto, deberían ser capaces de retener la proteína nativa.

3.3.5.2. Optimización de la fuente para purificar NirA

Para la purificación de NirA nativa se emplearon células silvestres de *T. elongatus* BP-1 crecidas en medio BG11 y posteriormente sometidas a deficiencia de nitrógeno. Se decidió emplear células deficientes en nitrógeno porque, como sucede en otras cianobacterias, en ellas se sobreexpresan los enzimas involucrados en la asimilación de nitrato, entre ellos, la nitrito reductasa (Fresnedo y Serra, 1992; Garbisu *et al.*, 1992). La deficiencia en nitrógeno provoca, además, que las células utilicen las ficobiliproteínas como fuente de nitrógeno. En consecuencia, los extractos de estas células presentan menor contenido de proteína soluble y mayor nivel de NirA, facilitando ambos factores la purificación del enzima al incrementar la actividad específica del extracto crudo.

Como estrategia para purificar NirA nativa a partir de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 deficientes en nitrógeno, se empleó una etapa cromatográfica de intercambio iónico seguida de otra de inmunoafinidad.

3.3.5.3. Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa

El extracto obtenido a partir de células de *T. elongatus* BP-1 deficientes en nitrógeno se analizó por SDS-PAGE seguida de *Western blot*, detectándose tanto NirA como la forma truncada de la misma (**Fig. 3.25**).

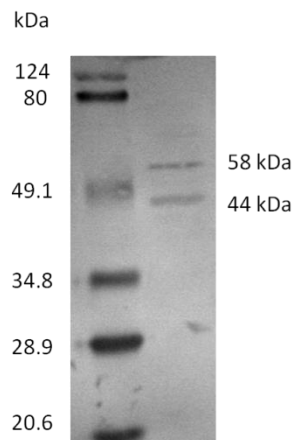


Figura 3.25. (1) Análisis por SDS-PAGE seguido de *Western blot* de una muestra del extracto original cromatografiado en la columna de DE-52. Se emplearon anticuerpos primarios anti-His₆NirA a una dilución 1/1000 (v/v) en TBS. **(M)** Marcadores de masa molecular preteñidos SDS-PAGE Standards Broad Range.

Una vez cromatografiado por intercambio iónico el extracto de *T. elongatus* BP-1 en la columna de DE-52 (**Fig. 3.26**), la presencia de NirA en las fracciones recogidas se analizó ensayando la actividad nitrito reductasa. Se detectó actividad en las fracciones que eluían con 0,1-0,5 M de KCl. Estas fracciones activas se juntaron, dializaron para eliminar la sal, y finalmente, se cromatografiaron en la columna de inmunoafinidad.

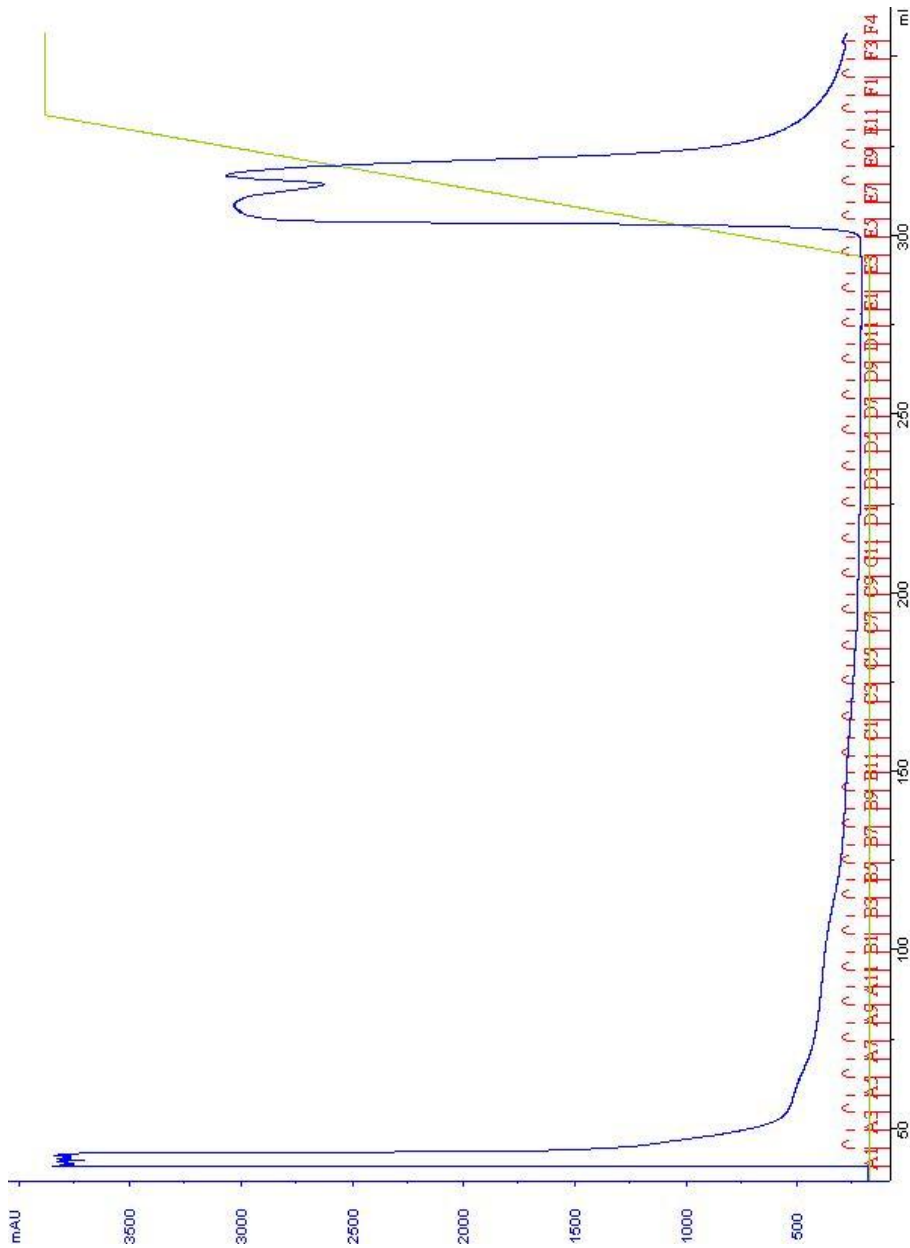


Figura 3.26. Cromatograma obtenido en la cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa (DE-52) del extracto de células silvestres deficientes en nitrógeno de *T. elongatus* BP-1. (-) Registro de la absorbancia a 280 nm. (-) Gradiente de KCl.

3.3.5.4. **Cromatografía de inmunoafinidad**

La cromatografía se realizó en las mismas condiciones empleadas anteriormente con la proteína recombinante His₆NirA. La proteína nativa se eluyó con una elución ácida (con glicina) seguida de otra básica (con trietilamina) como se detalla en el apartado **3.2.12.2.a (Fig. 3.27)**. La proteína eluída se encontraba a muy baja concentración, por lo que fue necesario concentrarla previamente para poder detectarla por SDS-PAGE y *Western blot*. Las fracciones obtenidas en ambas eluciones se precipitaron con TCA y acetona, y posteriormente se analizaron por SDS-PAGE y *Western blot* empleando anticuerpos anti-His₆NirA a una dilución 1/1000 (v/v).

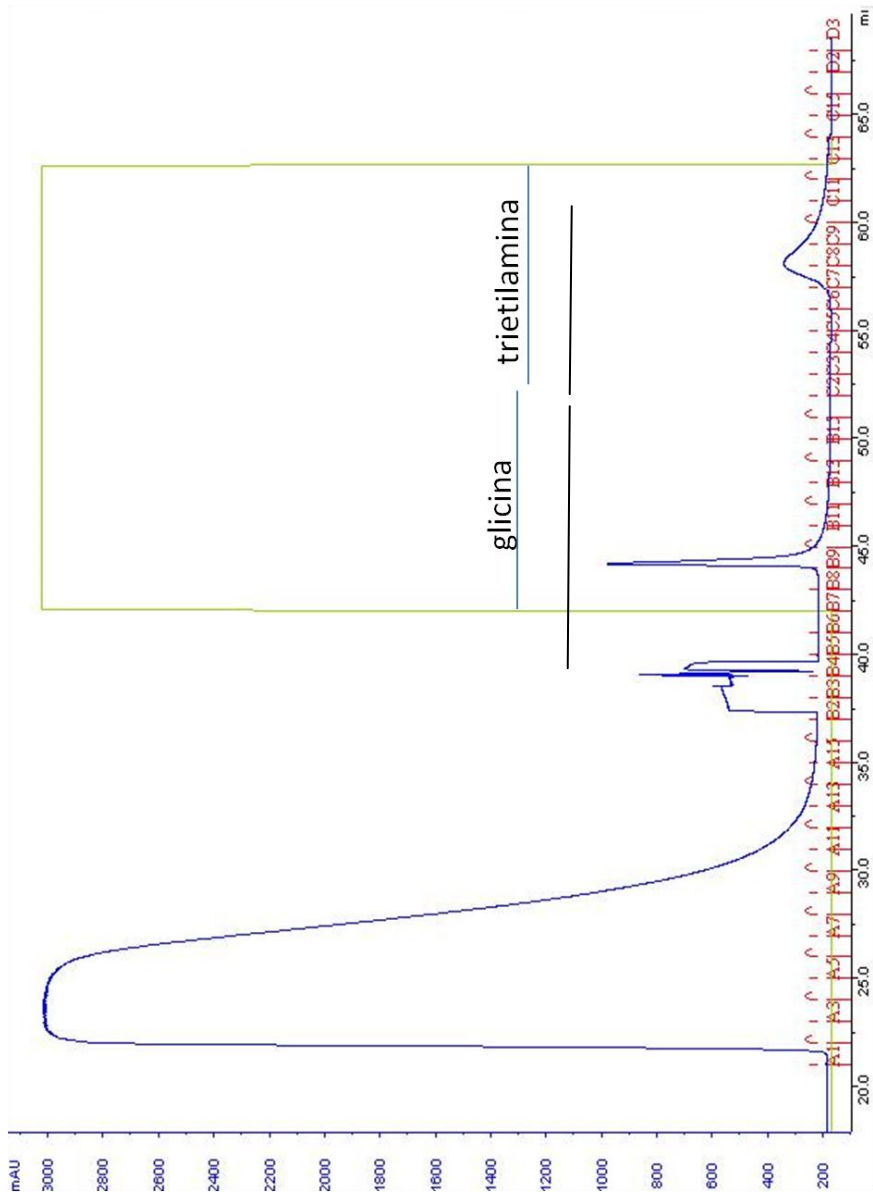


Figura 3.27. Cromatograma obtenido en la cromatografía de inmunoafinidad. Fracciones correspondientes a la elución ácida (glicina). Fracciones correspondientes a la elución básica (trietilamina). (-) Registro de la absorbancia a 280 nm.

