



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**Esta tesis doctoral contiene un índice que enlaza a cada uno de los capítulos de la misma.**

**Existen asimismo botones de retorno al índice al principio y final de cada uno de los capítulos.**

**[Ir directamente al índice](#)**

**Para una correcta visualización del texto es necesaria la versión de [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriores**

**Aquesta tesi doctoral conté un índex que enllaça a cadascun dels capítols. Existeixen així mateix botons de retorn a l'índex al principi i final de cadascun dels capítols .**

**[Anar directament a l'índex](#)**

**Per a una correcta visualització del text és necessària la versió d' [Adobe Acrobat Reader 7.0](#) o posteriors.**

T 2006/61

**Identificación y caracterización de componentes celulares implicados en transducción de señales en *Synechococcus* sp. PCC 7942**

Trabajo presentado para optar al grado de doctor por el licenciado:

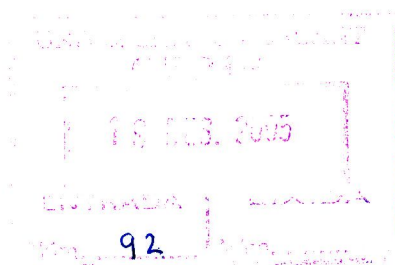
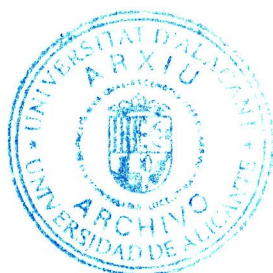
**Sergio Burillo Sanz**

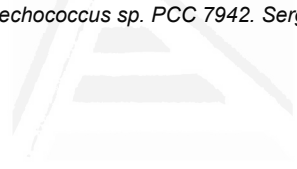
Directora:

Dra. Asunción Contreras De Vera  
Profesora Titular de Universidad

Director:

Dr. Ignacio Luque Romero  
Contratado Ramón y Cajal





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de transducción de señales de la división de genética de la Universidad de Alicante. Quiero agradecer a mis directores de tesis Asunción Contreras e Ignacio Luque su ayuda y esfuerzo en la realización de este trabajo, a Inmaculada Fuentes por su excelente apoyo técnico así como al resto de compañeros de laboratorio que durante estos años me han acompañado y ayudado.

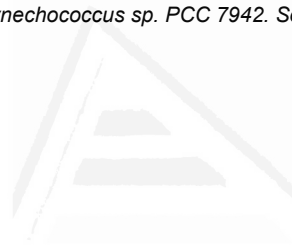
La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las siguientes becas obtenidas por el doctorando:

- Beca predoctoral para la formación de personal investigador de la Generalitat Valenciana, modalidad A. Desde Enero de 2001 hasta Diciembre de 2004.

El trabajo realizado ha sido financiado con cargo a los siguientes proyectos:

- Mecanismos moleculares implicados en la regulación del metabolismo del nitrógeno (BMC200201156). I.P.: Asunción Contreras. Ministerio de Ciencia y Tecnología. Desde 01/12/2002 hasta 01/12/2005.
- Redes de interacción en transducción de señales de nitrógeno (GV04B/525). I.P.: Asunción Contreras. Consellería de Cultura, Educación y Deporte (Generalitat Valenciana). Desde 01/01/2004 hasta 31/12/2005.
- Transducción de señales en bacterias. I.P.: Asunción Contreras. Ayuda a grupos de la Universidad de Alicante. Años: 2002 - 2005. Becado desde Octubre de 2005 hasta Diciembre de 2005.





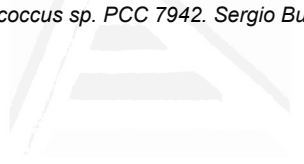
Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**ÍNDICE**

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
1.1 Cianobacterias.	4
1.1.1 Generalidades y aspectos evolutivos.	4
1.1.2 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 como sistema modelo.	6
1.2 Transducción de señales en bacterias.	6
1.3 Las proteínas PII.	7
1.3.1 Las proteínas PII en el sistema modelo de enterobacterias.	7
1.3.2 PII de cianobacterias y eucariotas.	10
1.3.3 Otras proteínas PII.	12
1.4 Papel de la proteína PII en la regulación de la asimilación del nitrógeno en <i>Synechococcus</i> .	13
1.5 Aclimatación a la ausencia de nitrógeno en <i>Synechococcus</i> .	16
1.6 Interacciones moleculares entre proteínas.	18
1.6.1 Generalidades.	18
1.6.2 El sistema del doble híbrido de levaduras.	19
1.6.3 Aproximaciones para la predicción de interacciones en base a la información genómica.	20
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Organismos y condiciones de cultivo.	26
3.1.1 <i>Escherichia coli</i> .	26
3.1.1.1 Estirpes.	26
3.1.1.2 Condiciones y medios de cultivo.	26
3.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	27
3.1.2.1 Estirpes.	27
3.1.2.2 Condiciones y medios de cultivo.	27
3.1.3 <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942.	29
3.1.3.1 Estirpes.	29
3.1.3.2 Condiciones y medios de cultivo.	29
3.1.3.3 Estimación del crecimiento de cultivos de <i>Synechococcus</i> .	31
3.2 Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos.	31
3.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	31
3.2.1.1 Preparaciones "Mini".	31
3.2.1.2 Preparaciones "Midi".	32

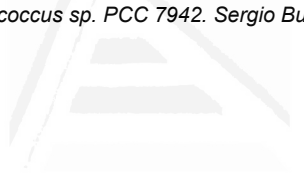


3.2.2 Recuperación de plásmidos de la genoteca a partir de DNA de levaduras.	33
3.2.3 Aislamiento de DNA total de <i>Synechococcus</i> .	34
3.2.4 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>S. cerevisiae</i> .	35
3.2.5 Digestiones con enzimas de restricción.	36
3.2.6 Digestiones parciales de DNA genómico de <i>Synechococcus</i> .	36
3.2.7 Desfosforilación de extremos 5' de moléculas de DNA.	36
3.2.8 Rellenado de extremos 5' protuberantes con Klenow.	36
3.2.9 Ligaciones.	37
3.2.9.1 Precipitación de ligaciones.	37
3.2.10 Amplificación de DNA mediante PCR.	37
3.2.11 "PCR walking".	38
3.2.12 Electroforesis de DNA.	39
3.2.13 Extracción de DNA de geles de agarosa.	40
3.2.14 Cuantificación de DNA.	40
3.2.15 Construcciones de plásmidos.	41
3.3 Métodos Genéticos.	43
3.3.1 Transformación de <i>E. coli</i> .	43
3.3.1.1 Transformación química de <i>E. coli</i> : Método del TSS.	43
3.3.1.2 Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación.	44
3.3.2 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> . Transformación química: Método del Acetato de Litio.	44
3.3.3 Transformación de <i>Synechococcus</i> .	46
3.3.4 Mutagénesis por substitución génica en <i>Synechococcus</i> .	47
3.3.5 Clonación mediante gap-repair en levaduras.	47
3.3.6 Conjugación en líquido de levaduras en placas de 96 pocillos.	48
3.3.7 Generación de genotecas genómicas de <i>Synechococcus</i> .	48
3.3.8 Escrutinio de genotecas mediante el sistema del doble híbrido en <i>S. cerevisiae</i> .	49
3.4 Actividades enzimáticas.	50
3.4.1 Cuantificación de la expresión del gen reporter <i>lacZ</i> en	



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

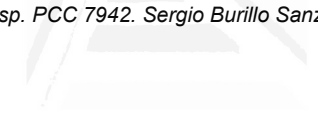
<i>S. cerevisiae</i> mediante ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa.	50
3.4.1.1 Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa en cultivos líquidos de <i>S. cerevisiae</i> .	49
3.4.1.2 Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa en biomasa de <i>S. cerevisiae</i> en medio sólido.	51
3.4.2 Cuantificación de actividad NAGK en extractos proteicos.	52
3.5 Purificación y análisis de proteínas.	53
3.5.1 Sobreexpresión y purificación de proteínas de fusión a la GST.	53
3.5.1.1 Sobreexpresión a pequeña escala para el análisis de clones.	53
3.5.1.2 Sobreexpresión a gran escala para la purificación de proteínas.	54
3.5.1.3 Purificación de proteínas de fusión a la GST.	55
3.5.2 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	55
3.5.3 Cambio de tampón de disoluciones de proteínas mediante columnas HiTrapDesalting.	57
3.5.4 Cuantificación de proteínas mediante Bradford.	57
3.5.5 Interacción entre GST:PipX y PII mediante GST pulldown.	57
3.5.5.1 Preparación de extractos totales de proteína.	57
3.5.5.2 Incubación y co-elución.	58
3.5.5.3 Inmunodetección de la interacción con PII.	58
3.5.6 Inmunodetección de proteínas de fusión a los dominios de GAL4BD en extractos totales de <i>S. cerevisiae</i> .	60
3.5.6.1 Preparación de extractos de proteínas.	60
3.5.6.2 Inmunodetección.	60
3.5.7 Tinción de proteínas.	61
3.5.7.1 Tinción de geles con azul Coomassie.	61
3.5.7.2 Tinción de membranas de PVDF con Fast Green.	62
3.6 Análisis de las secuencias de DNA y proteínas.	63
3.6.1 Identificación de ORF's en las bases de datos de	



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

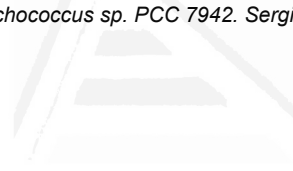
secuencias.	63
3.6.2 Alineamiento múltiple de secuencias.	63
3.6.3 Construcción de árboles filogenéticos.	63
3.6.4 Comprobación de secuencias procedentes de clonaciones o mutagénesis.	63
3.6.5 Análisis de co-evolución.	63
3.6.5.1 Obtención de las secuencias de dominios y proteínas truncadas.	63
3.6.5.2 Construcción de matrices de distancias.	64
3.6.5.3 Medida de la correlación entre dos matrices de distancias.	64
3.7 Tabla de oligonucleótidos.	65
3.8 Tabla de plásmidos.	66
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1 Interacciones doble híbrido entre componentes reguladores del metabolismo del nitrógeno en <i>Synechococcus</i> .	68
4.1.1 Diseño de proteínas de fusión y ensayos de doble híbrido.	68
4.1.2 Interacciones entre proteínas PII.	69
4.1.3 ¿Interacciona PII físicamente con las proteínas NtcA y NrtC <sup>Δ(1-272)</sup> , implicadas en la represión por amonio?	71
4.1.4 ¿Interacciona PII con la histidina quinasa NblS, implicada en la inducción de clorosis en condiciones de carencia de nitrógeno?	73
4.1.5 ¿Interaccionan las proteínas NblR y NblS, implicadas en la inducción de la clorosis en condiciones de carencia de nitrógeno, entre sí?	74
4.1.6 Resumen de interacciones doble híbrido mediadas por reguladores del nitrógeno.	75
4.2 Genotecas de expresión y su escrutinio mediante el sistema del doble híbrido con la proteína PII como cebo.	76
4.2.1 Consideraciones generales: Genotecas de expresión y fragmentación enzimática.	76
4.2.2 Construcción de genotecas de <i>Synechococcus</i> .	78
4.2.3 Escrutinio de las genotecas con el cebo PII.	82
4.2.4 Rendimiento de los escrutinios y características de los clones obtenidos.	84





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

4.2.5 Análisis doble híbrido de las presas de PII.	88
4.2.5.1 NAGK y PipX interaccionan específicamente con PII de <i>Synechococcus</i> .	88
4.2.5.2 PipX interacciona con NtcA.	90
4.2.5.3 Mutaciones en la serina 49 eliminan su interacción con NAGK pero no con PipX en el doble híbrido.	91
4.3 Características de la interacción PII – NAGK.	92
4.3.1 PII estimula la actividad NAGK en <i>Synechococcus</i> .	92
4.3.2 Evolución de ArgB y PII.	94
4.4 Caracterización preliminar de PipX	98
4.4.1 Obtención de secuencias adyacentes al gen <i>pipX</i> .	98
4.4.2 Conservación de <i>pipX</i> en cianobacterias.	101
4.4.3 Inactivación del gen <i>pipX</i> en <i>Synechococcus</i> .	101
4.4.4 Ensayos de interacción PipX-PII mediante GST-pulldown con extractos proteicos totales.	103
4.5 Análisis de la co-evolución en la interacción NblS-SipA.	106
4.6 Interacciones en la regulación del metabolismo del nitrógeno en <i>Synechococcus</i> .	108
5. CONCLUSIONES.	111
6. BIBLIOGRAFÍA.	113



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## ABREVIATURAS

3-AT	3-Amino-1, 2, 4-triazol
$A_{bbb}$ ( $DO_{bbb}$ )	Absorbancia o densidad óptica a "bbb" nm de longitud de onda
APS	Persulfato amónico
ATase	Adenilil transferasa
BCIP	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
Pb	Pares de bases (bases)
BSA	Albúmina de suero bovino
Cm	Cloranfenicol
DMF	N, N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleótidos
$DO_{bbb}$	Densidad óptica a "bbb" nm de longitud de onda
DTT	1,4-Ditio-DL-treitol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético (usado aquí como sal disódica)
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas
GAL4AD	Dominio activador de la transcripción de GAL4
GAL4BD	Dominio de unión a DNA de GAL4
GS	Glutamina sintetasa
GST	Glutación S-transferasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroetil)-1-piperacinoetanosulfónico
IAA	Alcohol isoamílico
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido
Kb	Miles de pares de bases (kilobases)
Km	Kanamicina
$\lambda$	DNA del fago lambda
$\lambda_p$	DNA del fago lambda digerido con <i>Pst</i> I
$\lambda_H$	DNA del fago lambda digerido con <i>Hind</i> III
LB	Luria – Bertani
MM	Medio mínimo
N.C.I.	Número de clones independientes

NAG	N-Acetil-L-glutamato
NAGK	N-Acetil-L-glutamato quinasa
NBT	Azul de nitrotetrazolio
ONPG	O-Nitrofenil $\beta$ -D-galactopiranosido
ORF	Pauta abierta de lectura ("Open reading frame")
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonato
POD	Peroxidasa
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RF	Pauta de lectura
SAP	Fosfatasa alcalina de gamba
SD	Medio "synthetic dropout"
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	Estreptomina
<i>Synechococcus</i> <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	
TE	Tris - EDTA
TEMED	N, N, N', N' – Tetrametiletildiamina
TGE	Tris – glucosa - EDTA
TRIS	Tris - (hidroximetil) - aminoetano
Tween-20	Polioxietilensorbitan monolaurato
U.F.C.	Unidades formadoras de colonia
UTase/UR	Uridilil transferasa
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cianobacterias

### 1.1.1 Generalidades y aspectos evolutivos

Las cianobacterias constituyen un grupo de procariotas muy diverso pero bien establecido y filogenéticamente coherente. Tienen una gran importancia ecológica ya que realizan procesos imprescindibles para el mantenimiento del equilibrio en la biosfera, como son la producción de oxígeno o la fijación de carbono y de nitrógeno. Por otra parte, tienen una gran importancia evolutiva ya que organismos filogenéticamente emparentados con ellas innovaron el proceso de la fotosíntesis oxigénica que transformó la atmósfera anóxica de la Tierra en una atmósfera aerobia. Su distribución en el planeta es tan amplia que están presentes en prácticamente todos los ambientes naturales.

Las cianobacterias son organismos fotótrofos obligados, cuyo rasgo metabólico más relevante lo constituye su capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica utilizando el agua como agente reductor, al igual que las plantas. Son autótrofos, obligados o facultativos, usando como fuente preferente de carbono el CO<sub>2</sub> atmosférico, que se asimila a través del ciclo de Calvin. Como fuente de nitrógeno, la mayoría puede asimilar nitrato, nitrito y amonio. Algunas especies, además, son fijadoras de nitrógeno asimilando así el N<sub>2</sub> atmosférico.

Son de morfología diversa, existiendo géneros unicelulares y multicelulares que generalmente forman filamentos que pueden ser ramificados. Algunas cianobacterias filamentosas sufren, en condiciones de privación de nitrógeno, un proceso de diferenciación que lleva a la formación de heterocistos, que son células especializadas en fijar N<sub>2</sub> (Wolk 1996).

La agrupación y clasificación inicial de las cianobacterias en diferentes secciones en base a características morfológicas (Castenholz et al. 1989; Rippka et al. 1979), ha sido sustituida por una clasificación filogenética basada en las secuencias del RNA ribosómico 16S (rRNA 16S) (Honda et al. 1999) en la que las cianobacterias se mantienen como un grupo estable filogenéticamente diferenciado del resto de bacterias, agrupándose los diferentes géneros en grupos filogenéticos que no siempre coinciden con la

clasificación inicial de Rippka. Por ejemplo, el género *Synechococcus* queda clasificado como un grupo polifilético (Robertson et al. 2001).