Se comprobó que las fracciones obtenidas de la columna de inmunoafinidad contenían tanto la proteína de 44 kDa como la de 58 kDa (**Figura 3.28**).

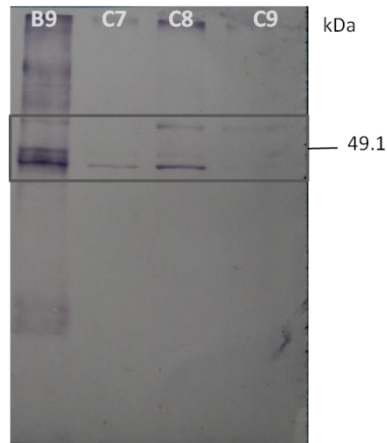


Figura 3.28. Análisis por SDS-PAGE seguido por *Western blot* de varias fracciones obtenidas en la cromatografía de inmunoafinidad de extracto de células silvestres de *T. elongatus* BP-1. Se analizaron las fracciones obtenidas en la elución ácida (**B9**) y elución básica (**C7, C8 y C9**) con anticuerpos anti-His₆NirA.

Si la ventaja de purificar NirA por inmunoafinidad es que permite obtener preparaciones puras de NirA mediante una única etapa de purificación, el rendimiento de la purificación conseguido es muy bajo. Aún así, es importante señalar que la escasa cantidad de proteína obtenida en esta etapa no es sólo consecuencia del protocolo experimental empleado, sino también de la baja concentración a la que ésta proteína se encuentra en las células (Arizmendi, 1989).

3.3.6. Expresión de NirA *in vivo*

Se estudió la expresión *in vivo* de NirA en células silvestres de *T. elongatus* BP-1 cultivadas en medios con diversas fuentes nitrogenadas, así como crecidas con nitrato y sometidas a deficiencia nitrogenada.

Para este fin, se cultivaron células en los medios BG11sinSA, BG11sinSNI, BG11 y BG11sin (como se detalla en el apartado **3.2.13**) y que ahora se aluden como medio con amonio, nitrito, nitrato y sin nitrógeno, respectivamente. En los medios con fuente nitrogenada, la concentración inicial de nitrógeno era 4 mM, en todos los casos.

El análisis por SDS-PAGE seguido de *Western blot* (empleando anticuerpos anti-His₆NirA) permitió seguir la presencia *in vivo* de proteína NirA en muestras de células solubilizadas de *T. elongatus* BP-1. En estas células, al igual que sucedía en extractos acelulares (**Fig. 3.22**), los anticuerpos anti-His₆NirA detectan dos proteínas: NirA (de 58 kDa) y una forma truncada de la misma (de aproximadamente 44 kDa). Además, en algunas situaciones se detectan otras bandas más tenues y de menor tamaño que podrían corresponder a otros productos de degradación de NirA.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la expresión *in vivo* de NirA durante el crecimiento de las células en diversos medios empleando cultivos inoculados con la misma densidad, procedentes de cultivos de células crecidas con amonio, nitrito o nitrato como única fuente nitrogenada.

3.3.6.1. Células crecidas con amonio

En la **Figura 3.29A** se muestra el crecimiento de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 en medios con amonio, nitrito, nitrato y sin nitrógeno, en cultivos que se inocularon empleando células crecidas con amonio.

En la **Figura 3.29B** se muestra la expresión de NirA y de sus formas truncadas a lo largo de 96 h de los cultivos anteriores.

En células crecidas con amonio (**Fig. 3.29B AMONIO**) no se detecta la forma completa de NirA, y a partir de las 6 h se observa únicamente, la banda de proteína truncada.

En células crecidas con nitrito (**Fig. 3.29B NITRITO**), aparece la banda de NirA truncada (de 44 kDa) en los primeros tiempos ensayados (0 h-3 h). A partir de las 6 h se detecta NirA completa (58 kDa) junto a la proteína truncada.

En células crecidas con nitrato (**Fig. 3.29B NITRATO**) se detectan bandas intensas de expresión de NirA a partir de las 3 h. Además, se detecta la banda de proteína truncada, y a partir de 48 h aparece otro producto de degradación minoritario.

En células transferidas a medio carente de fuente nitrogenada (**Fig. 3.29B SIN N**), únicamente se detecta la forma de NirA de 58 kDa a partir de las 3 h y hasta las 96 h. Este resultado confirma que se expresan las proteínas involucradas en la toma y reducción de nitrato y nitrito en condiciones de ausencia de nitrógeno en el medio.

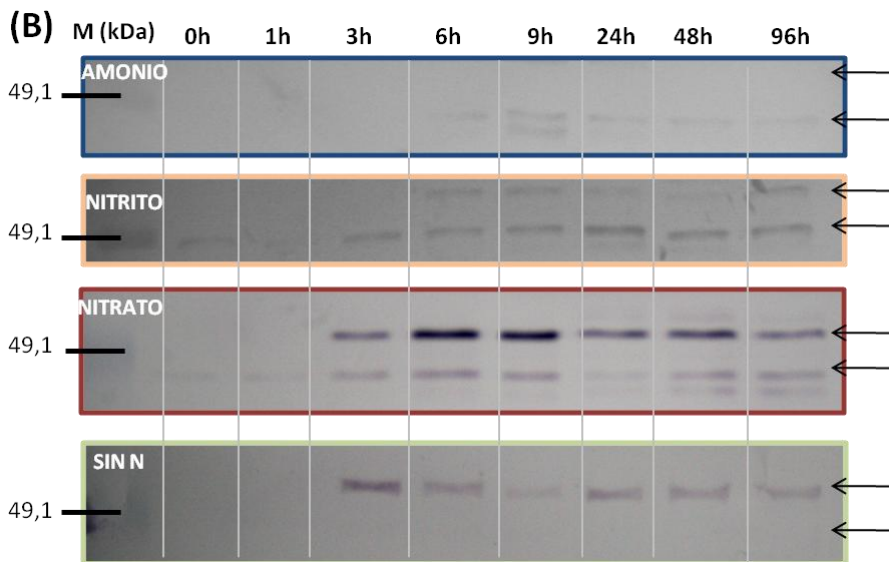
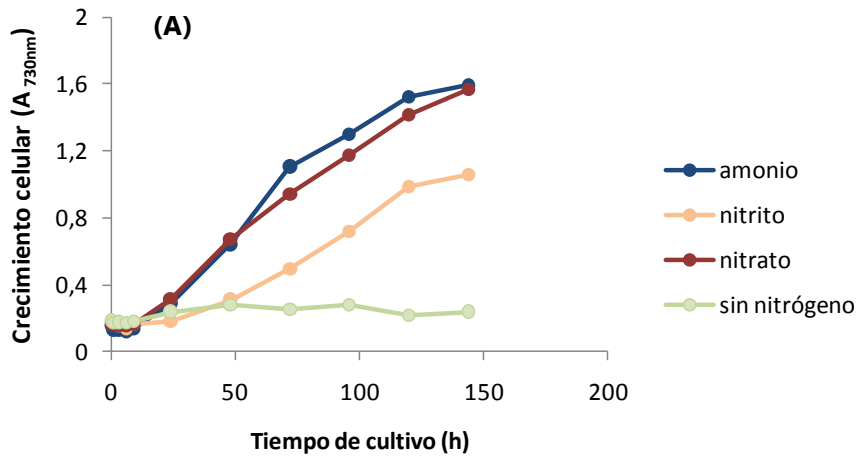


Figura 3.29. (A) Cultivo de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 en medio con **amonio**, **nitrito**, **nitrato** y **sin nitrógeno** a partir de un inóculo de células crecidas con amonio. **(A)** Evolución de los cultivos inoculados con idéntica cantidad de células. **(B)** Análisis por SDS-PAGE y *Western blot* de células cosechadas a los tiempos indicados y solubilizadas con tampón de carga. **(M)** Marcadores de masa molecular. Las flechas de la derecha indican las posiciones correspondientes a proteínas de 58 kDa y de aproximadamente 44 kDa (forma completa y trunca de NirA, respectivamente).

3.3.6.2. Células crecidas con nitrito

En la **Figura 3.30A** se muestra el crecimiento de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 en medios con amonio, nitrito, nitrato y sin nitrógeno, en cultivos que se inocularon empleando células crecidas con nitrito. En la **Figura 3.30B** se muestra la expresión de NirA y de sus formas truncadas a lo largo de 96 h de los cultivos anteriores.

En células crecidas con amonio (**Fig. 3.30B AMONIO**), se detectaron las dos bandas de NirA a lo largo de las 96 h, predominando la banda de 44 kDa. Como en el caso en que se empleó un inóculo crecido en amonio (**Fig. 3.29B AMONIO**), se observa, existe expresión de NirA, detectándose fundamentalmente, su forma truncada.

En células crecidas con nitrito (**Fig. 3.30B NITRITO**), la presencia de NirA de 58 kDa aumenta con el tiempo de cultivo hasta las 9 h, en detrimento de la banda de 44 kDa. A partir de las 9 h se invierte la tendencia, y aparece un producto de degradación intermedio.

Las células crecidas con nitrato (**Fig. 3.30B NITRATO**) muestran un patrón similar al de las crecidas con amonio y transferidas a nitrato (**Fig. 3.29B NITRATO**). A partir de las 3 h, la banda de proteína NirA completa es especialmente intensa. A todos los tiempos ensayados se detecta la forma truncada, aunque es menos intensa que la correspondiente a la proteína completa.

En células transferidas a medio carente de fuente nitrogenada (**Fig. 3.30B SIN N**), se detecta NirA completa y también, en algunos tiempos, la banda de la forma truncada. Como sucedía en las condiciones mostradas en la **Figura 3.29B SIN N**, se detecta expresión de NirA.

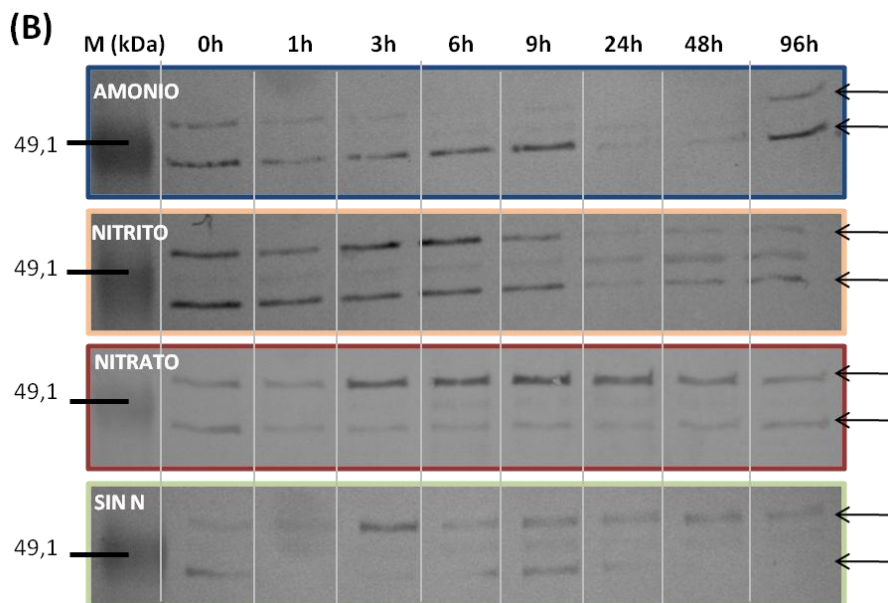
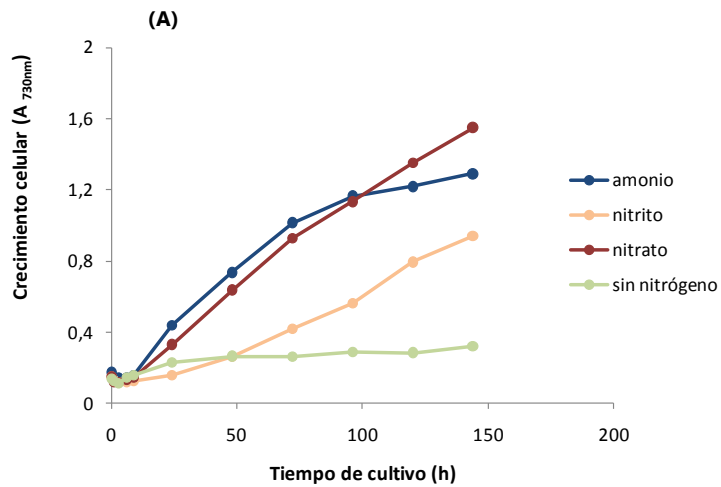


Figura 3.30. (A) Cultivo de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 en medio con amonio, nitrito, nitrato y sin nitrógeno a partir de un inóculo de células crecidas con nitrito. (A) Evolución de los cultivos inoculados con idéntica cantidad de células. **(B)** Análisis por SDS-PAGE y *Western blot* de células cosechadas a los tiempos indicados y solubilizadas con tampón de carga. **(M)** Marcadores de masa molecular. Las flechas de la derecha indican las posiciones correspondientes a proteínas de 58 kDa y de aproximadamente kDa (forma completa y troncada de NirA, respectivamente).

3.3.6.3. Células crecidas con nitrato

En la **Figura 3.31A** se muestra el crecimiento de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 en medios con amonio, nitrito, nitrato y sin nitrógeno, en cultivos que se inocularon empleando células crecidas con nitrato. En la **Figura 3.31B** se muestra la expresión de NirA y de sus formas truncadas a lo largo de 96 h de los cultivos anteriores.

En células crecidas con amonio (**Figura 3.31B AMONIO**) en todos los tiempos se detecta tanto NirA de 58 kDa, como su forma truncada. Inicialmente (0-3 h) predomina la forma de 58 kDa, y a partir de las 6 h predomina su forma truncada. Se comprueba, nuevamente, que en presencia de amonio se detecta NirA en su forma truncada.

En células crecidas con nitrito (**Fig. 3.31B NITRITO**), inicialmente sólo se detecta NirA completa, y a partir de 1 h se detectan ambas formas (de 44 y 58 kDa). La evolución de la expresión es similar al obtenido en las **Figuras 3.29B NITRITO** y **3.30B NITRITO**.

En células crecidas con nitrato los resultados obtenidos son muy similares al mostrado en la **Figura 3.30B NITRATO**. La forma de NirA de 58 kDa se detecta con mayor intensidad que la banda de su forma truncada. Además, la intensidad de la banda de 58 kDa disminuye notablemente a partir de las 24 h.

En células transferidas a medio sin fuente nitrogenada (**Fig. 3.31B SIN N**), a partir de las 3 h se observan tanto NirA de 58 kDa como su forma truncada, siendo la primera más intensa. De nuevo, se comprueba que en células deficientes hay en nitrógeno se expresa NirA.

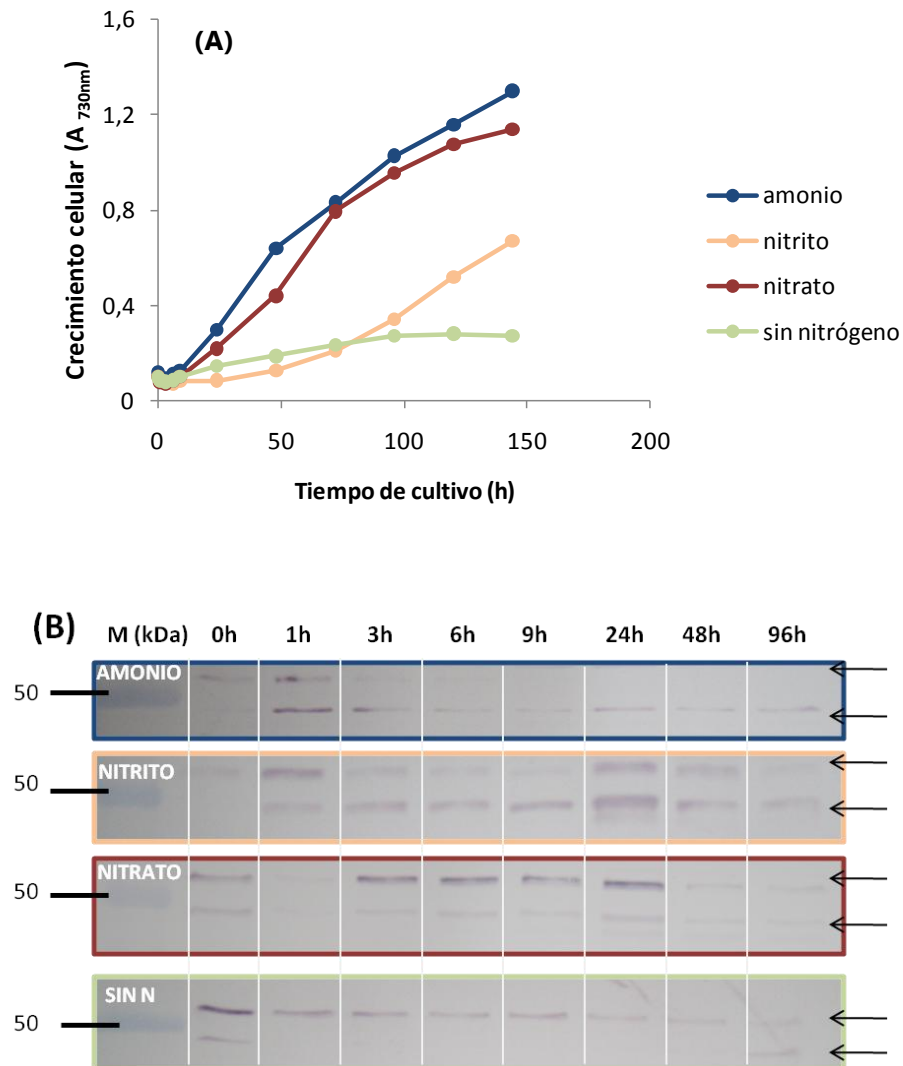


Figura 3.31 (A) Cultivo de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 en medio con **amonio**, **nitrito**, **nitrato** y **sin nitrógeno** a partir de un inóculo de células crecidas con nitrato. **(A)** Evolución de los cultivos inoculados con idéntica cantidad de células. **(B)** Análisis por SDS-PAGE y *Western blot* de células cosechadas a los tiempos indicados y solubilizadas con tampón de carga. **(M)** Marcadores de masa molecular. Las flechas de la derecha indican las posiciones correspondientes a proteínas de 58 kDa y de aproximadamente kDa (forma completa y troncada de NirA, respectivamente).

De manera general, teniendo en cuenta el crecimiento celular (**Figs 3.29A, 3.30A y 3.31A**), se observa que las células de *T. elongatus* BP-1 crecidas con amonio y nitrato muestran una pauta de crecimiento muy similar, independientemente de la fuente nitrogenada empleada para crecer el inóculo que se empleó para inocular los cultivos. Sin embargo, las células crecidas con nitrito muestran en los tres casos una fase *lag* más acentuada y un crecimiento más lento que las células crecidas en medio con amonio o nitrato.

Además, en todos los casos los valores de turbidez alcanzados por las células crecidas con nitrito son menores que los correspondientes a las crecidas con amonio o nitrato. Se observa incluso, que en los momentos iniciales de crecimiento, las células incubadas en medio sin fuente nitrogenada, presentan valores de densidad celular superiores a los correspondientes a las crecidas en presencia de nitrito.

En general, el nitrito es una fuente nitrogenada problemática para el cultivo de cianobacterias en el laboratorio, ya que la concentración de este anión en el medio ha de estar muy bien controlada para que no sea tóxico para las células.

Los resultados mostrados en las **Figuras 3.29B, 3.30B y 3.31B**, demuestran que tanto la naturaleza de la fuente nitrogenada, como la ausencia de la misma, condicionan la expresión *in vivo* de la proteína NirA. Esta proteína se detecta *in vivo* tanto en su forma completa (58 kDa), como en una forma troncada mayoritaria de aproximadamente 44 kDa.