La aparición de la fotosíntesis oxigénica en la era Precámbrica, hace 2.5 millones de años, se atribuye a organismos filogenéticamente emparentados con las cianobacterias. El aparato fotosintético cianobacteriano está compuesto por dos fotosistemas. En el fotosistema II tiene lugar la fotooxidación del agua que genera  $O_2$  y poder reductor que se canaliza al fotosistema I para ser finalmente utilizado en la fijación de  $CO_2$ . De esta manera, la fotosíntesis oxigénica utiliza agua para fijar  $CO_2$ , liberando  $O_2$ , lo que supuso un cambio ecológico que influyó en la evolución posterior de la vida en la tierra (Falkowski et al. 2004). A partir de análisis filogenéticos basados en el rRNA 16S se ha podido demostrar que las cianobacterias actuales y los cloroplastos presentes en las plantas y algas eucariotas comparten un ancestro común (Giovannoni et al. 1988), lo que constituye un fuerte apoyo a la hipótesis de la generación de los cloroplastos mediante la endosimbiosis de un organismo similar a una cianobacteria en una célula hospedadora. Dicha hipótesis ha sido enunciada en diversas ocasiones, siendo su versión más temprana la de Mereschkowsky, de 1905, sobre el origen endosimbionte de las células eucarióticas. Actualmente, se reconocen dos linajes diferenciados de eucariotas fotosintéticos, uno que incluye las algas verdes y las plantas terrestres y el otro en el que se encuentran las algas rojas. Ambos linajes forman un grupo monofilético (Moreira et al. 2000), siendo las algas rojas los primeros eucariotas fotosintéticos que aparecieron (Stiller et al. 1997), y de los que derivaron las algas verdes, que posteriormente se diversificaron originando las plantas terrestres. Todas realizan una fotosíntesis oxigénica igual a la de las cianobacterias. La mayoría de las proteínas del cloroplasto están codificadas en el núcleo de la célula eucariota debido a que desde el establecimiento de la endosimbiosis se ha producido una paulatina reducción del genoma cloroplastídico, acompañada de la transferencia de material genético al núcleo, de modo que hoy día los cloroplastos codifican entre 50 y 200 proteínas (Martin 2003). La relación filogenética que existe entre cianobacterias y plantas se refleja en multitud de similitudes a nivel molecular. El ejemplo más evidente es el funcionamiento del aparato fotosintético que formado mayoritariamente en los



eucariotas por proteínas de origen cianobacteriano (Xiong et al. 2002).

### **1.1.2 *Synechococcus* sp. PCC 7942 como sistema modelo**

La cianobacteria unicelular *Synechococcus* sp. PCC 7942 es una de las estirpes modelo en los estudios de biología molecular de estos organismos. Su interés en investigación radica en su tiempo de generación relativamente corto (aproximadamente 15 horas) y en su competencia natural para ser transformada con DNA exógeno. Fue aislada en 1973 por S. V. Shestakov y fue la primera cianobacteria en la que se demostró un sistema de transformación natural, cuya eficacia ha sido, además, optimizada (Golden et al. 1984; Shestakov et al. 1970). Esta especie, pertenece a la sección I de cianobacterias según la clasificación morfológica (Castenholz & Waterbury 1989; Rippka et al. 1979), no es móvil, tiene morfología bacilar y un tamaño entre 1 y 1.2  $\mu\text{m}$ . También se le conoce con los nombres de *Anacystis nidulans* R2 (ya en desuso) y *Synechococcus elongatus*. Tiene un metabolismo fotoautótrofo obligado. El tamaño de su genoma es de 2.7 Megabases con un porcentaje G+C del 55%. La secuencia del genoma de *Synechococcus* se encuentra disponible desde el año 2004 en [www.jgi.doe.gov](http://www.jgi.doe.gov).

## **1.2 Transducción de señales en bacterias**

Las bacterias deben adaptarse a un medio cuyas condiciones ambientales pueden ser variables. Cambios en la disponibilidad de nutrientes u otros parámetros físico-químicos en el medio que rodea al organismo requieren una modificación en la fisiología celular que permita una homeostasis en el funcionamiento de la célula o la supervivencia de la misma ante determinadas condiciones.

Esta adaptación se lleva a cabo empleando sistemas de transducción de señales o sistemas de señalización celular cuya función consiste en generar una respuesta adecuada a un estímulo ambiental. En esta función tienen gran importancia las interacciones entre proteínas reguladoras. En bacterias, muchas de las rutas de transducción de señales están formadas por los denominados sistemas de dos componentes (Stock et al. 2000), formados, en su forma más básica, por una histidina quinasa sensora que se

autofosforila en un residuo conservado de histidina y un regulador de respuesta, que puede ser un regulador transcripcional o una enzima. La percepción del estímulo determina la autofosforilación de la histidina quinasa y la transferencia del grupo fosfato a un residuo conservado de aspártico presente en el regulador de respuesta, modificando su actividad. A pesar de que este es el esquema básico, se han descrito versiones en las que hay varios reguladores de respuesta (Li et al. 1995), sistemas de fosforelevo (Burbulys et al. 1991) y proteínas con características híbridas de regulador de respuesta y de sensor histidina quinasa (Ishige et al. 1994). Aunque los sistemas de dos componentes son los mejor conocidos (por su importancia histórica), hay muchos otros tipos de proteínas implicadas en la transducción de señales en bacterianas como son las quinasas de serina/treonina (Zhang 1993), las quinasas de tirosina y las fosfatasas de serina/treonina (Irmeler et al. 2001), así como otras proteínas reguladoras, como la proteína PII, que carecen de capacidad enzimática (Ninfa et al. 2005).

## 1.3 Las proteínas PII

### 1.3.1 Las proteínas PII en el sistema modelo de enterobacterias

Las enterobacterias codifican dos parálogos de PII: GlnK y GlnB. El gen *glnK* está siempre ligado al gen *amtB* que codifica para el transportador de amonio AmtB, formando un operón (Thomas et al. 2000). Ambos parálogos tienen funciones reguladoras diferentes, al menos en *E. coli* (Javelle et al. 2004; van Heeswijk et al. 1996) y *Klebsiella pneumoniae* (He et al. 1998).

Fue en enterobacterias donde primero se demostró el papel central de este tipo de proteínas en la regulación del metabolismo del nitrógeno como integradora de las señales del balance carbono/nitrógeno (C/N). Posteriormente se ha visto que están presentes, con un alto grado de conservación, en la mayoría de bacterias, archaeas, plantas y algas (Arcondeguy et al. 2001; Ninfa & Jiang 2005). Se sabe que en algunos de estos organismos PII está integrada en sistemas de regulación del

metabolismo del nitrógeno que difieren entre sí en el modo de funcionamiento y en los componentes moleculares implicados. En *E. coli*, PII forma parte del sistema *ntr* que regula la asimilación de compuestos nitrogenados.

PII es un homotrímero que une ATP y 2-oxoglutarato (Kamberov et al. 1995); puede unir 3 moléculas de ATP y 3 de 2-oxoglutarato por trímero. La unión de ambos efectores es cooperativa entre ellos, de tal manera que la unión de 2-oxoglutarato sólo se da en presencia de ATP y la unión de ATP es muy baja en ausencia de 2-oxoglutarato. La unión de 2-oxoglutarato sucede con cooperatividad negativa. La actividad de la proteína está regulada por uridilación en función del balance C/N celular. PII es uridilado y desuridilado por la enzima bifuncional UTase/UR (GlnD) en un residuo conservado de tirosina. La uridilación es estimulada por 2-oxoglutarato, como consecuencia de la unión de este efector a la propia PII (Kamberov et al. 1995), e inhibida cuando los niveles de glutamina son altos (Atkinson et al. 1994) siendo la UTase/UR el sensor del nivel de glutamina (Jiang et al. 1998). La reacción opuesta, de desuridilación, es activada por glutamina e inhibida por 2-oxoglutarato.

En enterobacterias, PII (GlnB) integra las señales provenientes de la concentración de glutamina y 2-oxoglutarato, canalizándolas al sistema *ntr*. En condiciones de baja relación C/N, donde los niveles de glutamina son altos con respecto a los de 2-oxoglutarato, la enzima UTase/UR, codificada por el gen *glnD*, une glutamina mientras que PII, por su parte, no une 2-oxoglutarato, lo que favorece la reacción de desuridilación de PII catalizada por la UTase/UR. PII en estado no modificado se une a la ATase, enzima que adenila y desadenila a la glutamina sintetasa (GS) (GlnE) estimulando su actividad adenilil-transferasa sobre la enzima GS, lo que provoca su inactivación. Además, se une también a la región C-terminal de NtrB (Jiang et al. 2000; Martínez-Argudo et al. 2002) inhibiendo la autofosforilación de esta histidina quinasa, estimulando así su actividad fosfatasa sobre el regulador de respuesta NtrC, que pasa a estar en un estado defosforilado en el que es incapaz de activar la transcripción del operón *glnALG*, que codifica para GS, NtrB y NtrC (Ninfa et al. 1986). Si por el contrario la relación C/N es alta, lo que se corresponde con altos niveles de 2-oxoglutarato con respecto a los de glutamina, la enzima UTase/UR no une glutamina mientras que PII une 2-

oxoglutarato. Ello favorece la reacción de uridilación de PII por la enzima UTase/UR. PII uridilada estimula la actividad adenilasa de la enzima ATase, lo que provoca la activación por desadenilación de la GS. Por otro lado, PII modificada no es capaz de inhibir la autofosforilación de NtrB, que acaba transfiriendo el fosfato a NtrC, el cual en estado fosforilado activa la transcripción del operón *glnALG*.

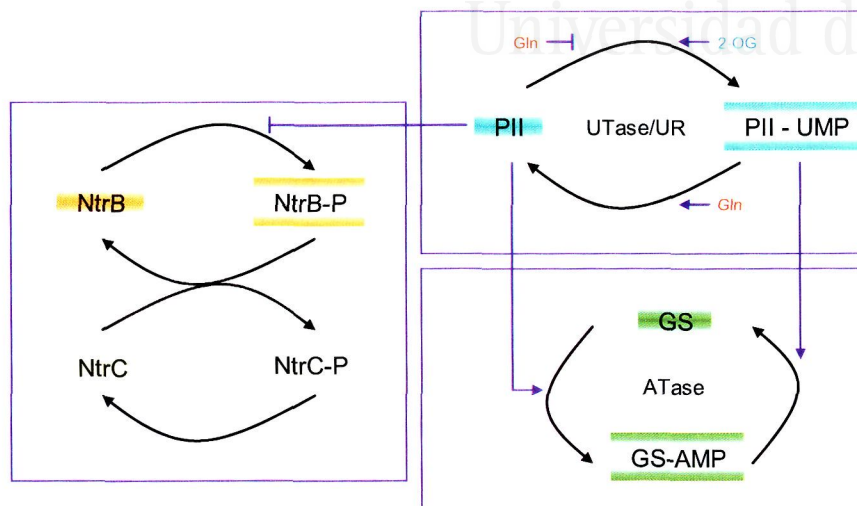


Figura 1.1 Papel regulador de la proteína PII en el sistema *ntr* de enterobacterias. Las flechas azules indican regulación positiva, las líneas cerradas azules indican regulación negativa. 2-OG es 2-oxoglutarato, Gln es glutamina. Adaptado de (Ninfa & Jiang 2005).

La otra proteína PII de *E. coli*, GlnK, tiene la función de unirse, en su estado desfosforilado al transportador de amonio AmtB provocando su inactivación (Javelle et al. 2004). El estado de uridilación de GlnK, al igual que el de GlnB depende de la concentración intracelular de glutamina.

La primera estructura tridimensional de una proteína PII que se determinó fue la de GlnB de *E. coli* (Cheah et al. 1994). La formación del trímero es similar en GlnB y GlnK de *E. coli* e intervienen fundamentalmente residuos de hojas  $\beta$  que forman el núcleo central de la proteína, quedando una estructura cuaternaria con un eje de simetría ternaria y en la que varios puentes salinos entre distintas subunidades estabilizan el trímero. En cada monómero de la proteína se distinguen tres lazos sin estructura secundaria definida. La superficie accesible está formada principalmente por el denominado "T-loop" que no participa en la oligomerización. Este lazo se puede describir como una extensión que se proyecta a modo de pata con una base, que sería el comienzo del mismo, más proximal al núcleo de la proteína. La determinación de la estructura del complejo PII-ATP (Xu et al.

2001) ha permitido establecer que el ATP se une entre los pliegues formados por los lazos B y C de diferentes monómeros. Por otra parte, la información disponible sobre las mutaciones que afectan a la unión del 2-oxoglutarato permite postular que este ligando se une en la base del "T-loop". (Jiang et al. 1997).

Las regiones más flexibles serían las principales responsables del reconocimiento e interacción con la diversidad de proteínas con que interacciona PII, y éstas son el "T-loop" y los últimos tres residuos de la zona C-terminal de cada monómero de la proteína (Xu et al. 2001). La versatilidad del "T-loop" en la interacción con los receptores de PII además se debe a que contiene el residuo tirosina 51 que se modifica por uridililación (en enterobacterias) afectando la conformación del lazo. Esta importancia del "T-loop" se ha puesto de manifiesto mediante el análisis del efecto que provocan mutaciones en esta región. Por ejemplo, cambios en el "T-loop" de GlnB de *E. coli* afectan a la interacción con las proteínas ATase, UTase/UR y NtrB (Jiang et al. 1997; Martínez-Argudo & Contreras 2002). Del mismo modo, mutaciones en la Y51 de GlnK de *E. coli* afectan a su uridilación y como consecuencia a la interacción con AmtB (Coutts et al. 2002).

Dentro del "T-loop" existe un motivo de estructura primaria conservado en bacterias, con la secuencia de aminoácidos: [L/R]YRG[S/A]EY. Tanto en GlnB como en GlnK de *E. coli* la primera posición variable está ocupada por una L, la segunda por una A y la última Y (Y51 en *E. coli*) es el residuo que se uridila. Las dos proteínas difieren entre sí sólo en 3 posiciones de las 20 que contiene el "T-loop", manteniendo ambas una estructura flexible similar en este lazo (Xu 1998 JMB), lo que concuerda con la capacidad de GlnK de reconocer los receptores de GlnB (Atkinson et al. 1999).

### 1.3.2 PII de cianobacterias y eucariotas

En cianobacterias, PII es un regulador clave en el metabolismo del nitrógeno. El mutante nulo PII de *Synechococcus* muestra menor transporte de amonio en nitrato, mayor acumulación de glucógeno en presencia de amonio y mayores niveles de actividad nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintetasa en medio suplementado con nitrato (Forchhammer et al. 1995a). Concretamente el mutante PII<sup>-</sup> tiene desregulado el transportador de

alta afinidad de bicarbonato (Hisbergues et al. 1999), el transporte de nitrato (Lee et al. 1998) y la activación de genes dependientes de NtcA en condiciones de carencia de nitrógeno (Fadi Aldehni et al. 2003; Paz-Yepes et al. 2003). Del fenotipo complejo del mutante se deduce que PII ejerce una función reguladora sobre un cierto número de funciones celulares, aunque los mecanismos moleculares implicados están aún por aclarar.

PII de *Synechococcus* comparte con PII de enterobacterias una gran similitud a niveles de secuencia y estructural. La estructura tridimensional de PII de *Synechococcus* (Xu et al. 2003) ha revelado que, como en enterobacterias tanto el "T-loop" como la región C-terminal son las regiones más flexibles. Estas regiones también puede presumirse estén implicadas en el reconocimiento de sus receptores. En la secuencia correspondiente en *Synechococcus* al motivo conservado de bacterias [L/R]YRG[S/A]EY, hay R y S, respectivamente, en las posiciones 1 y 5 (residuos 45 y 49 de la secuencia de PII *Synechococcus*), en vez de L y A presentes en enterobacterias; y hay Y, R e Y en las posiciones 2, 3 y 7, respectivamente, en *Synechococcus*. Estas tres últimas posiciones están ocupadas por residuos variables en plantas y algas, manteniéndose conservados los residuos R y S de las posiciones 1 y 5, como en cianobacterias (Hsieh et al. 1998; Jiang et al. 1997).

La proteína PII de *Synechococcus* también está sometida a regulación por modificación covalente en función de la fuente de nitrógeno. Ésta ocurre por fosforilación en la serina 49 (Forchhammer et al. 1994). En cianobacterias, el balance C/N es directamente señalizado por el 2-oxoglutarato (Muro-Pastor et al. 2001), ya que éste solo se utiliza para la incorporación del amonio en esqueletos carbonados, a diferencia de lo que ocurre en enterobacterias, donde se requiere una señal adicional, la glutamina, para "informar" a PII del exceso o carencia de nitrógeno. La fosforilación y desfosforilación de PII se lleva a cabo por dos proteínas diferentes (Irmler et al. 1997), una proteína quinasa aún por identificar y la fosfatasa PphA que se ha identificado en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Irmler & Forchhammer 2001). La unión de 2-oxoglutarato a PII de *Synechococcus*, indica carencia de nitrógeno y permite la fosforilación de la proteína (Forchhammer et al. 1995b) por una quinasa de serina de manera

dependiente de NtcA (JB Lee 1999).

PphA desfosforila a PII, actividad que está inhibida en presencia de 2-oxoglutarato (Irmeler et al. 1997) como consecuencia de la unión de éste a PII (Ruppert et al. 2002). Esta regulación por 2-oxoglutarato de las actividades quinasa y fosfatasa, el hecho de que la abundancia de PphA dependa del estado nutricional de nitrógeno (Kloft et al. 2005) y una posible regulación adicional de la quinasa de PII, hacen que el nivel de fosforilación de la proteína refleje el balance C/N, esto es, el nivel de fosforilación es máximo cuanto menor el de nitrógeno (Forchhammer & Tandeau de Marsac 1994).

En eucariotas, la proteína PII está presente sólo en algas y plantas. En algunas algas PII está codificada en el genoma cloroplastídico, mientras que en otras algas y en las plantas superiores el gen reside en el núcleo aunque la proteína ejerce su función en el cloroplasto. Este hecho sugiere que la proteína PII tiene un origen cianobacteriano. La proteína PII de eucariotas conserva el residuo de serina que se fosforila en *Synechococcus*. La serina 122 de PII de la planta *Arabidopsis thaliana* corresponde según el alineamiento de secuencias (Hsieh et al. 1998) y según el modelo de la estructura 3D (Smith et al. 2003), con la serina 49 de *Synechococcus*. En *Arabidopsis* no se ha observado ningún tipo de modificación covalente de la proteína PII, al igual que en la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* PCC 9511 (Palinska et al. 2002; Smith et al. 2004), aunque sí une 2-oxoglutarato (Smith et al. 2003) y el nivel de éste, al igual que en cianobacterias, refleja el balance C/N celular (Hodges 2002; Lancien et al. 1999; Oliveira et al. 1999). Por último, la expresión del gen *GLB1* de *Arabidopsis*, que codifica para PII, está inducida en condiciones de alto nivel C/N.

### 1.3.3 Otras proteínas PII

Las proteínas PII son prácticamente ubicuas entre las bacterias y las archaeas, con funciones reguladoras diversas (Arcondeguy et al. 2001).

GlnK de *Azotobacter vinelandii* tiene un importante papel regulador en el sistema de fijación de nitrógeno *nif*. En condiciones de suficiencia de compuestos nitrogenados, GlnK se encuentra en su estado desuridilado y se une al dominio C-terminal de NifL, induciendo la formación de un complejo inactivo NifL-NifA (Little et al. 2002; Little et al. 2000), e inhibiendo la

transcripción de los genes de fijación de nitrógeno regulados por NifA (Austin et al. 1994). Al contrario que en las interacciones entre GlnB desuridilado y sus receptores en enterobacterias, la unión de GlnK en su estado desuridilado a su receptor NifL en *A. vinelandii* requiere que GlnK tenga todos los sitios de unión para 2-oxoglutarato ocupados (Austin et al. 1994).

En bacterias Gram+ como *Streptomyces coelicolor* y *Corynebacterium glutamicum*, la modificación de PII en respuesta al nitrógeno es por adenilación (Hesketh et al. 2002; Strosser et al. 2004).

Mucho menos se sabe sobre las proteínas PII de archaeas. No obstante, en *Methanococcus maripaludis*, se han descrito dos parálogos de PII, denominadas Nifl<sub>1</sub> y Nifl<sub>2</sub>, que están implicados en la inhibición a corto plazo de la fijación de nitrógeno en presencia de amonio (Kessler et al. 2001), mediante la inhibición de la actividad de la enzima nitrogenasa cuando baja el nivel de 2-oxoglutarato (Dodsworth et al. 2005).

## **1.4 Papel de la proteína PII en la regulación de la asimilación del nitrógeno en *Synechococcus***

El nitrógeno es uno de los elementos más importantes en los organismos vivos, ya que forma parte de un elevado número de biomoléculas, incluyendo los aminoácidos que componen las proteínas y las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. Los microorganismos y las plantas son los principales contribuyentes de la incorporación de este elemento en la biosfera. En la naturaleza, el nitrógeno es un nutriente limitante en muchos ambientes, y por ello las bacterias han diseñado complejos sistemas de regulación de su asimilación en función de la disponibilidad de las diferentes fuentes de nitrógeno. Las cianobacterias, en general, pueden asimilar el nitrógeno de fuentes como el nitrógeno molecular, nitrato, nitrito, amonio y nitrógeno combinado en forma de algunos aminoácidos. Algunas cianobacterias, como las pertenecientes al género *Prochlorococcus*, en cambio, no pueden asimilar nitrato o nitrito, lo que supone que las funciones de los componentes reguladores implicados difieran también con respecto al resto de cianobacterias (García-Fernández et al. 2004).



*Synechococcus* puede asimilar el nitrógeno a partir de fuentes como el nitrato, nitrito, amonio, urea, cianato, y algunos aminoácidos. Con un metabolismo fotoautótrofo, puede usar el agua como agente reductor para asimilar los nutrientes inorgánicos. Al igual que en el resto de microorganismos, se observa una jerarquía en la preferencia de uso de las distintas fuentes de nitrógeno que se corresponde con el gasto energético asociado. Por ejemplo, el amonio es la fuente preferida de nitrógeno frente a otras. Por ello, existen sistemas de regulación que reprimen la asimilación de fuentes alternativas en presencia de amonio. A las concentraciones en que se encuentran en la naturaleza, el nitrato y el nitrito entran en la célula principalmente por transporte activo a través del sistema de transporte de nitrato Nrt de tipo ABC (ATP-binding cassette) (Luque 1994; Omata 1995). Este transportador está compuesto por 4 proteínas: NrtA, NrtB, NrtC y NrtD. El dominio C-terminal de NrtC regula el transporte de nitrato según la disponibilidad de amonio, de manera que este transporte sufre una inhibición a corto plazo en presencia de amonio (Kobayashi et al. 1997). Esta inhibición del transporte activo de nitrato requiere de la presencia de la proteína PII (Lee et al. 1998). En presencia de amonio, PII se encuentra defosforilada (Forchhammer & Tandeau de Marsac 1994), estado en el que induce la inhibición a corto plazo del transporte mediante un mecanismo cuyo detalle se desconoce (Lee et al. 2000). El nitrato y el nitrito son reducidos a amonio por las enzimas nitrato reductasa (NR) y nitrito reductasa (NiR), codificadas por los genes *narB* y *nirA*, respectivamente.

*Synechococcus* incorpora el amonio del medio a través de la permeasa Amt1 (Vazquez-Bermudez et al. 2002b). Este transporte está inhibido por el propio amonio (Boussiba et al. 1984) y aunque en el mutante PII aparece alterada la regulación de este transporte (Forchhammer & Tandeau de Marsac 1995a), no se sabe si PII regula la actividad de Amt1. El amonio incorporado por la reducción del nitrato y nitrito o a través del transporte de amonio se incorpora en forma de glutamato y glutamina mediante el ciclo GS/GOGAT, y estos aminoácidos actúan de donadores de nitrógeno para el resto del metabolismo celular. En este ciclo participa la enzima glutamina sintetasa (GS) codificada por el gen *glnA*. En *Synechocystis* sp. PCC 6803 esta enzima está sometida a regulación

posttraduccional por interacción proteína – proteína. La regulación es llevada a cabo por dos péptidos inhibidores, IF7 e IF17 codificados por los genes *gifA* y *gifB*, que se acumulan en presencia de amonio (García-Domínguez et al. 1999). Cada molécula de amonio consume una molécula de 2-oxoglutarato como esqueleto carbonado, y éste actúa como señalizador del estado nutricional de nitrógeno (Muro-Pastor et al. 2001). Esto es debido a que el ciclo de Krebs en las cianobacterias se encuentra incompleto por la ausencia de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa, lo que implica que la única función del 2-oxoglutarato es la incorporación de amonio a través del ciclo GS/GOGAT.

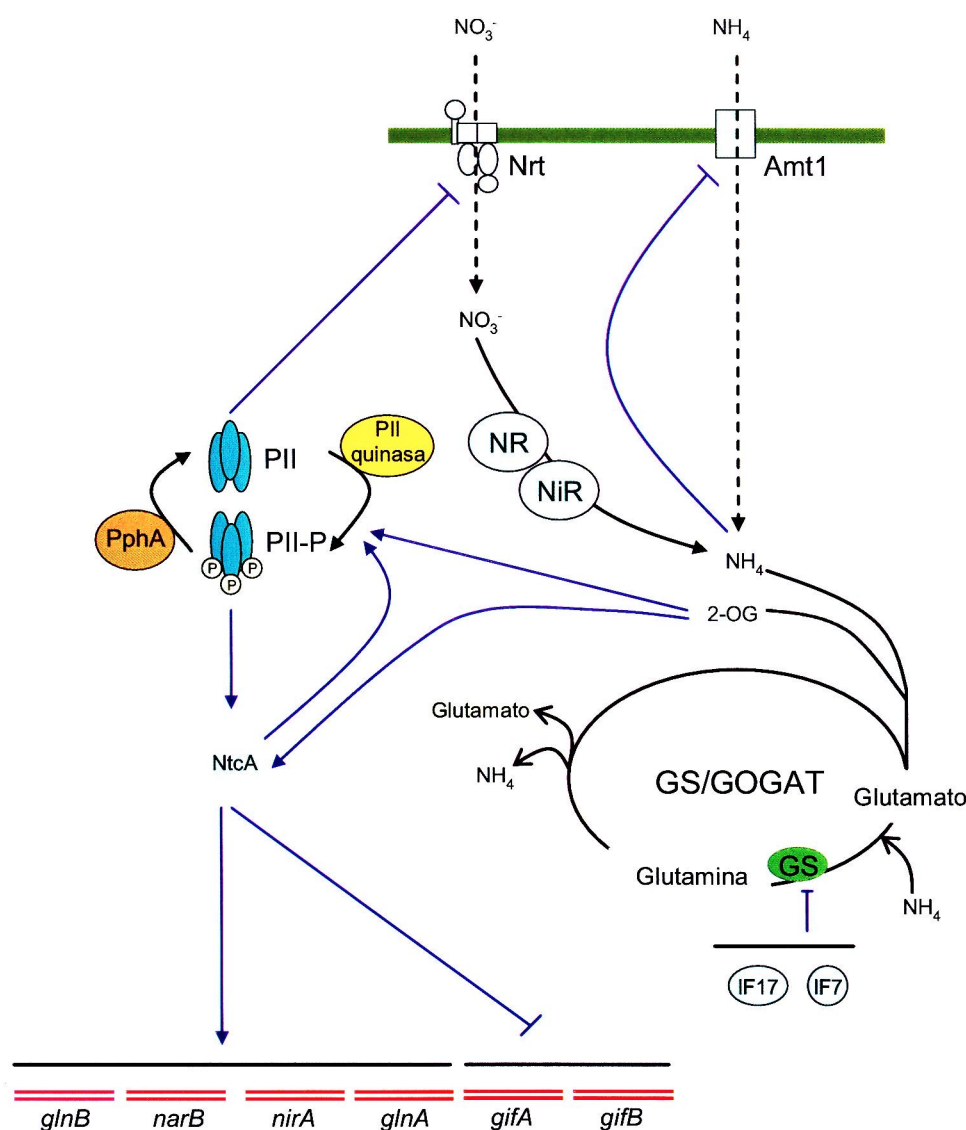


Figura 1.2. Regulación de la asimilación de nitrógeno en *Synechococcus*. La función de *gifA*, *gifB*, IF7 e IF17 ha sido demostrada solo en *Synechocystis*. Las flechas azules representan activación y las líneas cerradas azules inhibición.

En cianobacterias, el control transcripcional de la asimilación del nitrógeno se lleva a cabo por la proteína NtcA (Vega-Palás et al. 1992; Vega-Palás et al. 1990), al contrario que en enterobacterias donde éste es realizado por el sistema *ntr*. En *Synechococcus*, los genes *nirA*, *nirB*, *nrtABCD*, *glnA* y *amt1*, reprimibles por amonio, son activados por NtcA (Luque et al. 1994; Vázquez-Bermúdez et al. 2002b). Por el contrario, los genes *gifA* y *gifB* son reprimidos por NtcA en ausencia de amonio (García-Domínguez et al. 2000). Además, NtcA activa la transcripción del gen *glnB* en ausencia de amonio (Lee et al. 1999), aunque éste se expresa constitutivamente a partir de un promotor no regulado. Los productos de todos estos genes están implicados en la asimilación de las diferentes fuentes de nitrógeno, de manera que NtcA actúa como un regulador global del nitrógeno.

La actividad de NtcA es dependiente de 2-oxogutarato y también de PII (Fadi Aldehni et al. 2003; Paz-Yepes et al. 2003). Se ha descrito que la unión de 2-oxoglutarato a NtcA favorece la unión de éste a los promotores que regula (Vázquez-Bermúdez et al. 2002a) y también la iniciación de la transcripción *in vitro* (Tanigawa et al. 2002). Se desconoce por el momento el mecanismo por el cual PII estimula la actividad de NtcA en condiciones de deficiencia de nitrógeno.

## **1.5 Aclimatación a la ausencia de nitrógeno en *Synechococcus***

La energía incorporada mediante la fotosíntesis es empleada en la asimilación de nutrientes. Con el fin de adecuar la composición y funcionamiento del aparato fotosintético a la carencia nutricional, las cianobacterias poseen complejos sistemas de regulación, de los que se conoce la función de algunos de sus componentes (Schwarz et al. 2005).

Mediante la degradación total o parcial de los ficobilisomas, que son los centros de almacenamiento de energía luminosa (Grossman et al. 1993b), las cianobacterias se adaptan a diferentes condiciones de luz y a la carencia de determinados nutrientes (Grossman et al. 1993a). Un caso extremo de esta adaptación es la clorosis o blanqueamiento por degradación de los

ficobilisomas, inducida en organismos no diazotrofos como *Synechococcus* ante la carencia de fuente de nitrógeno (Collier et al. 1992). Han sido identificados varios genes implicados en el proceso de clorosis. Estos genes, cuya inactivación provoca un fenotipo de “non-bleaching”, o no clorótico, se han incluido en el sistema de regulación denominado *nbl*. El gen *nblA* codifica una proteína de 59 aminoácidos, esencial para el proceso de clorosis (Collier et al. 1994). En respuesta a condiciones de carencia de nitrógeno, los activadores transcripcionales NtcA y NblR inducen rápida y fuertemente la expresión de *nblA* (Luque et al. 2001).

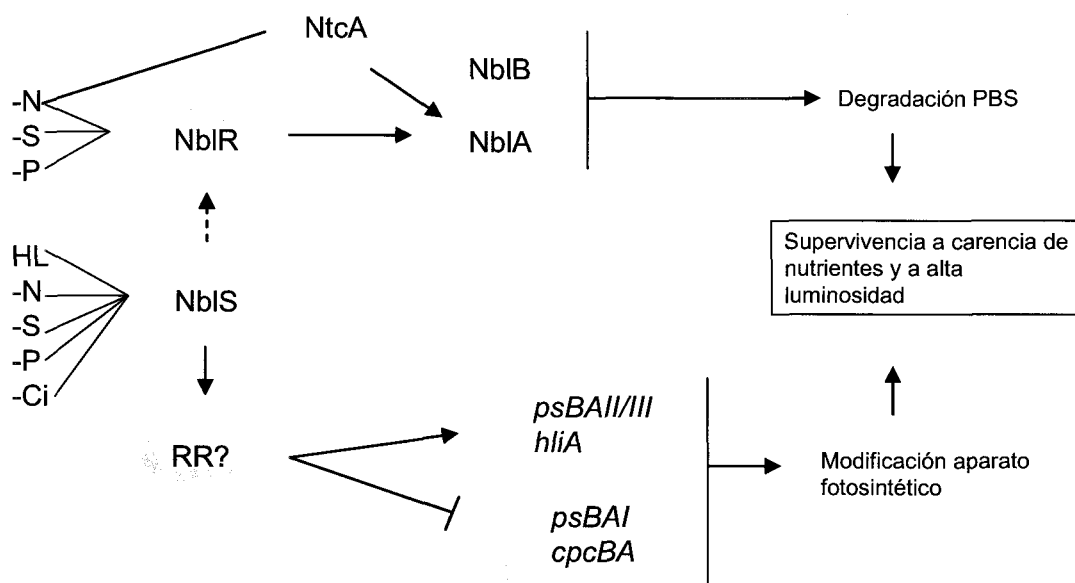


Figura 1.3. Respuesta a diversos factores de stress en *Synechococcus*. Las proteínas implicadas se indican con un contorno redondeado y los genes se muestran enmarcados. Las flechas que apuntan hacia los genes indican regulación positiva y las líneas cerradas, regulación negativa. La flecha discontinua indica una posible conexión directa no demostrada. N, representa nitrógeno, S azufre, P fósforo, Ci carbono inorgánico y HL alta luminosidad. Adaptado a partir de (Grossman et al. 2001) y de (Schwarz & Forchhammer 2005).

Otra proteína esencial de expresión constitutiva, es la codificada por el gen *nblB* (Dolganov et al. 1999), y participa junto con NblA en la degradación de los ficobilisomas. La función probable de esta proteína es eliminar los cromóforos permitiendo su degradación dependiente de NblA (Dolganov & Grossman 1999). NblR, es un regulador de respuesta homólogo a OmpR, implicado en la aparición de clorosis en respuesta a la carencia de nitrógeno, azufre y fósforo y a la alta intensidad luminosa (Schwarz et al. 1998). La

putativa histidina quinasa NbIS (van Waasbergen et al. 2002) es una proteína de membrana homóloga a componentes sensores de sistemas de dos componentes. Está implicada en la regulación del gen *nbIA*, de genes que codifican para componentes del aparato fotosintético y ficobilisomas, y en la inducción del gen *hliA* en respuesta a condiciones de alta luz.

El mutante nulo *nbIR* (Schwarz & Grossman 1998) y un mutante puntual de pérdida de función *nbIS* (van Waasbergen et al. 2002) tienen fenotipos similares, pero, aún así, no se tienen evidencias de que NbIS y NbIR formen una pareja histidina quinasa - regulador de respuesta del mismo sistema de dos componentes. Estas dos proteínas parecen tener una función compleja, percibiendo e integrando señales de carencia de diferentes nutrientes e intensidad de luz con el fin de mantener una homeostasis entre la producción de energía por el aparato fotosintético y el metabolismo celular. En la figura 1.3 se esquematizan las interacciones conocidas o propuestas entre señales de estrés, reguladores de *Synechococcus* y funciones afectadas en el proceso de clorosis.