El conjunto de estos resultados indica que *in vivo* existe una hidrólisis de NirA similar a la detectada tras la expresión de His₆NirA en *E. coli*. Estos resultados corroboran que probablemente, en la secuencia de esta proteína, existe una zona especialmente accesible a proteasas o susceptible a la degradación. Aunque no se puede asegurar que la forma truncada detectada al expresar His₆NirA en *E. coli*, sea exactamente la misma que la detectada *in vivo*, el hecho de que ambas tengan masas moleculares similares y que el patrón de hidrólisis sea tan definido en ambas situaciones, sugieren que se trate de la misma forma truncada de NirA.

Si bien tanto en *E. coli* como *in vivo* se detectan las formas completas y truncadas de NirA, los resultados obtenidos de la expresión de la proteína indican *in vivo* esta hidrólisis no es inespecífica, sino que parece estar controlada por la naturaleza de la fuente nitrogenada presente en el medio de cultivo.

Estudios anteriores realizados en cianobacterias crecidas con amonio como única fuente de nitrógeno, señalan que en presencia de amonio no se detecta actividad nitrito reductasa (Herrero y Guerrero, 1986). Sin embargo, no existen estudios detallados a nivel de expresión de NirA. Los resultados obtenidos con células crecidas en medios con amonio como única fuente nitrogenada (**Figs 3.29B, 3.30B y 3.31B**) demuestran, inequívocamente, que NirA se expresa en presencia de amonio, si bien la proteína se detecta mayoritariamente en su forma truncada.

Por lo tanto, a pesar de que el amonio es la única fuente nitrogenada en el medio de cultivo, parece que NtcA (proteína reguladora de la expresión del operón *nirA-nrtABCD-narB*) se une al promotor del operón, promoviendo su transcripción, o al menos la transcripción del gen *nirA*. Teniendo en consideración la secuencia del operón *nirA-nrtABCD-narB* (**Fig. 1.7**) y dada la longitud existente en las zonas intergénicas, no parece probable que existan elementos reguladores en las mismas. Por lo tanto, lo más factible es que el conjunto de genes *nirA-nrtABCD-narB*, se transcriba como un único transcrito. De este modo, si *nirA* se transcribe se podría esperar que también lo hagan el resto de genes que constituyen el operón.

4. DISCUSIÓN GENERAL

Debido a su sencillez estructural, y a sus fáciles condiciones de cultivo, las cianobacterias son excelentes organismos fotosintéticos modelo para el estudio de la asimilación del nitrógeno inorgánico. Si bien son diversos los compuestos nitrogenados que las cianobacterias pueden utilizar para crecer, *P. laminosum* emplea NH_4^+ , NO_3^- y NO_2^- , así como distintas formas de nitrógeno combinadas (Tapia *et al.*, 1994). Para el transporte de nitrato y nitrito, *P. laminosum* posee un transportador ABC similar al descrito en otras cianobacterias (Omata, 1995) (**Fig. 1.1**).

Las proteínas que integran este transportador multicomponente (NrtA, NrtB, NrtC y NrtD), junto con las responsables de catalizar la reducción de nitrato a amonio (NirA y NarB) han sido objeto de intenso estudio en el laboratorio en el que se ha desarrollado este trabajo, utilizando *P. laminosum* como organismo modelo. Sin embargo, la comprensión de algunos aspectos de la expresión y/o del funcionamiento de las proteínas codificadas por el operón *nirA-nrtABCD-narB* se ha visto limitada por dos factores: el genoma de *P. laminosum* no ha sido aún secuenciado, y la morfología filamentosa de sus células dificulta el desarrollo de estrategias de transformación génica. Para superar estas limitaciones, se decidió cambiar de organismo modelo y emplear otra cianobacteria termofílica a la que se pudieran introducir los genes ya caracterizados de *P. laminosum*.

Como alternativa a *P. laminosum*, se seleccionó la cianobacteria unicelular, también termofílica, *T. elongatus* BP-1. Esta cianobacteria es un excelente modelo para llevar a cabo estrategias de ingeniería genética, ya que su genoma ha sido secuenciado y sus células pueden ser transformadas de forma natural con DNA exógeno (Nakamura *et al.*, 2002; Onai *et al.*, 2004).

A fin de aprovechar el conocimiento de las proteínas que dicho operón codifica en *P. laminosum*, con esta estrategia se pretendía sustituir los genes del operón *nirA-nrtABCD-narB* de *T. elongatus* BP-1 por los propios de *P. laminosum*.

En este trabajo se ha puesto a punto la metodología necesaria para llevar a cabo la mencionada sustitución de genes entre ambas cianobacterias termofílicas, y se ha sustituido *nirA*, primer gen del operón de *T. elongatus* BP-1, por el correspondiente gen de *P. laminosum*. El hecho de que el gen sustituido codifique una proteína con actividad enzimática (la nitrito reductasa) ha facilitado la construcción de células quiméricas de *T. elongatus* BP-1, permitiendo diferenciar fenotípicamente las células que portaban *nirA* en su genoma de las que no lo hacían.

La sustitución de un gen por el otro, ha exigido la construcción de un tipo celular intermedio de *T. elongatus* BP-1 que careciera de *nirA*. Este paso ha sido imprescindible, ya que la sustitución de un gen por otro con la misma función metabólica, imposibilita discernir fenotípicamente las células de *T. elongatus* BP-1 que portan su propio gen de las que han incorporado el correspondiente de *P. laminosum*.

En este tipo celular intermedio, se ha sustituido *nirA* de *T. elongatus* BP-1 por el gen *kat*. Este último gen codifica una proteína termoestable que confiere resistencia a la kanamicina a las células que la expresan. Es importante remarcar que el gen *kat* se ha insertado en el genoma de *T. elongatus* BP-1 sin llevar un promotor propio, por lo tanto la expresión del gen debería estar sujeta al propio promotor del operón *nirA-nrtABCD-narB*.

El fragmento de DNA necesario para realizar la sustitución deseada en el genoma de *T. elongatus* BP-1, se ha sintetizado por la técnica LFH-PCR (Wach, 1996). Una vez sintetizado el casete de conversión (**Fig. 2.20**), éste, tanto en forma lineal como previamente clonado, se ha insertado en el genoma de *T. elongatus* BP-1 aprovechando la facilidad mostrada por esta cianobacteria para adquirir DNA exógeno de manera natural. El casete porta regiones homólogas al DNA que limita *nirA*, de forma que se integra en el lugar preciso del genoma vía recombinación homóloga, permitiendo en este caso, sustituir *nirA* por *kat*.

Tanto la transformación con DNA lineal como circular, originaron células de *T. elongatus* BP-1 capaces de crecer en medio con amonio suplementado con kanamicina (medio de selección). Este resultado indica que el casete de conversión, junto con la transformación natural de *T. elongatus* BP-1, permiten introducir modificaciones en el DNA de estas células. Sin embargo era distinto, el resultado del análisis genotípico de las colonias transformadas, en función de si el DNA empleado para la transformación había sido lineal o circular.

En el primer caso, se obtuvieron células merodiploides (**Figs 2.23-2.25**) que portaban en su genoma tanto *kat* como *nirA* de *T. elongatus* BP-1. Esta limitación, consecuencia de las múltiples copias del genoma presentes en cada célula de *T. elongatus* BP-1, se superó transformando las células con DNA circular.

Las células transformadas con DNA circular (designadas como *T. elongatus* BP-1 *nirA⁻/kat⁺*), son incapaces de crecer en medio BG11 (que contiene nitrato como única fuente nitrogenada), confirmando que *nirA* de *T. elongatus* BP-1 es el único gen presente con actividad nitrito reductasa, y por tanto, es un gen esencial para el crecimiento cuando las células disponen de nitrato o nitrito como única fuente nitrogenada. Con la construcción de este tipo celular intermedio, se demuestra, como se ha indicado en otras ocasiones, que la eficiencia de la transformación es mayor con DNA circular que con este mismo DNA en forma lineal.

La construcción de este tipo celular intermedio entre células de *T. elongatus* BP-1 que portan en su genoma su propio *nirA* y las que llevan el correspondiente de *P. laminosum*, ha puesto de manifiesto una importante característica relacionada con la expresión del operón de asimilación de nitrato/nitrito en *T. elongatus* BP-1. Así, se ha comprobado que *kat* se expresa en las células transformadas durante la selección en medio con amonio como única fuente nitrogenada suplementado con kanamicina. Este resultado también demuestra, inequívocamente, que la transcripción del operón *nirA-nrtABCD-narB* de *T. elongatus* BP-1 no queda totalmente reprimida cuando el amonio es la única fuente nitrogenada presente en el medio.

El proceso realizado para complementar células de *T. elongatus* BP-1 carentes de *nirA* con el gen *nirA* de *P. laminosum*, ha sido similar al empleado para la construcción del anterior tipo celular. La técnica empleada para la síntesis del casete de conversión ha sido también LFH-PCR, y se ha empleado DNA circular para la transformación.

La complementación de las células a nivel genómico ha sido un proceso menos eficiente que el caso de la inserción de *kat*. En esta ocasión, para obtener resultados satisfactorios ha sido necesario disminuir la temperatura del proceso de transformación hasta 48°C, debido probablemente a la menor termoestabilidad de la NirA de *P. laminosum*. Además, se ha requerido subcultivar en múltiples ocasiones las células en medio BG11, protegiéndolas del exceso de luz, para conseguir finalmente que algunas colonias pudieran crecer en medio BG-11 líquido. El resultado genotípico de estas células confirma la inserción de *nirA* de *P. laminosum* en detrimento de *kat* (**Fig. 2.36**).

Al compararse el crecimiento en medio BG11 a 45°C y 55°C, tanto de células silvestres de *T. elongatus* BP-1, como de las quiméricas que portan en su genoma *nirA* de *P. laminosum* en detrimento del suyo propio, se han detectado diferencias significativas. Así, las células silvestres de *T. elongatus* BP-1 muestran un ligero mayor crecimiento a 55°C que las células quiméricas. Estas diferencias son menos apreciables a 45°C.

Con estos dos procesos, se ha establecido un desarrollo experimental que podría ser aplicable a los demás genes del operón *nirA-nrtABCD-narB*, y que a su vez abre las puertas para su utilización en otras investigaciones que utilicen el intercambio de genes entre cianobacterias.

La segunda parte de este trabajo se ha centrado en el estudio del metabolismo del nitrógeno inorgánico en *T. elongatus* BP-1. Como se sabe, esta cianobacteria presenta un operón *nirA-nrtABCD-narB* cuya organización es similar al de *P. laminosum* (**Fig. 1.7**).

Se ha empleado un sistema de expresión heterólogo para sobreexpresar NirA en células de *E. coli*. Se ha etiquetado a la secuencia de NirA con una extensión de seis residuos de histidina, que ha permitido purificar la proteína recombinante en un único paso (mediante cromatografía de afinidad a Ni^{2+}), en cantidad suficiente para realizar algunos ensayos básicos de caracterización.

La purificación por IMAC de NirA recombinante de *T. elongatus* BP-1 proporciona una proteína completa (de 58 kDa) y una forma truncada por el extremo carboxilo terminal (de 44 kDa). Se ha comprobado que la degradación de His₆NirA no transcurre durante el proceso de purificación, ya que la forma truncada está presente en células de *E. coli* durante su inducción con IPTG (**Fig. 3.13**). En la inducción, además de esta banda mayoritaria de proteína, también se han detectado otras minoritarias como productos de degradación.

El análisis de homología de secuencias con otras NirA indica que su forma truncada de 44 kDa, obtenida tras la purificación por IMAC, es una proteína carente de actividad nitrito reductasa, ya que no posee los residuos de cisteína necesarios para anclar covalentemente a la proteína los grupos prostéticos necesarios (sirohemo y $[\text{Fe}_4\text{-S}_4]$) para reducir el nitrito.

Consecuentemente, se ha asignado exclusivamente la actividad nitrito reductasa de la proteína, a la forma completa de la misma, y esta forma, es la que se ha caracterizado catalíticamente. Para ello, se ha estudiado el efecto de diversos factores sobre la actividad enzimática. Los resultados obtenidos confirman que esta proteína es una nitrito reductasa similar a la correspondiente a *P. laminosum* (Arizmendi y Serra, 1990) y a la caracterizada de otras cianobacterias y plantas superiores (Vega y Kamin, 1977).

Para purificar la proteína NirA de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 se han inmovilizado anticuerpos policlonales anti-His₆NirA sobre Sepharose CL-4B-Proteína A. Como fuente mejorada para purificar NirA, se ha empleado cultivos de células de *T. elongatus* BP-1 crecidas con nitrato y luego sometidas a deficiencia nitrogenada, ya que se ha descrito que en estas condiciones aumenta la actividad específica de las proteínas responsables de la asimilación de nitrato/nitrito (Fresnedo y Serra, 1992, Garbisu *et al.*, 1992).

La purificación por cromatografía de inmunoafinidad ha permitido obtener pequeñas cantidades puras de NirA a partir de extractos de células silvestres de *T. elongatus* BP-1. En estas preparaciones también se detecta la forma completa de NirA (de 58 kDa) y otra proteína de menor masa molecular como producto de hidrólisis de la misma. La cantidad de proteína NirA purificada obtenida por cromatografía de inmunoafinidad ha sido muy pequeña, debido probablemente a la falta de optimización del desarrollo experimental empleado, y a que NirA representa un porcentaje muy pequeño de la proteína total celular (Arizmendi, 1989). Si bien el rendimiento de esta purificación es susceptible de mejora, la proteína purificada ha servido para confirmar la existencia *in vivo* de dos formas de NirA de distinta masa molecular.

Finalmente, para estudiar la expresión *in vivo* de la NirA en células "intactas" (sólo solubilizadas con detergente) de *T. elongatus* BP-1 se ha realizado un seguimiento de la proteína en células silvestres crecidas con distintas fuentes nitrogenadas (**Figs 3.29-3.31**) en cultivos inoculados con células que habían crecido en amonio, nitrato o nitrito. Estos ensayos han permitido comprobar que, al igual que sucede durante la expresión de His₆NirA en *E. coli*, así como en la purificación por inmovilización de NirA de células silvestres de *T. elongatus* BP-1, también se detecta una forma truncada de NirA (de aproximadamente 44 kDa). Ahora, la aparición de las bandas de proteína de NirA, bien sea completa o truncada, está aparentemente regulada por la fuente nitrogenada disponible en el medio de cultivo. En esta ocasión, la proteólisis de NirA podría deberse a una posible regulación específica, o estar asociada a un mecanismo cuyo fin es reutilizar los grupos prostéticos en beneficio de la economía celular.

5. CONCLUSIONES

De los resultados descritos en esta Memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se han construido células de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 que en lugar de portar en su genoma su propio gen de la nitrito reductasa (*nirA*), portan el correspondiente al de *Phormidium laminosum*. La construcción de estas células quiméricas se ha realizado mediante un proceso basado, fundamentalmente, en la técnica *Long-Flanking-Homology-PCR*, y en la capacidad que muestra *T. elongatus* BP-1 de ser transformable de forma natural
2. La construcción de las células quiméricas ha exigido obtener un tipo celular intermedio de *T. elongatus* BP-1 carente del gen *nirA*. Este tipo celular, en el que el gen *nirA* ha sido sustituido por el gen *kat*, ha servido para confirmar inequívocamente los siguientes hechos:
 - *nirA* es el único gen que codifica una proteína con actividad nitrito reductasa en *T. elongatus* BP-1
 - La transcripción del operón *nirA-nrtABCD-narB* de *T. elongatus* BP-1 no está reprimida por completo cuando el amonio es la única fuente nitrogenada

3. Se ha comprobado que el crecimiento a 55°C es ligeramente mayor en medio con nitrato, como única fuente nitrogenada, de células silvestres de *T. elongatus* BP-1 respecto de las quiméricas, que portan en su genoma el *nirA* de *P. laminosum* en detrimento del suyo propio. Se pone de manifiesto así, que el intercambio de un solo gen entre cianobacterias de diferente termofilicidad origina diferencias fenotípicas detectables en el crecimiento celular a distintas temperaturas.

4. Se ha clonado, expresado y purificado la proteína His₆NirA de *T. elongatus* BP-1 mediante un sistema de expresión heterólogo en *E. coli*, obteniéndose suficiente proteína recombinante activa para realizar diversos ensayos de caracterización. Éstos han permitido comprobar que NirA es tanto a nivel estructural, como bioquímico, una proteína con actividad nitrato reductasa similar a la NirA de *P. laminosum* y a otras nitrato reductasas asimilatorias de organismos fotosintéticos

5. Empleando la proteína recombinante His₆NirA como inmunógeno, se han obtenido anticuerpos policlonales capaces de detectar tanto la propia proteína recombinante (His₆NirA) como la silvestre (NirA) de *T. elongatus* BP-1. Los anticuerpos obtenidos han permitido:
 - Realizar ensayos de inmunodetección de His₆NirA
 - Obtener un soporte cromatográfico para purificar por inmunoafinidad la proteína NirA de células silvestres de *T. elongatus* BP-1
 - Estudiar la expresión *in vivo* de NirA de *T. elongatus* BP-1 en cultivos de células crecidas en diferentes fuentes nitrogenadas

6. Los ensayos de inmunodetección con la proteína His₆NirA han demostrado que esta proteína es hidrolizada inespecíficamente durante su expresión en *E. coli*. Además, tras la purificación por IMAC se detecta tanto la proteína His₆NirA (de 58 kDa) como otra de 44 kDa, que corresponde a una forma truncada de la anterior. Estos ensayos, junto con la comparación de secuencias de otras nitrito/sulfito reductasas, indican la presencia de una zona especialmente accesible a la hidrólisis en el extremo carboxilo terminal de NirA

7. Los ensayos de inmunodetección realizados *in vivo* han detectado la presencia de una forma truncada al igual que sucede durante la expresión de His₆NirA en *E. coli*. Sin embargo, en esta ocasión la presencia de la proteína de 44 kDa y/o la de la forma completa de 58 kDa no parece deberse a una hidrólisis inespecífica, sino a un proceso aparentemente regulado por la fuente de nitrógeno disponible en el medio de cultivo

8. Los resultados de la expresión *in vivo* de NirA de *T. elongatus* BP-1 muestran que el operón *nirA-nrtABCD-narB* se transcribe independientemente de la fuente nitrogenada, siendo la proteína truncada de NirA de 44 kDa la que aparece, fundamentalmente, cuando las células utilizan amonio, mientras que la proteína completa de 58 kDa es mayoritaria cuando utilizan nitrato/nitrito, o cuando no hay disponible ninguna fuente de nitrógeno en el medio de cultivo

6. BIBLIOGRAFÍA



- Aichi, M. y Omata, T.** 1997. Involvement of NtcB, a LysR family transcription factor, in nitrite activation of the nitrate assimilation operon in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 179: 4671-4675.
- Aichi, M., Takatani, N. y Omata, T.** 2001. Role of NtcB in activation of nitrate assimilation genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 183: 5840-5847.
- Aichi, M., Yoshihara, S., Yamashita, M., Maeda, S., Nagai, K. y Omata, T.** 2006. Characterization of the nitrate assimilation genes in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 183: 5840-5847.
- Allardet-Servent, A., Michaux-Charachon, S., Jumas-Bilak, E., Karayan, L. y Ramuz, M.** 1993. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genoma. *J. Bacteriol.* 175: 7869-7874.
- Aravind, L., Tatusov, R.L., Wolf, Y.I., Walker, D.R. y Koonin E.V.** 1998. Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends Genet.* 14: 442-444.
- Arizmendi, J.M., Fresnedo, O., Martínez-Bilbao, M., Alaña, A. y Serra, J.L.** 1987. Inorganic nitrogen assimilation in the non N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. Effect of the nitrogen source on the nitrite reductase levels. *Physiol. Plant.* 70: 703-707.
- Arizmendi, J.M.** 1989. Regulación, purificación y propiedades de la nitrito reductasa de la cianobacteria *Phormidium laminosum*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- Arizmendi, J.M. y Serra, J.L.** 1990. Purification and some properties of the nitrite reductase from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1040: 237-244.
- Asada, Y., Koike, Y., Schnackenberg, J., Miyake, M., Uemura, I. y Miyakw, J.** 2000. Heterologous expression of clostridial hydrogenase in the Cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Biochim. Biophys. Acta* 1490: 269-78.
- Averhoff, B. y Friedrich, A.** 2003. Type IV pili-related natural transformation system: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* 180: 385-393.
- Baril, C., Richaud, C., Baranton, G. y Saint Girons, I.** 1989. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.* 140: 507-517.