## 1.6 Interacciones moleculares entre proteínas

### 1.6.1 Generalidades

La mayoría de los procesos biológicos implican interacciones físicas entre proteínas. Mediante estas interacciones se forman complejos estables compuestos de varias subunidades que pueden tener fines estructurales, metabólicos o reguladores. Por otra parte, también ocurren interacciones transitorias que generalmente van asociadas a una función reguladora. La interacción entre proteínas suele desembocar en la modificación de algunas propiedades de las proteínas que intervienen, lo que puede tener un efecto importante en la fisiología celular. Debido a la información que aporta el conocimiento de las interacciones proteína – proteína sobre la función de los genes y el mecanismo molecular de procesos celulares, se han desarrollado diversas metodologías para la identificación de éstas (Golemis 2002; Phizicky et al. 1995). Entre ellas destacan los sistemas del doble híbrido que son ensayos genéticos *in vivo* basados en la transcripción.

## 1.6.2 El sistema del doble híbrido de levaduras

El sistema del doble híbrido de levaduras se fundamenta en la naturaleza modular de los activadores transcripcionales eucarióticos, que en su mayoría se pueden separar en dos módulos funcionales. Por ejemplo, la proteína GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* (Ma et al. 1988) se compone de un dominio de unión al DNA, GAL4BD, y otro con función activadora de la transcripción, GAL4AD. Uno de los modelos de sistema de doble híbrido se basa en la construcción de proteínas de fusión con los dominios GAL4AD y GAL4BD. Si en una célula de *Saccharomyces* están presentes dos proteínas fusionadas respectivamente al dominio GAL4BD y al dominio GAL4AD, la interacción entre ambas reconstituirá la funcionalidad de GAL4 y se activará la expresión de los genes regulados por GAL4 (Fields et al. 1989) (figura 1.4). Se han generado estirpes de *Saccharomyces* portadoras de genes testigo regulados por GAL4, en las que se puede ensayar la interacción entre dos proteínas mediante la construcción de fusiones a los dominios de GAL4.

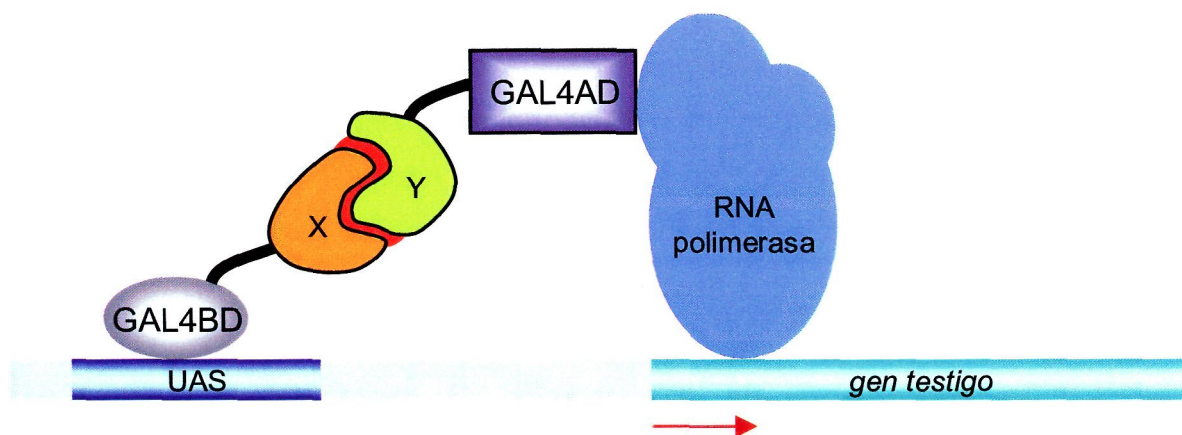


Figura 1.4. El sistema del doble híbrido GAL4. X e Y representan las proteínas para las cuales se ensaya la interacción. La flecha roja indica activación de la transcripción del gen testigo. UAS (upstream activation sequence) es una secuencia de DNA de unión específica de GAL4BD.

A partir de este modelo básico se han desarrollado modificaciones, entre ellas, variaciones en los dominios de unión a DNA, como el uso de la proteína bacteriana LexA (Brent et al. 1997) y optimizaciones de los sistemas para detección de interacciones particulares y para la estimación de la magnitud de la interacción en base a la cuantificación de la activación de

cada uno los genes testigo (Estojak et al. 1995).

Una de las utilidades del doble híbrido es la de identificar proteínas que interaccionan con una proteína “cebo” de interés. Consiste en un procedimiento en el que se buscan todas las proteínas expresadas a partir de una genoteca que interaccionan con la proteína “cebo” mediante el escrutinio de la genoteca en el doble híbrido (Chien et al. 1991; James et al. 1996; Salinas et al. 2003). La genoteca está formada por fusiones traduccionales al dominio GAL4AD en los plásmidos adecuados. La proteína cebo o proteína de fusión a GAL4BD se expresa junto con cada una de las proteínas de la genoteca. En los clones que expresen los genes testigo estará presente la proteína que se denomina “presa” que es una proteína de fusión a GAL4AD que interacciona con la proteína “cebo”.

### **1.6.3 Aproximaciones para la predicción de interacciones en base a la información genómica**

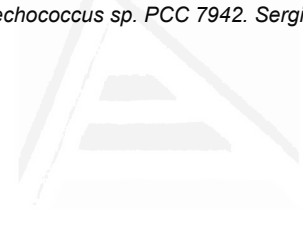
Las proteínas ortólogas que interaccionan entre sí en diferentes organismos forman un grupo de interólogos (Walhout et al. 2000). Por lo tanto, conocida una interacción en un organismo, a partir de los perfiles filogenéticos, que indican la presencia de ortólogos para una determinada proteína en distintos organismos (Pellegrini et al. 1999) se puede obtener un indicio de la conservación de la interacción. Además, la conservación del ligamiento entre parejas de genes ortólogos, especialmente si forman parte de operones, en diferentes especies puede sugerir interacción (Huynen et al. 2000).

La conservación de la interacción de dos proteínas restringe su evolución ya que bien deben mantenerse invariables los residuos importantes para la interacción, o tienen que producirse cambios recíprocos que contribuyen a mantenerla. Es decir, un cambio en un residuo de una proteína se corresponde con un determinado cambio en una posición de la otra (Bickel et al. 2002; Sprinzak et al. 2001). Este fenómeno se denomina co-evolución y puede manifestarse en que ambas proteínas muestran árboles filogenéticos similares. La restricción de las posibilidades de cambio o de mutación para ambas proteínas hace que muestren una evolución similar en el período en el que se da la interacción (Goh et al. 2000; Pollock et al. 1999; Ramani et al.

2003).

Por lo tanto, los perfiles filogenéticos, la estructura o contexto genómico, la secuencia de aminoácidos y los parámetros evolutivos de las proteínas junto con otra información específica pueden permitir la predicción de interacciones. De esta manera, se puede inferir en qué organismos se conservará una determinada interacción o predecir nuevas interacciones que apoyen datos experimentales o que serán verificadas en un contexto experimental.





Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 2. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo de investigación ha sido contribuir a la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en transducción de señales de nitrógeno en cianobacterias. Los objetivos que nos hemos planteado son los siguientes:

1. Investigar la utilidad del sistema del doble híbrido de levaduras para poner de manifiesto posibles interacciones físicas entre proteínas implicadas en transducción de señales de nitrógeno en cianobacterias.

2. Construir genotecas doble híbrido de *Synechococcus* sp. PCC 7942 suficientemente complejas de utilidad en este trabajo.

3. Identificar clones (presas) que interaccionan con la proteína PII (cebo).

4. Validar las interacciones identificadas en los escrutinios mediante análisis doble híbrido adicionales.

5. Caracterizar las interacciones validadas: interacciones de PII con NAGK y PipX.

6. Explorar la conservación evolutiva de interacciones noveles identificadas a partir de las genotecas construidas en este trabajo: PII-NAGK, PII-PipX y NbIS-SipA.

7. Contribuir a la construcción de un interactoma del nitrógeno que conecte a proteínas de interés en base a su capacidad de interaccionar entre sí.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Organismos y condiciones de cultivo

#### 3.1.1 *Escherichia coli*

##### 3.1.1.1 ESTIRPES

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 $\alpha$	<i>supE44 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) recA1 gyrA96 endA1 thi-1 relA1 <math>\Delta</math>(<i>lacZYA-argF</i>)U169 (<math>\Delta</math>80<i>lacZ</i> <math>\Delta</math>M 15)</i>	(Hanahan 1985)
HB101	<i>F<sup>-</sup> thi-1 hsdS20 (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) recA13 ara-14 leuB6 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 (str<sup>r</sup>) xyl-5 mtl-1 supE44</i>	(Raleigh et al. 1986)
GM119	<i>F<sup>-</sup> dam-3 dcm-6 metB1 lacY1 galK2 galT22 tonA31 tsx-78 supE44 mtl-1 thi-1</i>	(Marinus 1973)

Tabla 3.1. Estirpes de *E. coli* empleadas en este trabajo

Para propósitos generales de clonación y manipulación del DNA y para sobreexpresión de proteínas se empleaba la estirpe DH5 $\alpha$ . HB101 posee la mutación *leuB6* que le confiere auxotrofia a leucina y se empleaba para aislar el plásmido pGAD424 el cual posee el gen *LEU2* que complementa dicha mutación. La estirpe GM119 se empleaba para obtener DNA plasmídico no metilado, ya que carece de las metilasas Dam y Dcm.

##### 3.1.1.2 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Para la preparación de medios selectivos para el crecimiento de determinadas estirpes de *E. coli* se usaban los antibióticos ampicilina a concentración 75  $\mu$ g/ml y kanamicina a 40  $\mu$ g/ml.

#### Cultivo en medio Luria – Bertani (LB)

El medio LB se preparaba con la siguiente composición:

✓ Triptona	5 g/l
✓ NaCl	5 g/l
✓ Extracto de levadura	10 g/l

En el caso del medio sólido, se le añadía agar bacteriológico a una concentración de 10 g/l.

### Cultivo en Medio Mínimo sólido en ausencia de leucina

Se empleaba este medio (Maloy 1990) para la selección de clones de HB101 que contienen el plásmido pGAD424 y sus derivados.

Compuesto	Concentración Final
Prolina	0.23 g/l
Tiamina	0.018 g/l
Solución E (50X)	1x
Glucosa	2 g/l
Agar	7.5 g/l

Tabla 3.2. Composición del Medio mínimo sólido empleado

#### Solución Stock E 50X (500 ml):

✓ MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 g
✓ Ácido cítrico·H <sub>2</sub> O	100 g
✓ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	655 g
✓ NaNH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	175 g

### 3.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.1.2.1 ESTIRPES

Estirpe	Genotipo	Referencia
PJ696	MAT $\alpha$ <i>trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 gal80 CYH2R CAN1R GAL2-ADE2 LYS2::UASGAL1-HIS3 met2::UASGAL7-lacZ</i>	(James et al. 1996)
Y187	MAT $\alpha$ <i>ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112 gal4<math>\Delta</math> mef gal80<math>\Delta</math> URA::UASGAL1-TATAGAL1-lacZ</i>	(Harper et al. 1993)

Tabla 3.3. Estirpes de *S. cerevisiae* empleadas

#### 3.1.2.2 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Las levaduras se cultivaban en los medios YPD e YNB.

#### Cultivo en medio YPD

YPD es un medio rico para el crecimiento de *S. cerevisiae*. La composición del medio es la siguiente:

- ✓ 20 g/l Triptona

- ✓ 10 g/l Extracto de levadura
- ✓ 20 g/l Agar (solo para el medio sólido)

### Cultivo en medio YNB

YNB (Yeast Nitrogen Base) es un medio SD (Synthetic Dropout) o medio mínimo suplementado con todos los aminoácidos excepto para el o los que se selecciona la prototrofia.

El suplemento Dropout contenía los aminoácidos: isoleucina, valina, arginina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, tirosina y ácido aspártico, y el nucleótido uracilo. Los aminoácidos leucina, triptófano e histidina y la adenina se añadían, en los casos necesarios, a partir de soluciones stock.

### Medio YNB

- ✓ 1.7 g/l Yeast Nitrogen Base
- ✓ 5 g/l Sulfato amónico
- ✓ 20 g/l D(+) Glucosa
- ✓ 0.62 g/l Suplemento DO
- ✓ 20 g/l Agar (sólo para medio sólido)

### Suplementos

Concentraciones finales en el medio:

- ✓ Leucina 0.1 g/l
- ✓ Triptófano 0.02 g/l
- ✓ Adenina 0.02 g/l
- ✓ Histidina 0.02 g/l
- ✓ Isoleucina 0.03 g/l
- ✓ Valina 0.15 g/l
- ✓ Arginina 0.02 g/l
- ✓ Lisina 0.03 g/l
- ✓ Metionina 0.02 g/l
- ✓ Fenilalanina 0.05 g/l
- ✓ Treonina 0.2 g/l
- ✓ Tirosina 0.03 g/l
- ✓ Uracilo 0.02 g/l

✓ Ácido aspártico

0.05 g/l

**Medios selectivos para la expresión de los genes *LEU2* y/o *TRP1***

Para el crecimiento de clones portadores del plásmido pGAD424 se empleaban medios carentes de leucina. Para el crecimiento de clones portadores del plásmido pGBT9, se empleaban medios carentes de triptófano. Se usaban medios carentes de ambos aminoácidos en el caso del crecimiento selectivo de clones portadores de los dos plásmidos.

**Medios selectivos para la expresión de los genes *HIS3* y/o *ADE2***

Para el crecimiento de estirpes en las que se expresa el gen testigo *HIS3* en clones transconjugantes se empleaba el medio YNB sin Histidina, y con 3-AT en un rango de concentración de 50 $\mu$ M a 5mM en clones transformantes. Para el crecimiento de estirpes en las que se expresa el gen testigo *ADE2*, se usaba el medio YNB sin adenina.

**3.1.3 *Synechococcus* sp. PCC 7942****3.1.3.1 ESTIRPES**

Estirpe	Características	Fuente o Referencia(s)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942		(Kuhlemeier et al. 1983) Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
MP2	Derivado de <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942. <i>glnB::Km</i>	(Forchhammer et al. 1995; Lee et al. 2000)
MP2A	Derivado de MP2. Km <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup> . GlnB <sup>S49A</sup>	(Lee et al. 2000)
CS37	<i>ntcA::Cm</i>	(Vega-Palas et al. 1992)

Tabla 3.4. Estirpes de *Synechococcus* empleadas**3.1.3.2 CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO**

Las estirpes de *Synechococcus* se cultivaban en medio BG11 (Rippka 1988), BG11<sub>0</sub> (de igual composición que el medio BG11 pero sin añadir nitrato, carece de fuente de nitrógeno), o BG11<sub>A</sub> (BG11<sub>0</sub> con NH<sub>4</sub>Cl a una concentración final de 5mM). Se usaban los antibióticos a las concentraciones indicadas para el cultivo selectivo de las correspondientes estirpes resistentes.



<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración en el medio</b>
Ampicilina (Ap)	50 - 75 µg/ml
Kanamicina (Km)	10 µg/ml
Streptomycin (Sm)	2 µg/ml
Cloramfenicol (Cm)	7 µg/ml

Tabla 3.5. Antibióticos empleados en los cultivos de *Synechococcus*

Para preparar 1l de medio BG11<sub>0</sub> se añadían 10 ml del concentrado de sales 100x, 1 ml del concentrado de metales traza 1000x y 1 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2M. El medio BG11 se preparaba como el BG11<sub>0</sub>, añadiendo NaNO<sub>3</sub> a una concentración final de 7.5mM y el BG11<sub>A</sub>, añadiendo, tras ser autoclavado, NH<sub>4</sub>Cl y HEPES estériles a unas concentraciones finales de 5mM y 2.5mM, respectivamente.

Cuando se iban a gasear los cultivos con CO<sub>2</sub>, se añadía NaHCO<sub>3</sub> a una concentración final de 12mM.

### Composición de las soluciones

#### Concentrado de sales 100X

✓ Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3.92 g/l
✓ MgSO <sub>4</sub>	7.4 g/l
✓ CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3.53 g/l
✓ Acido Cítrico	0.83 g/l
✓ Citrato Férrico Amónico	0.6 g/l
✓ Na <sub>2</sub> EDTA	0.09 g/l

#### Concentrado de metales traza 1000x

✓ H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	2.86 g/l
✓ MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81 g/l
✓ ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22 g/l
✓ Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.39 g/l
✓ CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079 g/l
✓ CoCl <sub>2</sub>	0.047 g/l

Los cultivos se incubaban en un baño de agua termostaticado a 30°C, con

iluminación por luz blanca fluorescente. Se empleaban tubos con un volumen entre 20 y 80 ml de cultivo que se gaseaban con aire estéril sólo o suplementado con CO<sub>2</sub> al 1%.

Para el mantenimiento de las estirpes en medio líquido se cultivaban en matraces en un incubador termostatzado a 30°C, con iluminación por luz blanca fluorescente y agitación orbital a una velocidad de alrededor de 150 r.p.m.

### 3.1.3.3 ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CULTIVOS DE *Synechococcus*

Se utilizaban dos métodos para la estimación del crecimiento de un cultivo, la cuantificación de la clorofila y la medida de absorbancia a 750 nm.

#### **Cuantificación de la concentración de clorofila en los cultivos**

Se tomaban 100 µl de cultivo en un tubo eppendorf a los que se añadía 1 ml de metanol. Tras ello, se agitaba en vórtex durante aproximadamente un minuto y se centrifugaba a 13000 r.p.m. durante 4 minutos a temperatura ambiente. Se tomaba el sobrenadante y se pasaba a una cubeta de espectrofotómetro donde se medía la A<sub>665</sub>. La concentración de clorofila del cultivo se calculaba empleando la siguiente fórmula: [Clorofila] (µg/ml) = A<sub>665</sub> x 13.43 x 11.

## **3.2 Aislamiento y análisis de ácidos nucleicos**

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

Para la obtención de pequeñas cantidades de plásmidos se realizaban minipreparaciones y para mayores cantidades midipreparaciones, según el procedimiento que se describe a continuación.

#### **3.2.1.1 PREPARACIONES "MINI"**

Se cultivaba el clon de *E. coli* portador del plásmido a extraer en un volumen entre 1.5 y 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, a 37°C en agitación orbital a 220 r.p.m. durante toda la noche. Se recogían las células del cultivo mediante centrifugación a temperatura ambiente durante 1 minuto a 13000 r.p.m. y se eliminaba el sobrenadante. El

precipitado celular se resuspendía en 200  $\mu$ l de TGE, tras lo que se dejaba incubando 1 minuto en hielo. Se le añadían 400  $\mu$ l de SDS 1% / NaOH 0.1M y 300  $\mu$ l de acetato potásico 3M, mezclando suavemente tras añadir cada solución e incubando durante 1 minuto en hielo. Tras la incubación, se centrifugaba durante 10 minutos a 13000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se tomaba el sobrenadante y se le añadía fenol:CH<sub>3</sub>Cl:IAA (25:24:1) en una proporción 1:1 y se mezclaba bien mediante agitación en vórtex. Se tomaba la fase acuosa superior a la que se le añadía CH<sub>3</sub>Cl:IAA (24:1) y se centrifugaba durante 5 minutos a 6000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se tomaba la fase acuosa superior a la que se le añadían 5  $\mu$ l de glucógeno 20 mg/ml tras lo que se mezclaba en vórtex. Se añadía etanol absoluto frío en una proporción 2:1 en volumen y se centrifugaba durante 10 minutos a 13000 r.p.m. a temperatura ambiente. Tras eliminar el sobrenadante, se le añadía al precipitado 1 ml de etanol al 70% y se centrifugaba la mezcla durante 1 minuto a 13000 r.p.m. Finalmente, se eliminaba el sobrenadante, se secaba el pellet y se resuspendía éste a 37°C durante 30 minutos en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 1  $\mu$ l de RNasa (10 mg/ml).

### 3.2.1.2 PREPARACIONES "MIDI"

Se cultivaba el clon de *E. coli* portador del plásmido a extraer en un volumen de 100 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, a 37°C C en agitación orbital a 220 r.p.m. durante toda la noche. Se recogían las células del cultivo mediante centrifugación a 4°C durante 5 minutos a 7300 x g y se eliminaba el sobrenadante. El precipitado celular de células se resuspendía en 10 ml de TE y se centrifugaba a 7300 x g durante 5 minutos a 4°C. Se resuspendía de nuevo el pellet en 1.5 ml de TGE, tras lo que se dejaba incubando 1 minuto en hielo. Se le añadían 3 ml de SDS 1% / NaOH 0.1M y 2.3 ml de acetato potásico 3M, mezclando suavemente tras añadir cada solución e incubando durante 1 minuto en hielo. Tras la incubación, se centrifugaba durante 10 minutos a 7300 x g a 4°C. Se tomaba el sobrenadante, se le añadía fenol:CH<sub>3</sub>Cl:IAA (25:24:1) en una proporción 1:1 y se mezclaba bien mediante agitación en vórtex. Se tomaba la fase acuosa superior, se añadía CH<sub>3</sub>Cl:IAA (24:1) y se centrifugaba durante 5 minutos a 3000 x g y a temperatura

ambiente. Se tomaba de nuevo la fase acuosa superior a la que se le añadía isopropanol 100% en una proporción en volumen 1:1, mezclando en vórtex, tras lo que se incubaba en hielo durante 10 minutos. Se centrifugaba a 8000 r.p.m. durante otros 10 minutos a 4°C, se eliminaba el sobrenadante y se dejaba secar el pellet al que se le añadía 1 ml de etanol absoluto frío y se centrifugaba a 8000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, se dejaba secar el pellet que se resuspendía en 500 µl de TE y 1 µl de RNAsa (10 mg/ml) a 37°C durante 30 minutos. A esta mezcla de DNA se le añadían 500 µl de PEG 13%/NaCl 0.8M y se incubaba en agua-hielo durante aproximadamente 30 minutos o a 4°C durante toda la noche. Se centrifugaba durante 30 minutos a 11000 r.p.m. a 4°C. Se añadían 200 µl de etanol absoluto al pellet, se centrifugaba a 13000 r.p.m. a temperatura ambiente durante 1 minuto, se eliminaba el sobrenadante y se añadían 200 µl de etanol al 70%. Finalmente, tras descartar el sobrenadante se dejaba secar el pellet y se resuspendía en 200 µl (o un volumen menor si el plásmido es de bajo número de copias) de TE durante 30 minutos a 37°C.

### Soluciones empleadas

**PEG 8000 13% / NaCl 0.8M**

**SDS1% / NaOH 0.1M**

**TGE (Tris - Glucosa - EDTA)**

✓ Tris:HCl pH 8 25mM

✓ Glucosa 5mM

✓ EDTA pH 8 10mM

**Acetato potásico 3M pH 5.6.**

**TE**

✓ Tris:HCl pH 8 10mM

✓ EDTA pH 8 1mM

### 3.2.2 Recuperación de plásmidos de la genoteca a partir de DNA de levaduras

Para aislar el DNA del plásmido pGAD424 o derivados de preparaciones

de DNA plasmídico de levaduras, se transformaba la estirpe HB101 con 1  $\mu$ l de DNA extraído de un clon de la estirpe PJ696 y se replicaban varias colonias transformantes a medio LB con ampicilina y a medio mínimo sin leucina. De cada transformación, se aislaban a una placa de LB con ampicilina uno o más clones que crecieran en ambos medios selectivos y se extraía DNA plasmídico de ellos.

### 3.2.3 Aislamiento de DNA total de *Synechococcus*

Se tomaban 50 ml de un cultivo crecido a un mínimo de 5  $\mu$ g de clorofila por ml y se recogían las células por centrifugación a 8000 r.p.m. durante 10 minutos. Este pellet se resuspendía en 400  $\mu$ l de TE y se añadían 200  $\mu$ l de perlas de vidrio (se usaron de un diámetro aproximado de 0.1 mm) lavadas con HCl diluido y bien enjuagadas con H<sub>2</sub>O destilada. Tras ello, se añadían 20  $\mu$ l de SDS 10% y 450  $\mu$ l de fenol:CH<sub>3</sub>Cl (1:1). Posteriormente, se hacían 10 tandas de agitación en vórtex durante 2 minutos con incubaciones intermedias en hielo durante 1 minuto. Se centrifugaba a 11000 r.p.m durante 15 minutos a 4°C y se tomaba el sobrenadante al que se le añadía fenol:CH<sub>3</sub>Cl (25:24:1) en una proporción 1:1. Se centrifugaba a 5000 r.p.m durante 4 minutos y se tomaba la fase acuosa superior a la que se le añadía CH<sub>3</sub>Cl:IAA (24:1) en una proporción 1:1. Se centrifugaba a 5000 r.p.m. durante 4 minutos y se tomaba la fase acuosa superior a la que se le añadían 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Tras centrifugar a 11000 r.p.m durante 15 minutos a 4°C se eliminaba el sobrenadante y se añadía 1ml de metanol al pellet. Se centrifugaba para eliminar la clorofila presente en el pellet de DNA, se descartaba el sobrenadante y se añadía 1 ml de etanol absoluto. Se centrifugaba nuevamente a 13000 r.p.m. durante 1 minuto, se descartaba el sobrenadante y se añadía 1 ml de etanol al 70%. Finalmente, tras centrifugar a 13000 r.p.m durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante, se dejaba secar el pellet que se resuspendía, posteriormente, en 50  $\mu$ l de TE, incubándolo a 37°C durante aproximadamente 30 minutos.

### 3.2.4 Aislamiento de DNA plasmídico de *S. cerevisiae*

En este trabajo se empleaba el siguiente procedimiento, en el que se extrae DNA total, para la obtención del DNA plasmídico de clones de *S. cerevisiae*.

Se inoculaba el clon portador del plásmido en 5 ml de medio YNB sin leucina o sin triptófano, según la resistencia codificada en el plásmido, y se incubaba durante 20 horas a 30°C en agitación orbital. Se tomaban 1.5 ml de cultivo y se centrifugaba a 13000 r.p.m. durante 30 segundos para recoger las células. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendía en 200 µl de YLS y se añadían 200 µl de perlas de vidrio de un diámetro aproximado de 0.1 mm y 200 µl de fenol:CH<sub>3</sub>Cl (1:1). Esta mezcla se agitaba en un Mini Beadbeater™ (Biospec products) en los tubos apropiados, durante 30 segundos. Se centrifugaba a 13000 r.p.m. durante 30 segundos a temperatura ambiente y se tomaba la fase acuosa superior a la que se le añadían 3 µl de glucógeno (20 mg/ml) y 2 volúmenes de etanol absoluto, agitando en vórtex tras añadir cada uno de ellos. Se congelaba en nitrógeno líquido, se centrifugaba a 13000 r.p.m. durante 20 minutos a temperatura ambiente y, tras eliminar el sobrenadante, se lavaba el pellet con etanol al 70%. Finalmente, tras secar el pellet a temperatura ambiente, éste se resuspendía en 20 µl de H<sub>2</sub>O durante 30 minutos a 37°C.

#### Soluciones empleadas

##### YLS (Yeast Lysis Solution)

- ✓ 300mM NaCl
- ✓ 10mM Tris
- ✓ 1mM EDTA

Ajustar el pH a 8 y autoclavar.

Después de autoclavar añadir SDS a una concentración final del 0.1%.

### 3.2.5 Digestiones con enzimas de restricción

Las digestiones con enzimas de restricción, en la mayoría de los casos, se llevaban a cabo según las recomendaciones del fabricante. El volumen de reacción y la cantidad de DNA a digerir variaba según el propósito de la misma.

En los casos en los que se añadía BSA, se hacía a una concentración final de 0.1% y en los que se añadía espermidina, era a una concentración final de 2mM.

### **3.2.6 Digestiones parciales de DNA genómico de *Synechococcus***

Se realizaron digestiones parciales con la enzima *Sau3AI* de Amersham Biosciences y con la enzima *Tsp509I* de New England Biolabs. Las digestiones parciales con la enzima *Sau3AI* se llevaban a cabo en un volumen total de 500  $\mu$ l con 50  $\mu$ g de DNA, 15 U de *Sau3AI* y el tampón suministrado por el fabricante. Se incubaba durante 1 hora a 37°C tras lo cual se inactivaba la enzima a 65°C durante 20 minutos. En el caso de la digestión parcial con la enzima *Tsp509I*, la reacción se llevaba a cabo en 500  $\mu$ l de volumen total con 50  $\mu$ g de DNA genómico, 10 U de enzima y el tampón suministrado por el fabricante. Se incubaba a 65°C durante 20 minutos. Ya que esta enzima no puede ser inactivada por calor, inmediatamente tras la digestión, se cargaba en un gel y se extraía el DNA digerido.

### **3.2.7 Desfosforilación de extremos 5' de moléculas de DNA**

Se desfosforilaban los plásmidos cortados con una sola enzima, excepto cuando el inserto a clonar era un producto de PCR intacto, con el fin de evitar su recircularización durante las reacciones de ligación.

Un volumen de aproximadamente 50  $\mu$ l de DNA digerido se incubaba con 1U de SAP (shrimp alkaline phosphatase) y el tampón suministrado por el fabricante en un volumen total de 150  $\mu$ l durante 30 minutos a 37°C. Tras este tiempo de incubación, se añadía a la mezcla 1 U de SAP y se incubaba otros 30 minutos a 37°C. La enzima se inactivaba mediante incubación a una temperatura de 60°C durante 20 minutos si es que no se iba a extraer inmediatamente el DNA a partir de gel.

### **3.2.8 Rellenado de extremos 5' protuberantes con Klenow**

Esta reacción se empleaba para convertir extremos protuberantes de moléculas de DNA en extremos romos. Se llevaba a cabo en 20  $\mu$ l de volumen

total, usando entre 1 y 5  $\mu\text{g}$  de DNA, a los que se le añadía dNTP a una concentración final de 0.13mM, 0.3 U de Klenow y el tampón de reacción empleado según las recomendaciones del fabricante. Las reacciones se incubaban durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se inactivaba la enzima durante 10 minutos a 75°C.

### 3.2.9 Ligaciones

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen total de 20  $\mu\text{l}$  empleando la enzima ligasa de T4 del fabricante New England Biolabs (NEB) según las recomendaciones de este fabricante. La relación inserto:vector, empleada para la mayoría de los casos era de 5:1, usando 100 ng de vector. Cuando la incubación se realizaba a 16°C se empleaban 2 U weiss de ligasa durante más de 12 horas y, cuando era a temperatura ambiente 6 U weiss de ligasa y un tiempo de 30 minutos a varias horas.

Se incluían dos controles en la ligación, una reacción sin inserto y una reacción sin ligasa ni inserto.

En las ligaciones de productos de digestiones parciales al plásmido pAGAD424 para la construcción de genotecas, se emplearon las relaciones vector:inserto, 4:1 en el caso de "fragmentos Sau3AI" y 5:1 en el caso de "fragmentos Tsp509I". Para calcular los nanogramos de inserto en la reacción se tomó el tamaño medio del rango de tamaños de los fragmentos empleados.

#### 3.2.9.1 PRECIPITACIÓN DE LIGACIONES

Antes de transformar con el producto de la ligación, se precipitaba el DNA añadiendo 1 ml de 1-butanol a los 20  $\mu\text{l}$  de la ligación y se centrifugaba durante 5 minutos a 13000 r.p.m. El pellet de DNA se lavaba con etanol absoluto y posteriormente con etanol al 70% y se resuspendía en 5  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O ultrapura (calidad mili-Q), o 10  $\mu\text{l}$  en el caso de las digestiones de las ligaciones de fragmentos obtenidos por digestión parcial de DNA genómico.

### 3.2.10 Amplificación de DNA mediante PCR

La reacción se preparaba en un volumen total de 50 o 100  $\mu\text{l}$  con dNTP a una concentración final de 0.2mM, cada uno de los cebadores a 0.4 $\mu\text{M}$ , 1 U de



DNA polimerasa y una cantidad variable de DNA según sea plásmido (aproximadamente 10 ng) o DNA genómico (entre 100 ng y 1 µg). El tampón de reacción se empleaba según las recomendaciones del fabricante. La temperatura de alineamiento óptima de la reacción se calculaba con el programa Olicalc ([www.acaclone.com](http://www.acaclone.com)) y el tiempo de elongación variaba en función del producto que se iba a obtener. En general, se empleaba un minuto de elongación por cada kilobase de producto de PCR. La enzima empleada para propósitos de clonación era Expand High-fidelity PCR system, del fabricante Roche y para procedimientos rutinarios de análisis la enzima Netzyme del fabricante Molecular Netline Bioproducts.

### **3.2.11 PCR walking**

Esta técnica se emplea para la clonación de fragmentos genómicos flanqueantes a una secuencia conocida.

#### **Preparación del linker**

En un volumen total de 100 µl se preparaba la mezcla de los oligonucleótidos TRANS P-01 y TRANS P-02 a una concentración final de 10µM cada uno. Se incubaba en un baño a 68°C durante 15 minutos y se dejaba enfriar a temperatura ambiente.

#### **Digestiones en romo del DNA genómico**

Se llevan a cabo con 5 µg de DNA genómico en presencia de espermidina 2mM y BSA al 0.1% en un volumen total de 50 µl.

#### **Purificación de las digestiones en romo**

Se añadía a la digestión, 50 µl de fenol:CH<sub>3</sub>Cl:IAA (25:24:1) y se centrifugaba a 13000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se tomaba la fase acuosa superior a la que se le añadían 30 µl de H<sub>2</sub>O, 3 µl de glucógeno (20 mg/ml) y 280 µl de etanol absoluto. Tras ello, se congelaba en nitrógeno líquido y se centrifugaba a 13000 r.p.m. durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminaba el sobrenadante y se añadía 1 ml de etanol al 70% frío. Se centrifugaba a 13000 r.p.m. durante 20 minutos a temperatura ambiente, se eliminaba el sobrenadante y se dejaba secar el pellet de DNA, que

posteriormente se resuspendía en 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O a 37°C.

### Ligaciones con el acoplador

Las reacciones de ligación se realizaban en un volumen total de 15  $\mu$ l empleando 5  $\mu$ l de DNA genómico digerido y purificado, 2.5  $\mu$ l de acoplador (10 $\mu$ M), 1.5  $\mu$ l de buffer de ligasa 10X NEB, 1  $\mu$ l de ligasa NEB (2 U weiss/ $\mu$ l) y 5  $\mu$ l de agua. La reacción se incubaba durante toda una noche a 16°C.

### PCR

Los productos de la ligación purificados se usaban como molde para la reacción de PCR con los cebadores TRANS P-01 y un oligonucleótido específico que hibrida cerca del extremo de la secuencia conocida. Se empleaba la enzima Expand High Fidelity del fabricante Roche.

Las secuencias obtenidas se ensamblaban utilizando el programa CAP (Contig assembly program). Esta secuencia era recomprobada mediante la secuenciación del producto de una PCR, a partir de DNA genómico, con oligonucleótidos que hibridan en los extremos de toda la región ensamblada.

### 3.2.12 Electroforesis de DNA

Se realizaban electroforesis horizontales en geles de agarosa para separar y visualizar moléculas de DNA. Según el tamaño de los fragmentos y el propósito de la electroforesis se utilizaban geles de entre 0.8% y 1% de agarosa con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ml y se sometían a electroforesis en tampón TBE 0.5X (Tris – Borato - EDTA) a un voltaje entre 70V y 100V. Las muestras se cargaban con tampón de carga con azul de bromofenol y/o xilen cianol.