Baudin, A., Ozier, K.O., Denouel, A., Lacroute, F. y Cullin, C. 1993. A simple efficient method for direct gene deletion in *Sacharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21: 3329-3330.

Bellissimo, D.B. y Privalle, L.S. 1995. Expression of spinach nitrite reductase in *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis of predicted active site amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.* 323: 155-163.

Bird, C. y Wyman, M. 2003. Nitrate/nitrite assimilation system of the marine picoplanktonic cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain WH 8103: effect of nitrogen source and availability on gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7009–7018.

Blanco, F., Alaña, A., Llama, M.J. y Serra, J.L. 1989. Purification and properties of the glutamine synthetase from the non N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J. Bacteriol.* 171: 1158-1165.

Blanco, F. y Serra, J.L. 1992. Purificación y algunas propiedades de la ferredoxina-nitrato reductasa de cultivos de *Phormidium laminosum* sometidos a deficiencia en nitrógeno. En *Metabolismo del Nitrógeno* (Pineda, M. y Castillo, F., Eds) (ISBN 84-86848-34-2), SEB, Córdoba, pp. 68-72.

Bordenstein, D.R. y Reznikoff, W.S. 2005. Mobile DNA in obligate intracellular bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 688-699.

Boucher, Y., Douady, C.J., Papke, R.T., Walsh, D.A., Boudreau, M.E., Nesbo, C.L., Case, R.L y Doolittle, W.F. 2003. Lateral transfer and the origins of prokaryotic groups. *Annu. Rev. Genet.* 37: 238-328.

Buxens, M., Largo, E., Sanz, B., Llama, M.J. y Serra, J.L. 2008. Adaptación de la técnica Long Flanking Homology Polymerase Chain Reaction (LFH-PCR) para la obtención de células de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 deficientes en nitrito reductasa. XXXI Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Bilbao.

Buxens, M., Largo, E., Hidalgo, A., Berenguer, J., Llama, M.J. y Serra, J.L. 2009. Supresión del gen que codifica la actividad nitrito reductasa en *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 por transformación natural. XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Oviedo.

Buxens, M., Llama, M.J. y Serra, J.L. 2010. Transferencia del gen nirA, que codifica la nitrito reductasa, de *Phormidium laminosum* a *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. X Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Benalauría, Málaga.

- Buxens, M., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 2011 Transferencia del gen *nirA* (nitrito reductasa) entre cianobacterias termófilas: de *Phormidium laminosum* a *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. En: *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: Aproximación molecular al estudio del ciclo del nitrógeno en la biosfera y sus repercusiones agronómicas y medioambientales*. (F. Castillo *et al.*, Eds), Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba, Córdoba, pp., en prensa.
- Castenholz, R.W.** 1970. Laboratory culture of thermophilic cyanophytes. *Schewiz. Z. Hydrol.* 32: 538-551.
- Chen, I y Dubnau, D.** 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 241-249.
- Chen, I., Christie, P.J. y Dubnau, D.** 2005. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* 310: 1456-1460.
- Chiaromonte, S., Giacometti, G.M. y Bergantino, E.** 1999. Construction and characterization of a functional mutant of *Synechocystis* 6803 harbouring a eukaryotic PSII-H subunit. *Eur. J. Biochem.* 260: 833-843.
- Choudhary, M., Mackenzie, C., Nereng, K.S., Sodergren, E., Weinstock, G.M. y S Kaplan.** 1994. Multiple chromosomes in bacteria: structure and function of chromosome II of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1T. *J. Bacteriol.* 176: 7694-7702.
- Curdt, I., Singh, B.B., Jakoby, M., Hachtel, W. y Böhme, H.** 2000. Identification of amino acid residues of nitrite reductase from *Anabaena* sp. PCC 7120 involved in ferredoxin binding. *Biochim. Biophys. Acta.* 1543: 60-68.
- Crane, B.R. y Getzoff, E.D.** 1996. The relationship between structure and function for the sulphite reductasas. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 6: 744-756.
- Davison, J.** 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid.* 42: 73-91.
- Deich, R.A. y Smith, H.O.** 1980. Mechanism of homospecific DNA uptake in *Haemophilus influenzae* transformation. *Mol. Gen. Genet.* 177: 369-374.
- Derbise, A., Lesic, B., Dacheux, D., Ghigo, J.M. y Carniel, E.** 2003. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 38: 113-116.

Drath, M., Kloft, N., Batschauer, A., Marin, K., Novak, J. y Forchhammer, K. 2008. Ammonia triggers photodamage of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Physiol.* 147: 206-215.

Dubnau, D. 1991 a. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 55: 395-424.

Dubnau, D. 1991 b. The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5: 11-8.

Dubnau, D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 217-244.

Dufraigne, C., Fertil, B., Lespinats, S., Giron, A. y Deschavanne P. 2005. Detection and characterization of horizontal transfers in prokaryotes using genomic signature. *Nucleic Acids Res.* 33: e6.

Espinosa, J., Forchhammer, K. y Contreras, A. 2007. Role of the *Synechococcus* PCC 7942 nitrogen regulator protein PipX in NtcA-controlled processes. *Microbiology* 153: 711-718

Fernández-Plágaro, R., Rodríguez-Fernández, C., Llama, M.J. y Serra, J.L. 2002. Purificación y caracterización de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de células deficientes en nitrógeno de la cianobacteria *Phormidium laminosum*. *En: Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: De la Biología Molecular a la Agronomía* (Aparicio, P.J., Arrese-Igor, C., G. Murúa, C., Lamsfus, C., Llama, M.J., Muñoz, A., Royuela, M. y Serra, J.L., Eds) (ISBN 97-88495-075888), Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra, Pamplona, pp. 297-305.

Flores, E. y Herrero, A. 1994. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In: Bryant DA (ed) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, pp 487-517. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Flores, E., Frías, J.E., Rubio, L.M. y Herrero, A. 2005. Photosynthetic nitrate assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 83: 117-133.

Flores, E. y Herrero, A. 2005. Nitrogen assimilation and nitrogen control in cyanobacteria. *Biochem. Soc. Transac.* 33: 164-167.

Fresnedo, O., Gómez, R. y Serra, J.L. 1991. Carotenoid composition in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. Effect of nitrogen starvation. *FEBS Lett.* 282: 300-304.

Fresnedo, O. y Serra, J.L. 1992. Effect of nitrogen starvation on the biochemistry of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *J. Phycol.* 28: 786-793.

- Frías, J.E., Flores, E. y Herrero, A.** 1997. Nitrate assimilation gene cluster from the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 179: 477-486.
- Frías, J.E., Herrero, A. y Flores, E.** 2003. Open reading frame all0601 from *Anabaena* sp. strain PCC 7120 represents a novel gene, *cnaT*, required for expression of the nitrate assimilation *nir* operon. *J. Bacteriol.* 185: 5037-5044.
- Fry, I.V., Cammack, R., Hucklesby, D.P. y Hewitt.** 1982. Kinetics of leaf nitrite reductase with methyl viologen and ferredoxina under controlled redox conditions. *Biochem. J.* 205: 235-238.
- Garbisu, C., Gil, J.M., Hall, D.O., Bazin, M.J. y Serra, J.L.** 1991 Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *J. Appl. Phycol.* 3: 221-234.
- Garbisu, C., Hall, D.O. y Serra, J.L.** 1992. Nitrate and nitrite uptake by free-living and immobilized N-starved cells of *Phormidium laminosum*. *J. Appl. Phycol.* 4: 139-148.
- Garbisu, C., Hall, D.O., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 1994. Inorganic nitrogen and phosphate removal from water by free-living and polyvinyl-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 395-401.
- García-Sánchez, M.I., Gotor, C., Jacquot, J.P., Stein, M., Suzuki, A. y Vega, J.M.** 1997. Critical residues of *Chlamydomonas reinhardtii* ferredoxin for interaction with nitrite reductase and glutamate synthase revealed by site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* 250: 364-368.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M. y Quorollo, B.** 2001. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2323-2328.
- Griffith, F.** 1928. The significance of Pneumococcal Types. *J. Hyg.* 27: 113-159.
- Grigorieva, G. y Shestakov, S.** 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC6803. *FEMS. Microbiol. Lett.* 13: 367-370.
- Guerrero, M.G., Vega, J.M. y Losada, M.** 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 169-204.
- Guerrero, M.G. y Lara, C.** 1987. Assimilation of inorganic nitrogen. En: *The Cyanobacteria*. P. Fay, C. Van Baalen (Eds), Elsevier Science Publishers. Amsterdam, pp. 163-186.

Hamilton, H.L. y Dillard, J.P. 2006. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol. Microbiol.* 59: 376-385.

Herrero, A., Flores, E. y Guerrero, M.G. 1981. Regulation of nitrate reductase levels in the cyanobacteria *Anacystis nidulans*, *Anabaena* sp. strain 7119, and *Nostoc* sp. Strain 6719. *J. Bacteriol.* 145: 175-180.

Herrero, A. y Guerrero, M.G. 1986. Regulation of nitrite reductase in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2463-2468.

Herrero, A., Muro-Pastor, A.M. y Flores, E. 2001. Nitrogen control in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183: 411-425.

Higgins, C.F. Hyde, S.C., Mimmack, M.M., Gilealdi, U., Gill, D.R. y Gallagher, M.P. 1990. Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* 22: 571-592.

Hinnebusch, J. y Tilly, K. 1993. Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol. Microbiol.* 10: 917-922.

Hucklesby, D.P., Dalling, M.J. y Hageman, R.H. 1972. Some properties of two forms of nitrite reductase from corn (*Zea mays* L.) scutellum. *Planta* 104: 220-223.

Ida, S. y Mikami, B. 1986. Spinach ferredoxin-nitrite reductase: a purification procedure and characterization of chemical properties. *Biochim. Biophys. Acta* 871: 167-176.