#### Soluciones empleadas

##### TBE 5X (Tris Borato EDTA)

✓ Tris	54 g
✓ Ácido bórico	27.5 g
✓ EDTA 0.5M pH 8.8	20 ml

Sergio Burillo Sanz

Materiales y Métodos

**Tampón de carga**

- ✓ Azul de bromofenol 0.25%
- ✓ Xilen cianol 0.25%
- ✓ Ficoll 15%

**3.2.13 Extracción de DNA de geles de agarosa**

La extracción de DNA de geles de agarosa se realizaba mediante la utilización de un juego de reactivos de los fabricantes Amersham Biosciences o Quiagen, o mediante la congelación de la banda y su extracción mediante el uso de una jeringa.

Para la extracción con juegos de reactivos comerciales se seguían las instrucciones del fabricante. Para la extracción del DNA por congelación y filtración con jeringa se recortaba la banda de DNA de un gel de agarosa y se colocaba en el interior de una jeringa de 10 ml. Tras ello, se congelaba la banda, introduciendo la jeringa en nitrógeno líquido. Se esperaba a que comenzara a descongelarse y se aplicaba presión recogiendo el líquido en un tubo eppendorf. A la muestra recogida se añadía un volumen de fenol:CH<sub>3</sub>Cl:IAA (25:24:1) y se centrifugaba. Tras la separación en dos fases, se recogía la fase superior acuosa y se añadía un volumen de CH<sub>3</sub>Cl:IAA (24:1). Se separaban de nuevo las fases por centrifugación y se tomaba la fase superior acuosa a la que se añadían 3 µl de glucógeno (20 mg/ml) y dos volúmenes de etanol absoluto. Se precipitaba mediante congelación en nitrógeno líquido y centrifugación a 13000 r.p.m. durante más de 15 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 70% se secaba éste y se resuspendía en H<sub>2</sub>O ultrapura incubando a 37°C durante aproximadamente 30 minutos.

**3.2.14 Cuantificación de DNA**

El DNA se cuantificaba en un fluorímetro Hoefer DyNA Quant del fabricante Hoefer Pharmacia Biotech, según las recomendaciones del fabricante.

### 3.2.15 Construcciones de plásmidos

Para la construcción del plásmido pUAGC1 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGBT9 (+1) *nblR* obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NBLR-1F y NBLR-3.

Para la construcción del plásmido pUAGC3 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGBT9 (+1) *nblR* obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NBLR-1F y NBLR-3.

Para la construcción del plásmido pUAGC5 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGAD424 (+2), *ntcA* obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NTCA-1F y NTCA-1R.

Para la construcción del plásmido pUAGC7 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGBT9 (+2), *ntcA* obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NTCA-1F y NTCA-1R.

Para la construcción del plásmido pUAGC11 se clonó en los sitios *EcoRI* - *PstI* del vector pGAD424 (+1), *glnB* obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mediante los oligonucleótidos GLNB-1F y GLNB-1R.

Para la construcción del plásmido pUAGC31 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGAD424,  $NrtC^{\Delta(1-272)}$  obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NRTC-2F y NRTC-1R.

Para la construcción del plásmido pUAGC32 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGBT9,  $NrtC^{\Delta(1-272)}$  obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NRTC-2F y NRTC-1R.

Para la construcción del plásmido pUAGC51 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGAD424,  $NbIS^{\Delta(1-271)}$  obtenido por PCR de DNA genómico de

*Synechococcus sp.* PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NBLS-2F y NBLS-1R.

Para la construcción del plásmido pUAGC52 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGBT9, *NbIS*<sup>Δ(1-271)</sup> obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus sp.* PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NBLS-2F y NBLS-1R.

Para la construcción del plásmido pUAGC53 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGAD424 (+2), *nbIS* obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus sp.* PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NBLS-1F y NBLS-1R.

Para la construcción del plásmido pUAGC54 se clonó en los sitios *EcoRI* - *Sall* del vector pGBT9 (+2), *nbIS* obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus sp.* PCC 7942 mediante los oligonucleótidos NBLS-1F y NBLS-1R.

El plásmido pUAGC62 se construyó mediante gap-repair a partir del plásmido pUAGC61.

El plásmido pUAGC72 se construyó mediante gap-repair a partir del plásmido pUAGC71.

Para la construcción del plásmido pUAGC59 se amplificó mediante PCR de DNA genómico de *Synechococcus sp.* PCC 7942 un fragmento de 2.1 Kb, que contenía al gen *pipX* mediante los oligonucleótidos LCY-PIPX-1F y PIPX-5R. Se digirió este fragmento con las enzimas *XhoI* y *HindIII*, y este producto de 1824 pb se clonó en estos mismos sitios del plásmido pBluescript SK(+).

Para la construcción del plásmido pUAGC59.1 se eliminó el fragmento de 196 pb *Clal-Sall* del inserto del pUAGC59 obtenido de la estirpe de *E. coli* GM119 para evitar la metilación de la diana *Clal*, eliminando así los primeros 181 nucleótidos de la ORF de *pipX*. Se rellenaron los extremos 3' mediante el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*, y se desfosforilaron los extremos 5', quedando el plásmido abierto en romo. Paralelamente, se extrajo la cassette CK1 del vector pRL161 mediante digestión con *HincII* que se clonó en romo en orientación opuesta al gen *pipX*.

Para la construcción del plásmido pUAGC99 se clonó en el sitio *EcoRI* del vector pGEX-3X, *pipX* obtenido por PCR de DNA genómico de *Synechococcus* sp. PCC 7942 mediante los oligonucleótidos PIPX-OV-2F y PIPX-3X-1R.

### 3.3 Métodos Genéticos

#### 3.3.1 Transformación de *E. coli*

##### 3.3.1.1 TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE *E. COLI*: MÉTODO DEL TSS

##### **Preparación de las células competentes**

Se partía de un preinóculo de la estirpe a transformar en 5 ml de medio LB (o LB suplementado con antibiótico) que se incubaba toda la noche a 37°C en agitación orbital a 220 r.p.m. Se tomaban 300 µl del cultivo se diluía en 30 ml del medio LB empleado. Se incubaba a 37°C en agitación orbital a 220 r.p.m. hasta que alcanzara una DO<sub>600</sub> entre 0.4 y 0.6, lo que suponía aproximadamente 3 horas. Se recogían las células por centrifugación a 6000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendían en 750 µl de LB a 4°C por cada 10 ml de cultivo recogido y se incubaban en hielo durante 5 minutos. Tras ello, se añadían otros 750 µl de medio LB a 4°C y se incubaba de nuevo en hielo durante 5 minutos. La suspensión de células se repartía en alícuotas de 150 µl en tubos eppendorf. Si se iban a congelar se les añadía 3 µl de DMSO y se mezclaba bien.

##### **Transformación por choque térmico**

Para cada transformación se tomaba una alícuota de 150 µl de células competentes y se añadían aproximadamente 50 ng de DNA. También se preparaba un control positivo con DNA del plásmido pUC18 y un control negativo sin DNA. Se incubaba durante 90 segundos a 42°C y, posteriormente, durante 2 minutos en hielo. Se añadía 1 ml de LB y se incubaba a 37°C durante 1 hora a 220 r.p.m. Esta mezcla de transformación se sembraba en placas de LB suplementadas con el correspondiente antibiótico y se incubaba durante una noche a 37°C.

### 3.3.1.2 TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* MEDIANTE ELECTROPORACIÓN

#### **Preparación de las células electrocompetentes**

Se partía de un preinóculo de la estirpe adecuada en 5 ml de LB que se crecía durante toda la noche a 37°C en agitación orbital a 220 r.p.m. Este cultivo se diluía 1:100 en un volumen total de 250 ml de medio LB y se cultivaba hasta que alcanzase una  $DO_{600} = 0.4 - 0.7$ , momento en el cual se ponía el matraz con el cultivo en agua-hielo durante 15 minutos. Se centrifugaba a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C y se eliminaba el sobrenadante. El pellet de células se resuspendía lentamente en poco volumen de H<sub>2</sub>O ultrapura y posteriormente se rellenaba hasta un volumen de 250 ml. Este lavado se repetía hasta un total de tres veces. Se resuspendían las células provenientes de 250 ml de cultivo inicial en 1 ml de agua ultrapura. La suspensión de células se repartía en alícuotas de 200 µl. A las alícuotas que se iban a congelar se les añadía glicerol a una concentración final del 10%, se congelaban en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaban a -80°C.

#### **Electroporación de las células electrocompetentes**

Se empleaba el electroporador: BioRad *GENEPULSER*®II. Se usaban cubetas de electroporación de 0.2 cm de separación entre los electrodos y las condiciones del pulso de electroporación eran las siguientes: Voltaje de 2.5 V, capacitancia de 25 µF y resistencia de 400 Ω para volúmenes de 200 µl, o de 200 Ω para volúmenes de 50 µl. En todas las transformaciones se empleaba un control positivo usando como DNA el plásmido pUC18 para calcular la eficacia de transformación y un control negativo sin DNA.

### **3.3.2 Transformación de *S. cerevisiae*. Transformación química: Método del Acetato de Litio**

Se realizaba la transformación de *S. cerevisiae* por tratamiento con acetato de litio, según el siguiente procedimiento.

#### **Preparación de células competentes**

Se inoculaban 50 ml del medio adecuado, medio YPD para estirpes no portadoras de plásmido o YNB con histidina, adenina y leucina o triptófano para

estirpes portadoras de plásmido, con la estirpe adecuada y se incubaba durante aproximadamente 16 horas a 30°C en agitación orbital a 225 r.p.m. Este cultivo crecido se diluía hasta un volumen final de 300 ml a una  $DO_{600}$  de entre 0.2 y 0.3 y se incubaba en las mismas condiciones hasta una  $DO_{600}$  igual al doble de la inicial, es decir, aproximadamente 0.5. Las células se recogían centrifugando el cultivo a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el pellet de células se resuspendía en 50 ml de TE. Se centrifugaba a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendía el pellet en 1 ml de acetato de litio/TE por cada 200 ml de cultivo de partida.

Para la transformación de genotecas en PJ696 se partía de un cultivo diluido hasta 300 ml y las células competentes finalmente se resuspendían en 1.5 ml de acetato de litio/TE.

### **Transformación**

Para preparar la mezcla de transformación se añadían 10  $\mu$ g de DNA de esperma de salmón desnaturalizado durante 20 minutos a 100°C, de 1 a 10  $\mu$ g de DNA plasmídico, o de cada uno de los DNAs en el caso de cotransformación, a 100  $\mu$ l de células competentes y se mezclaba en vórtex. Posteriormente, se añadían 600  $\mu$ l de solución PEG/acetato de litio y se mezclaba de nuevo en vórtex. Se incubaban los tubos con la mezcla de transformación a 30°C en agitación orbital a 225 r.p.m. durante 30 minutos. Posteriormente se añadían 70  $\mu$ l de DMSO y se incubaba durante 15 minutos a 42°C y durante 2 minutos en hielo. Se recogían las células por centrifugación a 1000 x g durante 5 minutos y se resuspendían en 300  $\mu$ l de TE. La transformación se sembraba en placas de medio selectivo YNB.

En el caso de la transformación empleando genotecas, los volúmenes se incrementaban adecuadamente escalados de manera que la mezcla de transformación consistía en 1 ml de células competentes, 2 mg de DNA de esperma de salmón, 50  $\mu$ g de DNA de genoteca y 6 ml de PEG/Acetato de litio a la que posteriormente se le añadían 700  $\mu$ l de DMSO y finalmente se resuspendía en 4 ml de TE.



**Soluciones para la transformación de levaduras****TE 10X:**

✓ Tris-HCl	0.1M
✓ EDTA	10mM

pH 7.5

**Acetato de litio 1M:**

pH 7.5

**PEG/Acetato de litio:**

✓ PEG 3350 50%	8 ml
✓ LiAc 1M	1 ml
✓ TE 10x	1 ml
✓ Agua hasta un volumen de	10 ml

**TE/Acetato de litio:**

✓ TE 10x	0.5 ml
✓ LiAc 1M	0.5 ml
✓ Agua	4 ml

**3.3.3 Transformación de *Synechococcus***

Se tomaba un volumen de cultivo suficiente para disponer de 10  $\mu\text{g}$  de clorofila por cada transformación que se fuera a realizar y se centrifugaba a 8000 r.p.m. durante 8 minutos para recoger las células, que se resuspendían en una cantidad variable de BG11<sub>0</sub>. Este lavado con BG11<sub>0</sub> se repetía una vez más, con el fin de eliminar los restos del medio anterior. Se centrifugaba de nuevo a 8000 r.p.m. a 4°C y se resuspendía el pellet de células en BG11 hasta una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se tomaban 100  $\mu\text{l}$  de células para cada transformación a las que se les añadía aproximadamente 600 ng de DNA (en un volumen menor de 10  $\mu\text{l}$ ). Estos tubos se incubaban a temperatura ambiente sin luz durante 5 horas sin agitación o durante toda la noche en agitación orbital a 200 r.p.m. Las mezclas de transformación se sembraban en placas de medio BG11 sólido sobre un filtro milipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se incubaban a temperatura ambiente con iluminación por luz blanca durante 48

horas, tras lo cual se pasaba el filtro a una placa del medio selectivo adecuado. Estas placas se incubaban a temperatura ambiente con iluminación por luz blanca durante aproximadamente un mes, hasta que aparecieran colonias.

Paralelamente, se ponían dos controles, una mezcla de transformación sin DNA en medio sólido BG11 y una mezcla de transformación sin DNA incubada en los mismos medios sólidos y condiciones que las transformaciones.

### **3.3.4 Mutagénesis por sustitución génica en *Synechococcus***

Para realizar mutaciones por inserción mediante sustitución génica en *Synechococcus* se amplificaba mediante PCR de DNA genómico, un fragmento conteniendo el gen a inactivar. La región amplificada se escogía de tal manera que a los dos lados del sitio de mutación hubiese como mínimo 400 pb de secuencia original. Este producto amplificado se clonaba en el plásmido pBluescriptSK(+). Una vez obtenido el plásmido recombinante, se introducía la cassette CK1, que confiere resistencia a kanamicina, en orientación contraria al gen inactivado. Este plásmido se empleaba para transformar *Synechococcus*. La transformación se sembraba en el medio sólido adecuado con kanamicina hasta que aparecían clones resistentes. La presencia de la mutación y la segregación completa o incompleta se comprobaba mediante PCR a partir de biomasa en cultivo líquido, biomasa en medio sólido o DNA genómico purificado y empleando oligonucleótidos que hibridaban específicamente flanqueando la zona de inserción de la cassette.

### **3.3.5 Clonación mediante gap-repair en levaduras.**

Mediante esta técnica (Cagney et al. 2000; Kolonin et al. 2000) se clonaban los insertos del vector pGAD424, en el plásmido pGBT9.

Para ello, se diseñaron los oligonucleótidos TRANSGADGBT-1F y TRANSGADGBT-1R. Estos oligonucleótidos hibridan unas 60 bases con las regiones de pGBT9 que flanquean el polylinker, permitiendo la recombinación en la levadura entre el producto de PCR y el plásmido. Además contienen alrededor de 20 pares de bases en la región 3' que hibridan con el plásmido pGAD424 y actúan de cebador en la reacción de PCR.

Se llevaba a cabo una reacción de PCR con estos oligonucleótidos y como molde el plásmido derivado de pGAD424. Se co-transformaba en PJ696 100 ng del vector pGBT9 abierto con una enzima cuya diana esté presente en el polylinker junto con el producto de PCR en exceso (aproximadamente 0.5 µg) y se aislaba DNA plasmídico de clones transformantes de levaduras capaces de crecer en medio YNB sin triptófano.

### **3.3.6 Conjugación en líquido de levaduras en placas de 96 pocillos**

Se realizaban conjugaciones entre clones de las estirpes de *S. cerevisiae* Y187 de genotipo *MAT $\alpha$*  o sexo  $\alpha$  y PJ696, *MATa* o sexo *a*. Adoptamos el convenio de que la estirpe Y187 fuera la portadora de los plásmidos derivados del pGBT9 y la estirpe PJ696 la portadora de los plásmidos derivados del pGAD424.

Se partía de un cultivo de 2 ml de la estirpe en el medio YNB selectivo adecuado que se incubaba durante 20 horas a 30°C en agitación orbital. Se tomaban 1.5 ml de este cultivo, se pasaban a un tubo eppendorf y se centrifugaba a 13000 r.p.m. El pellet de células se resuspendía en 1 ml de YPD. En cada una de las columnas de la placa de 96 pocillos se ponían entre 80 y 100 µl de cultivo de cada uno de los clones de Y187 y en cada una de las filas, los de PJ696 y se incubaba durante una noche a 30°C en agitación orbital. Empleando un replicador de colonias de 96 puntas, se transfería biomasa a placas de medio YNB selectivo para la interacción, y a dos placas de YNB –leu –trp una como control de conjugación y otra para el ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa en placa.