Imamura, S., Terashita, M., Ohnuma, M., Maruyama, S., Minoda, A., Weber, A.P., Inouye, T., Sekine, Y., Fujita, T. y Tanaka, K. 2010. Nitrate assimilatory genes and their transcriptional regulation in a unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae*: genetic evidence for nitrite reduction by a sulfite reductase-like enzyme. *Plant Cell Physiol.* 51: 707-717.

Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. y Ikeuchi, M. 2004. Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Plant Cell Physiol.* 45: 171-175.

Iwai, M., Katayama, M. y Ikeuchi, M. 2006. Absence of the psbH gene product destabilizes the Photosystem II complex and prevents association of the Photosystem II-X protein in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Photosynth. Res.* 87: 313-322.

Iwai, M., Suzuki, T., Dohmae, N., Inoue, Y. y Ikeuchi, M. 2007. Absence of the PsbZ subunit prevents association of PsbK and Ycf12 with the PSII complex in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *Plant Cell Physiol.* 48: 1758-1763.

- Jiang, F., Wisén, S., Widersten, M., Bergman, B. y Mannervik, B.** 2000. Examination of the transcription factor NtcA-binding motif by in vitro selection of DNA sequences from a random library. *J. Mol. Biol.* 301: 783-793.
- Johnsborg, O. y Håvarstein, L.S.** 2009. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 627-642.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, H., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. y Tabata, S.** 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.
- Katoh, H., Itoh, S., Shen, J.R. y Ikeuchi, M.** 2001. Functional analysis of psbV and a novel c-type cytochrome gene psbV2 of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1. *Plant Cell Physiol.* 46: 599-607.
- Kidane, D. y Graumann, P.L.** 2005. Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell* 122: 73-84.
- Kim, J.H. y Kim, B.G.** 2000. Application of LFH-PCR for the disruption of *Spo III E* and *Spo III G* of *B. subtilis*. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 5: 327-331.
- Kirilovsky, D., Roncel, M., Boussac, A., Wilson, A., Zurita, J.L., Ducruet, J.M., Bottin, H., Sugiura, M., Ortega, J.M. y Rutherford, W.** 2004. Cytochrome *c*₅₅₀ in the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. *J. Biol. Chem.* 279: 52869-52880.
- Knaff, D.B. y Hirasawa, M.** 1991. Ferredoxin-dependent chloroplast enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1056: 93-125.
- Kong, R y Xu, X.** 2002. Tree-Piece-Ligation PCR and application in disruption of chlorophyll synthesis genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Curr. Microbiol.* 44: 241-245.
- Koomey, J.M. y Falkow, S.** 1987. Cloning of the *recA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* and construction of gonococcal *recA* mutants. *J. Bacteriol.* 169: 790-795.
- Koops, J., Klomp, H. y Elgersma, R.H.C.** 1975. A rapid determination of nitrogen in milk and dairy products by colorimetric estimation of ammonia following an accelerated digestion procedure. *Neth. Milk Dairy J.* 29: 169-180.

- Koropatkin, N.M., Pakrasi, H.B. y Smith, T.J.** 2006. Atomic structure of a nitrate-binding protein crucial for photosynthetic productivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103: 9820-9825.
- Kowalczykowski, A. y Egelston, A.** 1994. Homologous pairing and DNA strand-exchange proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 991-1043.
- Kufryk, G.I., Sachet, M., Schmetterer, G. y Vermaas Wim F.J.** 2002. Transformation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a tool for genetic mapping: optimization of efficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 215-219.
- Kuwayama, H., Obara, S., Mario, T., Katoh, M., Urushihara, H. y Tanaka, Y.** 2002. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acid Res.* 30: e2.
- Lee, H.M., Flores, E., Forchhammer, K., Herrero, A. y Tandeau de Marsac, N.** 2000. Phosphorylation of the signal transducer P_{II} protein and an additional effector are required for the P_{II}-mediated regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Eur. J. Biochem.* 267: 591-600.
- Llarena, M.** 2005. Caracterización de las subunidades de unión a nucleótido del transportador ABC de nitrato/nitrito de la cianobacteria *Phormidium laminosum*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- Llarena, M., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 2006. Purification and properties of NrtC and NrtD, the ATP-binding subunits of the ABC nitrate/nitrite transporter of *Phormidium laminosum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 1819-1826.
- Lorenz, M.G. y Wackernagel, W.** 1994. Bacterial gen transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58: 563-602.
- Lorenz, M.C., Muir, R.S., Lim, E., McElver, J., Weber, S.C. y Heitman, J.** 1995. Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 158:113-7.
- Luinenburg, I. y Coleman, J.R.** 1993. Expression of *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxylase in a cyanobacterium. Functional complementation of *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Physiol.* 101: 121-126.
- Lunsford, R.D.** 1998. Streptococcal transformation: essential features and applications of a natural gene exchange system. *Plasmid* 39: 10-20.
- Luque, I., Flores, E. y Herrero, A.** 1993. Nitrite reductase gene from *Synechococcus* sp. PCC 7942. Homology between cyanobacterial and higher-plant nitrite reductases. *Plant Mol. Biol.* 21: 1201-1205.

- Luque, I., Flores, E. y Herrero, A.** 1994. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J.* 13: 2862–2869.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J.** 1997. Cyanobacteria. En: *Biology of Microorganisms*. Bozik, T. (Ed) Prentice Hall Int., Inc. New Jersey, pp. 654-658.
- Maeda, S. y Omata, T.** 2004. A novel gene (*narM*) required for expression of nitrate reductase activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC7942. *J. Bacteriol.* 186: 207–2114.
- Maeda, S. y Omata, T.** 2009. Nitrite transport activity of the ABC-type cyanate transporter of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J. Bacteriol.* 191: 3265-3272.
- Maier, B., Chen, I., Dubnau, D. y Sheetz, M.P.** 2004. DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11: 643-649.
- Manivasakam, P., Weber, S.C., Mc Elver, J. y Schiestl, R.H.** 1995. Micro-homology mediated PCR targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 23: 2799-2800.
- Manzano, J.C., Candau, P., Gómez-Moreno, C., Relimpio, A.M. y Losada, M.** 1976. Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*. *Mol. Cel. Biochem.* 10: 161-169.
- Martínez-Bilbao, M., Alaña, A., Arizmendi, J.M. y Serra, J.L.** 1987. Inorganic nitrogen assimilation in the non N₂-fixing cyanobacterium *Phormidium laminosum*. I. Cellular levels of glutamine synthetase and NADPH-dependent glutamate dehydrogenase. *Physiol. Plant.* 70: 697-702.
- Martínez-Bilbao, M., Martínez, A., Urkijo, I., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 1988. Induction, isolation and some properties of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase from the non-heterocystous cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J. Bacteriol.* 170: 4897-4902.
- Martínez, A., Llama, M.J., Alaña, A. y Serra, J.L.** 1989. Sustained photoproduction of ammonia from nitrate or nitrite by permeabilized cells of the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *J. Photochem. Photobiol.* 3: 269-279.
- Maza, S., Buxens, M., Soria, J., Gangoiti, J., Pérez-Francisco, I., Sanz, B., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 2006. Clonación, expresión y purificación de NtcA de la cianobacteria *Phormidium laminosum*. VIII Reunión Nacional del Metabolismo del Nitrógeno. Teguiise, Lanzarote, Canarias.

- McKinney, G.** 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* 140: 315-322.
- Meeks, J.C., Wycoff, K.L., Chapman, J.S. y Enderlin, C.S.** 1983. Regulation of expression of nitrate and dinitrogen assimilation by *Anabaena* species. *Appl. Environ. Microb.* 45: 1351-1359.
- Merchán, F.** 1993. Aislamiento, clonación y caracterización de un operón de genes para la asimilación de nitrato en la cianobacteria *Phormidium laminosum*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- Merchán, F., Kindle, K.L., Llama, M.J., Serra, J.L. y Fernández, E.** 1995. Cloning and sequencing of the nitrate transport system from the thermophilic filamentous cyanobacterium *Phormidium laminosum*: Comparative analysis with the homologous system from *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Mol. Biol.* 28: 759-766.
- Méndez, J.M. y Vega, J.M.** 1981. Purification and molecular properties of nitrite reductase from *Anabaena* sp 7119. *Physiol. Plant.* 52: 7-14.
- Miller, S.R. y Catenholz, R.W.** 2001. Ecological physiology of *Synechococcus* sp. Strain Sh-94-5, a naturally occurring cyanobacterium deficient in nitrate assimilation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3002-3009.
- Montesinos, M.L., Muro-Pastor, A.M., Herrero, A., y Flores, E.** 1998. Ammonium/methylammonium permeases of a cyanobacterium. Identification and analysis of three nitrogen-regulated *amt* genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* 273: 31463-31470.
- Mullis, K.B.** 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann. Biol. Clin.* 48: 579-82.
- Murphy, M.J., Siegel, L.M., Tove, S.R. y Kamin, H.** 1974. Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 612-616.
- Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C. y Florencio, F.J.** 2001. Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.* 276: 38320-38328.
- Muro-Pastor, M.I. y Florencio, F.J.** 2003. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiol. Bioch.* 41: 595-603.

- Nagore, D., Llarena, M., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 2003. Characterization of the N-terminal domain of NrtC, the ATP-binding subunit of ABC-type nitrate transporter of the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1623: 143-153.
- Nagore, D., Sanz, B., Soria, J., Llarena, M., Llama, M.J., Calvete, J.J. y Serra, J.L.** 2006. The nitrate/nitrite ABC transporter of *Phormidium laminosum*: phosphorylation state of NrtA is not involved in its substrate binding activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 172-181.
- Naithani, S., Hou, J.M. y Chitnis, P.R.** 2000. Targeted inactivation of the *psaK1*, *psaK2* and *psaK3* genes encoding subunits of Photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 63: 225-236.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Tamada, M. y Tabata, S.** 2002. Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res.* 9: 123-130.
- Nakasugi, K., Svenson, C.J. y Neilan, B.A.** 2006. The competence gene, *comF*, from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 is involved in natural transformation, phototactic motility and pilation. *Microbiology* 152: 3623-3631.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C y Fraser, C.M.** 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 27: 323-329.
- Ochoa de Alda, J.A.G., Tapia, M.I., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 1996 a. Bioenergetic processes are modified during nitrogen starvation and recovery in *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *J. Phycol.* 32: 258-265.
- Ochoa de Alda, J.A.G., Tapia, M.I., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 1996 b. Changes in photosynthetic yield, amino acids and organic acids are induced by ammonium addition to cells of *Phormidium laminosum* (Cyanophyceae). *J. Phycol.* 32: 602-608.
- Ohashi, Y., Shi, W., Takatani, N., Aichi, M., Maeda, S., Watanabe, S., Yoshikawa, H. y Omata, T.** 2011. Regulation of nitrate assimilation in cyanobacteria. *J. Exp. Bot.* 62: 1411-1424.