### **3.3.7 Generación de genotecas genómicas de *Synechococcus***

Las digestiones parciales de DNA total de *Synechococcus* se cargaban en un gel de agarosa y se dividían cada una en dos tipos de tamaño de fragmentos. La digestión parcial de *Sau3AI*, dió lugar a una fracción de fragmentos entre 0.8 y aproximadamente 2 Kb, constituyendo los “fragmentos grandes *Sau3AI*”, y otra entre 0.35 y 0.8 Kb, constituyendo los “fragmentos pequeños *Sau3AI*”. Para las

digestiones *Tsp509I*, se tomaron los fragmentos entre 0.8 y aproximadamente 2.5 Kb para constituir los “fragmentos grandes *Tsp509I*” y los fragmentos entre 0.8 y aproximadamente 0.3 Kb para constituir los “fragmentos pequeños *Tsp509I*”. Los fragmentos *Sau3AI* y *Tsp509I* eran ligados a los plásmidos pGAD424 y sus versiones (+1) y (+2) abiertos con la enzima *Bam*HI, y *Eco*RI, respectivamente, tal como se describe en el apartado 3.2.9. Este DNA se transferiría a *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante transformación por electroporación. Se empleaban 2  $\mu$ l de ligación (1/5 de la ligación) en 200  $\mu$ l de células electrocompetentes. Este proceso se repitió hasta 5 veces para cada ligación. Se sembraban 200  $\mu$ l de transformantes en placas de 13.5 cm con medio LB ampicilina. Se incubaban durante una noche a 37°C. Al día siguiente se recogía la genoteca añadiendo 3 ml de medio LB líquido a cada placa, recogiendo las colonias con asa de vidrio. Cada genoteca recogida se titulaba sembrando 50  $\mu$ l de diluciones 1:1000 y 1:50000 de la misma en placas de LB ampicilina. Tras conocer el título de la recogida inicial se llevaba hasta un título aproximado de  $6 \times 10^{10}$  u.f.c. / ml en medio LB, se usaban 100 ml para extraer DNA de la genoteca y el resto se congelaba en alícuotas de 1 ml con DMSO al 7%.

### **3.3.8 Escrutinio de genotecas mediante el sistema del doble híbrido en *S. cerevisiae*.**

Para la realización de los escrutinios de las genotecas empleando como cebo la proteína GAL4BD:PII se transformaba un clon de PJ696 portador del plásmido pUAGC12 con DNA de la genoteca y se sembraban 200  $\mu$ l de la transformación en 20 placas de 13.5 cm de YNB –leu –trp –his suplementado con 3-AT 1mM. Éstas se incubaban a 30°C y las colonias que iban apareciendo durante 15 días se aislaban. Tras este periodo, los clones aislados se replicaban a placas de medio selectivo para la interacción YNB –leu –trp y sin histidina con 3-AT 1mM o sin adenina. De los clones que eran capaces de crecer en al menos uno de estos medios se extraía el DNA plasmídico y se aislaba el plásmido presa mediante complementación en la estirpe HB101. Posteriormente, se cotransformaba la estirpe PJ696 con el plásmido pUAGC12 y con cada uno de

los plásmidos presa aislados y se recomprobaba el fenotipo de crecimiento en medio selectivo para la interacción. Se secuenciaba el inserto de los plásmidos presa que recomprobaban el fenotipo, los cuales se transferían a DH5 $\alpha$  para su conservación.

## 3.4 Actividades enzimáticas

### 3.4.1 Cuantificación de la expresión del gen reporter *lacZ* en *S. cerevisiae* mediante ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa

#### 3.4.1.1 ENSAYO DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA EN CULTIVOS LÍQUIDOS DE *S. cerevisiae*

Mediante este ensayo se cuantifica la expresión del gen testigo *lacZ*. Se realizaban medidas de actividad  $\beta$ -galactosidasa con el fin de obtener una estimación de la magnitud de interacción entre dos proteínas de fusión a los dominios de GAL4 expresadas en PJ696.

Se partía de un cultivo de 5 ml de cada clon de PJ696 a analizar que se incubaba durante toda la noche a 30°C en agitación orbital a 220 r.p.m. Se diluían los cultivos en el mismo medio a una DO<sub>600</sub> de 0.2 y se incubaba en las condiciones anteriores hasta una DO<sub>600</sub> de 0.5 a 0.8, lo que suponía de 3 a 5 horas. Se tomaban 1.5 ml del cultivo y se centrifugaba a 13000 r.p.m. durante 30 segundos a temperatura ambiente, se eliminaba el sobrenadante y se resuspendía en 1.5 ml de buffer Z. La suspensión de células se centrifugaba de nuevo en las mismas condiciones y se resuspendía el pellet en 300  $\mu$ l de buffer Z que se repartían en tres muestras de 100  $\mu$ l. Paralelamente se preparaba un blanco con 100  $\mu$ l de buffer Z que se trataba igual que el resto de las muestras. Las muestras se sometían a tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido durante 30 segundos y descongelación en un baño a 37°C durante otros 30 segundos. Se añadían 700  $\mu$ l de solución de  $\beta$ -mercaptoetanol y 160  $\mu$ l de solución de ONPG y se incubaba a 30°C durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadía a cada una de las muestras 400  $\mu$ l de carbonato sódico 1M y

se mezclaba. Finalmente, se centrifugaban los tubos durante 10 minutos a 13000 r.p.m. a temperatura ambiente y se medía la  $A_{420}$  del sobrenadante de cada muestra. La actividad se expresaba en unidades Miller (UM) calculadas a partir de la siguiente fórmula:  $UM = (1000 \cdot A_{420}) / (0.5 \cdot DO_{600})$ , donde  $A_{420}$  es la Absorbancia a 420 nm medida tras la reacción y  $DO_{600}$  es la DO a 600 nm medida en los cultivos de partida.

### Soluciones empleadas:

#### Buffer Z:

✓ $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	16.1 g/L
✓ $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	5.50 g/L
✓ KCl	0.75 g/L
✓ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.246 g/L
✓ pH 7	

#### Solución de $\beta$ -mercaptoetanol:

0.27 ml  $\beta$ -mercaptoetanol en 100 ml buffer Z

#### Solución de ONPG:

ONPG 4 mg/ml en buffer Z

### 3.4.1.2 ENSAYO DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA EN BIOMASA DE *S. cerevisiae* EN MEDIO SÓLIDO

En este ensayo se analiza la expresión del gen reporter *lacZ* en PJ696 empleando X-gal como sustrato. Permite un análisis cualitativo, simultáneo y comparativo de la actividad en un gran número de clones.

Sobre una placa de medio YNB -leu -trp con biomasa de los clones de PJ696 se vertían aproximadamente 10 ml de una solución que contenía 9.3 ml de tampón fosfato potásico 0.5M pH 7, 600  $\mu$ l de DMF, 100  $\mu$ l de SDS 10% y 50 mg de agarosa. Esta solución se calentaba en el microondas hasta que se hubiera fundido completamente la agarosa y se dejaba enfriar hasta aproximadamente 60°C. Posteriormente se añadían 5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol, 250  $\mu$ l de X-gal (20 mg/ml en DMF) y se incubaba a 30°C de 30 minutos a varias horas de manera que se detectara la señal en los controles positivos pero no en

los controles negativos.

### 3.4.2 Cuantificación de actividad NAGK en extractos proteicos

Se tomaba un volumen de un cultivo en medio BG11<sub>A</sub> de la estirpe empleada de *Synechococcus*, correspondiente a 200 µg de clorofila. Con éste se preparaban dos nuevos cultivos de 20 ml, cada uno con 100 µg de clorofila totales, a una concentración de 5 µg de clorofila por ml, uno de ellos con medio BG11<sub>0</sub> y otro con BG11<sub>A</sub>, ambos suplementados con carbonato sódico y se incubaban en un baño termostatzado a 30°C con gaseo de aire enriquecido en CO<sub>2</sub> e iluminación por luz blanca durante 5 horas. Se recogían las células por centrifugación a 4°C a 8000 r.p.m. durante 8 minutos y se resuspendían en aproximadamente 10 ml de tampón de lavado. Este paso de lavado se repetía una vez. Se resuspendía el pellet de células en 600 µl de tampón de extractos y se añadían 1.2 µl de lisozima (100 µg/µl) y 2-oxoglutarato a una concentración final de 5mM. Se incubaban durante 30 minutos en hielo y se añadía PMSF a una concentración final de 1mM tras lo que se sonicaba 2 veces durante 5 minutos, se transferían 285 µl a un nuevo tubo y el resto se empleaba para medir la proteína total presente en la muestra mediante Bradford. La determinación de actividad NAGK se hacía esencialmente como se describe en (Haas et al. 1975). Se añadían 215 µl de tampón de reacción completo (TRC) excepto al blanco al que se le añadían 190 µl de tampón de reacción (TR), 20 µl de ATP 0.5M y 5 µl de DTT 0.1M. Se incubaba durante 60 minutos a 37°C y se paraba la reacción añadiendo 500 µl de solución de STOP, tras lo cual se centrifugaban las muestras durante 1 minuto a 13000 r.p.m. y se medía la absorbancia a 540 nm. La actividad se expresaba en miliunidades de NAGK por mg de proteína, tomando como coeficiente de extinción molar,  $\epsilon = 540\text{M}^{-1}$  y definiendo una unidad de actividad NAGK como los micromoles de NAG convertidos a 37°C en un minuto, calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{NAGK (mU/mg prot)} = \frac{A_{540} / \text{mg}_{\text{prot}}}{60 * 0.000000540}$$

**Soluciones empleadas****Tampón de lavado:**

- |                 |      |
|-----------------|------|
| ✓ Tris 1M pH7.2 | 10mM |
| ✓ NaCl 500mM    | 50mM |

**Tampón de extractos:**

- |                        |       |
|------------------------|-------|
| ✓ Tris 1M pH7.2        | 50mM  |
| ✓ NaCl 500mM           | 50mM  |
| ✓ MgCl <sub>2</sub> 2M | 10 mM |

**Tampón de reacción (TR):**

- |                     |      |
|---------------------|------|
| ✓ Hydroxilamina HCl | 1M   |
| ✓ Tris              | 1M   |
| ✓ MgCl <sub>2</sub> | 50mM |

Ajustar hasta pH 7.5 con HCl

**Tampón de reacción completo (TRC):**

- |             |          |
|-------------|----------|
| ✓ TR        | 2.625 ml |
| ✓ ATP 0.5M: | 300 µl   |
| ✓ DTT 100mM | 75 µl    |
| ✓ NAG-L     | 57 mg    |

**Solución de STOP:**

- |  |      |
|--|------|
| ✓ FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 1M   |
| ✓ Ácido tricloroacético (TCA)          | 8%   |
| ✓ HCl                                  | 0.3M |

**3.5 Purificación y análisis de proteínas****3.5.1 Sobreexpresión y purificación de proteínas de fusión a la GST****3.5.1.1 SOBREEXPRESIÓN A PEQUEÑA ESCALA PARA EL ANÁLISIS DE CLONES**

Se llevaba a cabo para comprobar que la proteína se sobreexpresaba



correctamente y en la fracción soluble. Para ello, se inoculaban 5 ml de LB ampicilina con la estirpe de *E. coli* que porta el plásmido de sobreexpresión y se cultivaba durante 16 horas a 30°C en agitación. Se diluían 300 µl del cultivo en 5 ml del mismo medio, por duplicado, y se cultivaban a 30°C en agitación hasta que el cultivo alcanzara una  $DO_{600}$  entre 0.4 y 0.6. A uno de los dos cultivos se le añadía IPTG a una concentración final de 1mM y se incubaba durante 3 horas a 30°C en agitación. Tras ello, se centrifugaban los cultivos a 5000 r.p.m. a 4°C durante 5 minutos, se resuspendía el pellet en 1 ml de Tris-NaCl-Glicerol y se volvía a centrifugar en las mismas condiciones. El pellet se congelaba en nitrógeno líquido y, tras ello, se resuspendía en 1 ml de HEPES-NaCl-Glicerol. Se añadían 10 µl de PMSF 100mM tras lo cual se sonicaba la suspensión celular durante 10 segundos en pulsos el 50% del tiempo, manteniendo el tubo en hielo. Del extracto total obtenido tras la sonicación se tomaba una muestra de 50 µl y el resto se centrifugaba a 11000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos. Se separaba el sobrenadante o fracción soluble a un nuevo tubo y el pellet se resuspendía en 1 ml de HEPES-NaCl-Glicerol.

#### 3.5.1.2 SOBREEXPRESIÓN A GRAN ESCALA PARA LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se preparaba un preinóculo de 12 ml de LB ampicilina de la estirpe de *E. coli* que porta el plásmido de sobreexpresión y se incubaba durante toda la noche a 30°C en agitación orbital. Se inoculaban 200 ml de LB ampicilina con 12 ml del cultivo anterior y se cultivaba a 30°C en agitación hasta que el cultivo alcanzara una  $DO_{600}$  entre 0.4 y 0.6. Se centrifugaba el cultivo a 5000 r.p.m. a 4°C durante 5 minutos, se resuspendía el pellet en un volumen total de 40 ml de Tris-NaCl-Glicerol y se volvía a centrifugar en las mismas condiciones. El pellet se congelaba en nitrógeno líquido y, tras ello, se resuspendía en 40 ml de HEPES-NaCl-Glicerol, repartido en dos tubos de 20 ml. Se añadían 200 µl de PMSF 100mM a cada tubo tras lo cual se sonicaba la suspensión celular 2 veces durante 2 minutos en pulsos el 50% del tiempo, manteniendo el tubo en hielo. El sonicado de células se centrifugaba a 11000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos. Se separaba el sobrenadante o fracción soluble a un nuevo tubo que se clarificaba mediante centrifugación a 20000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. Se pasaba el

sobrenadante a un nuevo tubo. Ésta era la fracción que se empleaba para la purificación de la proteína sobreexpresada.

### Composición de las soluciones empleadas

#### Tris-NaCl-Glicerol:

✓ Tris-HCl pH 7.5	10mM
✓ NaCl	50mM
✓ Glicerol	10%

Usar frío

#### HEPES-NaCl-Glicerol:

✓ HEPES pH 7.5	50mM
✓ NaCl	50mM
✓ Glicerol	10%

Usar frío

### 3.5.1.3 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN A GST

La purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad en un equipo automatizado de cromatografía líquida a baja presión o FPLC, BiologicLP del fabricante BioRad, usando columnas de 1 ml GSTtrapFF del fabricante Amersham Biosciences.

El tampón de equilibrado y lavado de la columna era PBS con la siguiente composición:

✓ NaCl	1.4M
✓ KCl	27mM
✓ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	101mM
✓ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18mM

Ajustar el pH a 7.3

La composición del tampón de elución era: Glutación reducido 10mM, Tris 50mM a pH 8.

### 3.5.2 Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se realizaron electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida a una

concentración del 12%, 15% o 17% de gel separador o running gel y a una concentración del 4% en el gel concentrador o stacking gel (Laemmli 1970).

#### **Gel separador (running gel):**

✓ 1.5M Tris pH 8.8	1.25 ml
✓ 10% SDS	50 $\mu$ l
✓ 10% APS	25 $\mu$ l
✓ TEMED	2.5 $\mu$ l
✓ 40% Acrilamida:Bisacrilamida 37.5:1	Según el porcentaje del gel
✓ H <sub>2</sub> O	Hasta 5 ml

#### **Gel concentrador (stacking gel):**

✓ 0.5M Tris pH 6.8	600 $\mu$ l
✓ 10% SDS	25 $\mu$ l
✓ 10% APS	13 $\mu$ l
✓ TEMED	2.5 $\mu$ l
✓ 40% Acrilamida:Bisacrilamida 37.5:1	250 $\mu$ l
✓ H <sub>2</sub> O	1.6 ml

Las muestras se preparaban con tampón de muestra SDS- $\beta$ -mercaptoetanol y se hervían durante 5 minutos. Se usaban minigeles que se sometían a electroforesis en condiciones desnaturalizantes, en tampón tris-glicina con SDS, a un amperaje de 20 mA. Tras ello, y si éstos no se iban a transferir a membrana, se teñían con azul Coomassie.

#### **Soluciones empleadas**

##### **Tampón de muestra SDS con $\beta$ -mercaptoetanol:**

✓ Tris:HCl 0.5M pH 6.8	1 ml
✓ SDS 10%	1.6 ml
✓ $\beta$ -mercaptoetanol	0.4 ml
✓ Glicerol 100%	0.8 ml
✓ Azul de bromofenol	0.0001 g
✓ Agua	4 ml

**SDS-Running buffer (Tampón SDS Tris-Glicina) 5X:**

✓ Tris	15 g
✓ Glicina	72 g
✓ SDS	5 g
✓ Agua	hasta 1 l

**3.5.3 Cambio de tampón de disoluciones de proteínas mediante columnas HiTrapDesalting**

Para cambiar de tampón disoluciones de proteína se utilizaban las columnas HiTrap Desalting de un volumen de 5 ml con matriz de Sephadex G-25 del fabricante Amersham Biosciences. Se empleaban jeringas para inyectar los tampones y la muestra en la columna. Para pasar la proteína del tampón A al tampón B se inyectaban en la columna, en este orden, 25 ml de tampón B, un máximo de 2 ml de muestra en tampón A y 2.5 ml de tampón B para la elución. La elución se recogía en fracciones de aproximadamente 0.5 ml. Para su cuantificación, se hacía un ensayo de Bradford con las fracciones eluidas.

**3.5.4 Cuantificación de proteínas mediante Bradford**

Para la cuantificación de proteínas en una muestra se empleaba el método de Bradford elaborando una recta de calibrado con concentraciones conocidas de BSA. Para esto, se preparaban 10 tubos con concentraciones de 0, 1, 2, 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g}$  de BSA en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  de agua y paralelamente los tubos con la muestra, también en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$  de agua. A cada una de las muestras le eran añadidos 800  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford del fabricante BioRad y se mezclaba, finalmente se medía la absorbancia a 595 nm.