- Okamoto, S. y Ohmori, M.** 2002. The cyanobacterial PilT protein responsible for cell motility and transformation hydrolyzes ATP. *Plant Cell Physiol.* 43: 1127-1136.
- Omata, T., Andriesse, X. y Hirano, A.** 1993. Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport of the cyanobacterium *Synechococcus* sp PCC7942. *Mol. Gen. Genet.* 236: 193–202.
- Omata, T.** 1995. Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Cell Physiol.* 36: 207-213.
- Onai, K., Morishita, M., Kaneko, Y., Tabata, S. y Ishiura, M.** 2004. Natural transformation of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1: a simple and efficient method for gene transfer. *Mol. Genet. Genomics* 271: 50-59.
- Ostrowski, J., Wu, J.Y., Rueger, D.C., Miller, B.E., Siegel, L.M. y Kredrich, M.** 1989. Characterization of the *cysJ/H* regions of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol Chem.* 264: 15726-15737.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. y Stanier, M.H.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Rev.* 62: 1-34.
- Pardo, M.A., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 1999. Purification, properties and enhanced expression under nitrogen starvation of the NADP-isocitrate dehydrogenase from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1431: 87-96.
- Qiagen.** 2003. The Qiaexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6×His-tagged proteins.
- Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W.R., Johnson, Z.I., Land, M., Lindell, D., Post, F., Regala, W., Shah, M., Shah, S.L., Steglich, C., Sulliva, M. B., Ting, S., Tolonen, A., Webb, A., Zinser, R. y Chisholm, S.W.** 2003. Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* 424: 1042-1047.
- Rodríguez, R., Lara, C. y Guerrero, M.G.** 1992. Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Kinetic and energetic aspects. *Biochem. J.* 282: 639-643.
- Sakamoto, T., Inoue-Sakamoto, K. y Bryant, D.A.** 1999. A novel nitrate/nitrite permease in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* 181: 7363–7372.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Sánchez, U., Castillo-Cozar, M y Martínez-Jiménez, M.I.** 2007. Targeting the *Bacillus subtilis* genome: An efficient and clean method for gene disruption. *J. Microbiol. Meth.* 70: 389-394.
- Sanz, B., Gómez, S., Rodríguez-Fernández, C., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 2002. Aspectos diferenciales del transporte de nitrato y nitrito en la cianobacteria *Phormidium laminosum*. En: *Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: De la Biología Molecular a la Agronomía* (Aparicio, P.J., Arrese-Igor, C., G. Murúa, C., Lamsfus, C., Llama, M.J., Muñoz, A., Royuela, M. y Serra, J.L., Eds) (ISBN 97-88495-075888), Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra, Pamplona, pp. 97-105.
- Sanz, B.** 2003. Transporte de nitrógeno inorgánico en la cianobacteria *Phormidium laminosum*. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.
- Sato, S., Masahiko, I. y Nakamoto, H.** 2008. Expression and function of a groEL paralog in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* under heat and cold stress. *FEBS Lett.* 582: 3389-3395.
- Sazuka, T.** 2003. Proteomic analysis of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC7120 with two-dimensional gel electrophoresis and amino-terminal sequencing. *Photosynth. Res.* 78: 279-291.
- Schnell, R., Sandalova, T., Hellman, U., y Schneider, G.** 2005. Siroheme and [Fe₄-S₄] dependent NirA from *Mycobacterium tuberculosis* is a sulfite reductase with a covalent Cys-Tyr bond in the active site. *J Biol. Chem.* 280: 27319-27328.
- Schwarzenlander, C y Averhoff, B.** 2006. Characterization of DNA transport in the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *FEBS J.* 273: 4210-4218.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68: 850-858.
- Smith, H. O., Gwinn, M.L. y Salzberg, S.L.** 1999. DNA uptake signal sequences in naturally transformable bacteria. *Res. Microbiol.* 150: 603-616.
- Smoker, J.A. y Barum, S.R.** 1988. Rapid small-scale DNA isolation from filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 119-122.
- Snell, F.C. y Snell, C.T.** 1949. *Colorimetric methods of analysis*, 804 pp., Van Nostrand, New York.

Stanier, R.Y., R. Kunisawa, M. Mandel, y G. Cohen-Bazire. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*). *Bacteriol. Rev.*35: 171-205.

Stanier, R. y Cohen-Bazire, G. 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31: 225-274.

Stevens, S.E. y Porter, R.D. 1980. Transformation in *Agmenellum quadruplicatum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6052-6056.

Sugiura, M., Pappaport, F., Brettel, k., Noguchi, T., Rutherford, A.W. y Boussac. A. 2004. Site-directed mutagenesis of *Thermosynechococcus elongatus* Photosystem II: The O₂-evolving enzyme lacking the redox- active tyrosine D. *Biochemistry* 43: 13549- 13563.

Suwanto, A. y Kaplan, S. 1992. Chromosome transfer in *Rhodobacter sphaeroides*. Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.* 174: 1135-1145.

Suzuki, I., Sugiyama, T. y Omata, T. 1993. Primary structure and transcriptional regulation of the gene for nitrite reduction from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 34: 1311-1320.

Suzuki, I., Kikuchi, H., Nakanishi, S., Fujita, Y., Sugiyama, T. y Omata, T. 1995. A novel nitrite reductase gene from the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *J. Bacteriol.* 177: 6137-6143.

Swamy, U., Wang, M., Tripathy, J.N., Kim, S.K., Hirasawa, M., Knaff, D.B. y Allen, J.P. 2005. Structure of spinach nitrite reductase: implications for multi-electron reactions by the iron-sulfur: siroheme cofactor. *Biochemistry* 44: 16054-16063.

Takahama, K., Matsuoka, M. y Ogawata, T. 2003. Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the *psbAI* locus. *J Biosci. Bioeng.* 95: 302-305.

Tapia, M.I., Llama, M.J. y Serra, J.L. 1995. Active glutamine synthetase is required for ammonium- or glutamine-promoted prevention of nitrate and nitrite reduction in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Physiol. Plantarum* 94: 241-246.

Tapia, M.I., Llama, M.J. y Serra, J.L. 1996 a. Regulation of nitrate assimilation in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Planta* 198: 24-30.

- Tapia, M.I., Ochoa de Alda, J.A.G., Llama, M.J. y Serra, J.L.** 1996 b. Changes in intracellular amino acids and organic acids induced by nitrogen starvation and nitrate or ammonium resupply in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *Planta* 198: 526-531.
- Taroncher-Oldenburg, G. y Stephanopoulos, G.** 2000. Targeted, PCR-based gene disruption in cyanobacteria: inactivation of the polyhydroxyalkanoic acid synthase genes in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 677-680.
- Thomas, C.M y Nielsen, K.M.** 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 711-721.
- Tischner, R. y Schmidt, A.** 1984. Light mediated regulation of nitrate assimilation in *Synechococcus leopoliensis*. *Arch. Microbiol.* 137: 151-154.
- Vázquez-Bermúdez, M.F., Paz-Yepes, J., Herrero, A., Flores, E.** 2002. The NtcA activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Microbiology* 148: 861-869.
- Vega, J.M y Garrett, R.H.** 1975. Siroheme: a prosthetic group of the *Neurospora crassa* assimilatory nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 250: 7980-7989.
- Vega, J.M. y Kamin, H.** 1977. Spinach nitrite reductase. Purification and properties of a siroheme-containing iron-sulfur enzyme. *J. Biol. Chem.* 252: 896-909.
- Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R. y Philippsen, P.** 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Sacharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-1808.
- Wach, A.** 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* 12: 259-265.
- Wang, Q., Li, H y Post, A. F.** 2000 Nitrate assimilation genes of the marine diazotrophic, filamentous cyanobacterium *Trichodesmium* sp. strain WH9601. *J. Bacteriol.* 182: 1764-1767.
- Wendland, J.** 2003. PCR-based methods facilitates targeted gene manipulations and cloning procedures. *Curr Genet.* 44: 115-123.
- Wood, D.W., Setubal, J.C., Kaul, R., Monks, D.E., Kitajima, J.P. y Okura, V.K.** 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2323.

Woodcock, S.C., Raux, E., Levillayer, F., Thermes, C., Rambach, A. y Warren, M.J. 1998. Effect of mutations in the transmethylase and dehydrogenase/chelatase domains of sirohaem synthase (CysG) on sirohaem and cobalamin biosynthesis. *Biochem. J.* 330: 121-129.

Wu, J.Y., Siegel, L.M. y Kredich, N.M. 1991. High-level expression of *Escherichia coli* NADPH-sulfite reductase: requirement for a cloned *cysG* plasmid to overcome limiting siroheme cofactor. *J. Bacteriol.* 173: 325-33.

Yabuki, Y., Mori, E. y Tamura, G. 1985. Nitrite reductase in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Agric. Biol. Chem.* 49: 3061-3062.

Yamaoka, T., Satoh, K. y Katoh, S. 1978. Photosynthetic activities of a thermophilic blue-green alga. *Plant Cell Physiol.* 19: 943-954.

Yoo, S.H., Spalding, M.H. y Jane, J.L. 2002. Characterization of cyanobacterial glycogen isolated from the wild type and from a mutant lacking of branching enzyme. *Carbohydr Res.* 337: 2195-2203.

Yoshihara, S., Geng, X., Okamoto, S., Yura, K., Murata, T., Go, M., Ohmori, M. y Ikeuchi, M. 2001. Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 42: 63-73.

Yoshihara, S., Geng, X. y Ikeuchi, M. 2002. *pilG* gene cluster and Split *pilL* genes involved in pilus biogenesis, motility and genetic transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 43: 513-521.

Zang, X., Liu, B., Liu, S., Arunakamura, K. y Zhang, X. 2007. Optimal conditions for transformation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Microbiol.* 45: 241-245.