**3.5.5 Interacción entre GST:PipX y PII mediante GST pulldown****3.5.5.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS TOTALES DE PROTEÍNA**

Se recogían las células de un volumen de cultivo en BG11 correspondiente a 200  $\mu\text{g}$  de clorofila, mediante centrifugación durante 8 minutos

a 8000 r.p.m. a 4°C. Se usaban 100 µg de clorofila de células por cada experimento que se iba a hacer, en este trabajo se hicieron dos, uno con GST:PipX y un control con GST. El pellet de células se resuspendía en 600 µl de tampón de unión por cada 100 µg de clorofila o experimento, se añadían 1.2 µl de lisozima (100 mg/ml) y se incubaba en hielo durante 30 minutos. Tras ello, se añadían 6 µl de PMSF 100mM y se sonicaba en un tubo eppendorf 2 veces durante 10 segundos el 50% del tiempo, manteniendo el tubo en hielo.

### 3.5.5.2 INCUBACIÓN Y CO-ELUCIÓN

Para realizar el pulldown, o co-elución, se incubaban 100 µl del extracto proteico junto con 100 µg de proteína GST:PipX o GST y 380 µl de tampón de unión 5X, en presencia de 1mM de DTT, en un volumen total de 2 ml, durante 2 horas a 4°C en agitación orbital. Se equilibraba una columna GSTtrapFF del fabricante Amersham Pharmacia inyectando con una jeringa 5 ml de tampón de unión. Posteriormente se inyectaban los 2 ml de muestra. Tras ello, nuevamente 5 ml de binding buffer y, finalmente, la elución se hacía con 2.5 ml de tampón de elución y se recogía en dos o tres tubos eppendorf. La columna se reequilibraba con 5 ml de tampón fosfato (PBS).

#### **Soluciones empleadas**

##### **Tampón de unión 5X:**

✓ HEPES:NaOH pH 7.8	125mM
✓ KCl	500mM
✓ MgCl <sub>2</sub>	25mM
✓ DTT	5mM

Los tampones de elución y PBS, tenían la misma composición que los descritos anteriormente

### 3.5.5.3 INMUNODETECCIÓN DE LA INTERACCIÓN CON PII

La comprobación de la interacción GST:PipX con PII se basaba en la inmunodetección de PII en las eluciones de pulldown.

Se hacía SDS-PAGE en un minigel de poliacrilamida (37.5 Acrilamida:1 Bisacilaminda) al 17% de las siguientes muestras: 10 µl de extracto total, 1 µg

de proteína GST:PipX, 1  $\mu$ g de proteína GST, aproximadamente 100 ng de proteína His-P11, 10  $\mu$ l de eluido de pulldown con GST:PipX y 10  $\mu$ l de eluido de pulldown con GST. Para la electroforesis, el gel se sometía a un amperaje constante de 20 mA. Tras ello, se equilibraba el gel en tampón Towbin 1X durante 15 minutos. Se hidrataba una membrana de PVDF de 0.2 mm del fabricante BioRad pasándola por metanol y agua durante varios segundos y se equilibraba en tampón Towbin 1X durante 15 minutos. Posteriormente, se realizaba una electrotransferencia del gel a esta membrana en condiciones semi-secas por corriente empleando el equipamiento Hoefer SemiPhor™ del fabricante Amersham Pharmacia. La intensidad de corriente se calculaba multiplicando 0.8 por la superficie de la membrana en centímetros. Posteriormente, se bloqueaba la membrana con 2.5% de BSA en tampón TTBS a 4°C durante toda una noche. Se incubaba, la membrana bloqueada, con anti-P11 de *Synechococcus* (cedido por K. Forchhammer) de conejo en una dilución 1:10000 en tampón TTBS con leche en polvo al 0.5%, a 30°C durante 3 horas en agitación orbital. Se lavaba, realizando tres enjuagues con TTBS, 15 minutos con 4 ml de TTBS y, por último, otros tres enjuagues con TTBS. Se incubaba con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con POD en una dilución 1:20000 en TTBS, durante 1 hora a 30°C. La membrana se lavaba en las mismas condiciones que el caso anterior. El western blot se revelaba empleando el juego de reactivos ECL plus de Amersham Biosciences, dejando pasar dos minutos tras la adición de los reactivos antes de escanear la emisión de fluorescencia con el equipamiento TYPHOON 9410 (Amersham Biosciences) empleando el filtro 520BP40Cy2Blue.

### Soluciones empleadas

#### TOWBIN 10X:

- |           |       |
|-----------|-------|
| ✓ Tris    | 250mM |
| ✓ Glicina | 1.92M |

#### TTBS:

- |                   |       |
|-------------------|-------|
| ✓ Tris:HCl pH 7.5 | 100mM |
| ✓ NaCl            | 0.9%  |

✓ Tween-20

0.1%

### 3.5.6 INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN AL DOMINIO GAL4BD EN EXTRACTOS TOTALES DE *S. cerevisiae*

Con el fin de verificar la correcta expresión de las proteínas de fusión al dominio de unión a DNA de la proteína GAL4 a partir de los plásmidos de doble híbrido se sometían extractos proteicos de *S. cerevisiae* a SDS-PAGE y western blot con anticuerpos anti-GAL4BD.

#### 3.5.6.1 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS

Se tomaban 2 unidades de  $DO_{600}$  de cultivo de levadura que sobreexpresa la proteína de fusión y se recogían las células por centrifugación a 3000 r.p.m. a 4°C durante 5 minutos. Se eliminaba el sobrenadante, se resuspendía el pellet en 100  $\mu$ l de sample buffer/SDS1X y se ponía rápidamente en hielo. Tras ello, se hervían las células durante 5 minutos y se volvía a poner rápidamente en hielo. Se añadían 200  $\mu$ l de perlas de circonio de 0.5 mm y se agitaban las muestras empleando un Mini Bead-Bitter, en los tubos adecuados, en dos ciclos de agitación durante 30 segundos e incubación en hielo durante 30 segundos. Tras ello, se colocaban los tubos a 100°C y se pasaban a hielo rápidamente tras lo que se centrifugaban durante 1 minuto a 13000 r.p.m. y se incubaban en hielo. Se sometían las muestras a SDS-PAGE en un minigel en el que se cargaban 20  $\mu$ l de la parte superior de éstas. Tras ello, el gel se equilibraba en tampón Towbin durante 15 minutos y se hidrataba una membrana de PVDF de 0.2 mm del fabricante BioRad manteniendo la membrana en metanol varios segundos y posteriormente en agua. La membrana se equilibraba también en el tampón de transferencia mediante incubación en el tampón Towbin durante 15 minutos y se realizaba la electrotransferencia en condiciones semi-secas como se ha descrito en el apartado 3.5.5.3.

#### 3.5.6.2 INMUNODETECCIÓN

Se equilibraba la membrana en tampón TBS durante 5 minutos y se incubaba durante toda la noche a 4°C o durante 1 hora a 37°C con la solución de bloqueo. Posteriormente, se incubaba durante 15 minutos a 37°C y después, durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-GAL4BD a

una dilución entre 1:50 y 1:200 en solución de incubación. Tras ello, se lavaba 3 veces durante 5 minutos con TBS. Se incubaba con el anticuerpo secundario conjugado a la POD a una dilución 1:5000 en un volumen total de 20 ml, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación orbital. Posteriormente, se lavaba la membrana con TBS 4 veces durante 5 minutos y en agua destilada una vez durante 15 minutos en agitación. El revelado se hacía cubriendo la superficie de la membrana que contiene las proteínas con la solución de revelado, y se incubaba a 37°C sin agitación. Finalmente, se lavaba con agua destilada y se dejaba secar en papel 3M.

### Soluciones empleadas

#### Solución de bloqueo:

- |                  |       |
|------------------|-------|
| ✓ Leche en polvo | 5%    |
| ✓ NONIDET        | 0.05% |
| ✓ En TBS 1X      |       |

#### Solución de incubación:

- |                  |      |
|------------------|------|
| ✓ TWEEN-20       | 0.1% |
| ✓ Leche en polvo | 2%   |
| ✓ En TBS 1X      |      |

#### Solución de revelado:

- |                        |                         |
|------------------------|-------------------------|
| ✓ Tris pH 9.5          | 100mM                   |
| ✓ NaCl 5M              | 100mM                   |
| ✓ MgCl <sub>2</sub> 2M | 5mM                     |
| ✓ NBT                  | 66 µl (50 mg/ml en DMF) |
| ✓ BCIP                 | 34 µl (50 mg/ml en DMF) |
| Agua destilada         | hasta 10 ml             |

## 3.5.7 Tinción de proteínas

### 3.5.7.1 TINCIÓN DE GELES CON AZUL COOMASSIE

Mediante esta tinción se visualizaban las proteínas en los geles. Se incubaba al menos durante 45 minutos con la solución de tinción y se dejaba desteñir varias horas hasta que se veían correctamente las bandas, renovando



varias veces la solución de desteñido. Ambos procesos se realizaban en agitación orbital.

### Soluciones empleadas

#### Solución de tinción:

✓ Azul R-250	0.25% (w/v)
✓ Metanol	40%
✓ Ácido Acético	10%

En Agua destilada

#### Solución de desteñido:

✓ Metanol	40%
✓ Ácido Acético	10%

En Agua destilada

### 3.5.7.2 TINCIÓN DE MEMBRANAS DE PVDF CON FAST GREEN

Mediante esta tinción se visualizaban las proteínas transferidas a una membrana de PVDF. Tras ser desteñida la membrana, ésta puede ser utilizada para inmunodetección. Se incubaba la membrana durante 5 minutos con solución de tinción y posteriormente se hacían 3 lavados de 5 minutos con la solución de desteñido.

### Soluciones empleadas

#### Solución de tinción:

✓ Metanol	50%
✓ Ácido acético	10%
✓ Fast Green FCF	0.1%

#### Solución de desteñido:

✓ Etanol	20%
✓ Ácido acético	10%

## **3.6 Análisis de las secuencias de DNA y proteínas**

### **3.6.1 Identificación de ORF's en las bases de datos de secuencias**

Para identificar a que proteína u ORF presente en alguna de las bases de datos de secuencias correspondía o tenían mayor similitud las secuencias obtenidas en los escrutinios doble híbrido, se empleaba el programa BLAST.

### **3.6.2 Alineamiento múltiple de secuencias**

Los alineamientos múltiples de secuencias se realizaban empleando el programa CLUSTALX y se visualizaban con el programa BioEdit.

### **3.6.3 Construcción de árboles filogenéticos**

Los árboles filogenéticos se construían empleando el programa MEGA3.1 o el paquete de programas PHYLIP.

### **3.6.4 Comprobación de secuencias procedentes de clonaciones o mutagénesis**

Para comprobar la secuencia de los fragmentos de DNA clonados se realizaban alineamientos globales mediante el programa ALIGN entre la secuencia obtenida y la secuencia esperada. La secuencia esperada es la secuencia del fragmento silvestre clonada como se diseñó en el plásmido correcto.

### **3.6.5 Análisis de co-evolución**

#### **3.6.5.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE DOMINIOS Y PROTEÍNAS TRUNCADAS**

En este trabajo se emplearon las secuencias parciales de proteínas, correspondientes al dominio de unión a ATP de NblS, Hsp90, GyrB y SphS.

La región de unión a ATP de SphS se identificó por alineamiento con la secuencia NblS<sup>460-664</sup>. Para la obtención de los dominios de unión a ATP de las

proteínas GyrB y Hsp90 se identificaron los dominios en la base de datos SMART y se recortó la secuencia de la proteína por las posiciones indicadas.

### 3.6.5.2 CONSTRUCCIÓN DE MATRICES DE DISTANCIAS

Se construían matrices de distancias para su empleo en las estimaciones de co-evolución. Para ello, se alineaban las secuencias de las proteínas homólogas mediante el programa CLUSTALX con los parámetros por defecto, forzando el orden de las secuencias en la salida igual al de entrada, que era el mismo para todas las proteínas empleadas. A partir de este alineamiento se obtenía la matriz de distancias empleando el programa PROTDIST, del paquete PHYLIP v3.6, con matriz JTT.

### 3.6.5.3 MEDIDA DE LA CORRELACIÓN ENTRE DOS MATRICES DE DISTANCIAS

Para la medida de la correlación entre dos matrices de distancias se empleó el r.m.s.d. calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{rmsd} = \sqrt{\frac{2}{n(n-1)} \sum_{j=2}^{j=n} \sum_{i=1}^{i=j-1} (a_{ij} - b_{ij})^2}$$

donde  $n$  es el número de secuencias empleadas, es decir el número de cianobacterias incluidas en el análisis y  $a_{ij}$  y  $b_{ij}$  son valores correspondientes en las dos matrices.

### 3.7 Tabla de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	Utilidad principal
GLNB7942S49AF	5' CGCTATCGCGGCGCGGAATACACGGTT 3'	Mutación puntual PII
GLNB7942S49AR	5' AACCGTGTATTCCGCGCCGCGATAGCG 3'	"
GLNB7942S49DF	5' CGCTATCGCGGCGACGAATACACGGTT 3'	"
GLNB7942S49DR	5' AACCGTGTATTGTCGCGCCGCGATAGCG 3'	"
GLNB7942S49EF	5' CGCTATCGCGGCGAGGAATACACGGTT 3'	"
GLNB7942S49ER	5' AACCGTGTATTCCCTCGCCGCGATAGCG 3'	"
NBLR-1F	5' GAGTGAGGAAGAATTCTGATCGCGCCAGCCTC 3'	Construcciones NblR
NBLR3	5' GGCAGCGCAGTCGACTTTGAAGCCATG 3'	"
NBLS-1F	5' GAGCAGCTGAATTCGCTGGCCCTTTGG 3'	Construcciones NblS
NBLS-1R	5' GGTGAAGCGGGTCGACTAGCCGGTGC 3'	"
NBLS-2F	5' GCCGCCAGACCATGGATGAATTCCTCCGAAAAGC 3'	Construcciones NblS <sup>Δ(1-272)</sup>
NRTC-2F	5' GTCGCAGCAGAATTCGTCCGACTGG 3'	Construcciones NrtC <sup>Δ(1-271)</sup>
NRTC-2R	5' GCAGTCATGGTCGACACCTAGGCAGAG 3'	"
NTCA-1F	5' GCTGGCCAACGAGAATTCCTCTGCTG 3'	Construcciones NtcA
NTCA-1R	5' CCTCACACCTGTCGACTCCATGATGG 3'	"
PIP2-2R	5' CGAAGAGTTCCTTTGCTGTCCC 3'	PCR-walking
PIPX-4F	5' CAAATTGCCGAGCGGTTGGC 3'	"
TRANS P0-1	5' TCTAGATCGATGAATTCGATATC 3'	"
TRANS P0-2	5' GATATCGAATTCATCGATCTAGAGG 3'	"
PIPX-126-F	5' TAAAACTAGCCGCCCTTGC 3'	Secuenciar región genómica <i>pipX</i>
LCY-PIPX-1F	5' CTTGGCCTCGAGCATCTCTTTGG 3'	Clonar región genómica <i>pipX</i>
PIPX-5R	5' CAGCCCGCAAATCAGCAG 3'	Clonar región genómica <i>pipX</i>
PIPX-3X-1R	5' CTGCCTCTGAATTCCTAGCTGGCTACAG 3'	Construcción GST-PipX
PIPX-OV-2F	5' GAGAATTCGCTTCCGAGAACTACC 3'	Construcción GST-PipX
T7 UNIVERSAL	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	Secuenciar insertos del pBluescript
PGEXSEQ	5' GGGCTGGCAAGCCACGTTTTGGTG 3'	Secuenciar insertos del pGEX-3X
ACT-A	5' GAAGATACCCACCAAACCC 3'	Secuenciar insertos del pGAD424
ACT-B	5' CAGTATCTACGATTAATAG 3'	"
GBT-1F	5' GTGGAGACTGATATGCC 3'	Secuenciar insertos del pGBT9
GBT-1R	5' TAAAACCTAAGAATCAC 3'	"
TRANSADGBT-1F	5' CGCACATCATCATCGGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAA AGACAGTTCAGTATCGCCGAACCCAAAAAAGAGATCG 3'	Clonar insertos del pGAD424 en el pGBT9
TRANSADGBT-1R	5' ATAACCTATTTAATAATAAAAAATCATAAATCATAAGAAATT CGCCCGGAATTAGCTTGGCGTTTTTCAGTATCTACGATTC 3'	"

### 3.8 Tabla de plásmidos

Plásmido	Características relevantes	Origen o referencia
pBluescript SK(+)	Ap <sup>R</sup> , lacZ	Stratagene
pGEX-3X	tac::gst, lacZ <sup>f</sup> , Ap <sup>R</sup>	Amersham Pharmacia Biotech
pGAD424	GAL4(768-882), LEU2, Ap <sup>R</sup>	(Bartel 1993)
pGBT9	GAL4(1-147), TRP1, Ap <sup>R</sup>	"
pGAD424(+1)	Derivado de pGAD424 con pauta de lectura +1	(Roder et al. 1996)
pGAD424(+2)	Derivado de pGAD424 con pauta de lectura +2	"
pGBT9(+1)	Derivado de pGBT9 con pauta de lectura +1	"
pGBT9(+2)	Derivado de pGBT9 con pauta de lectura +2	"
pUAGC211	NtrB ( <i>E. coli</i> ):GAL4AD	(Martinez-Argudo et al. 2001)
pUAGC212	NtrB ( <i>E. coli</i> ):GAL4BD	"
pUAGC11	NtrC ( <i>E. coli</i> ):GAL4AD	"
pUAGC12	NtrC ( <i>E. coli</i> ):GAL4BD	"
pUAGC171	GlnB ( <i>E. coli</i> ):GAL4AD	(Martinez-Argudo et al. 2002)
pUAGC172	GlnB ( <i>E. coli</i> ):GAL4BD	"
pUAGC181	GlnK ( <i>E. coli</i> ):GAL4AD	(Salinas et al. 2003)
pUAGC182	GlnK ( <i>E. coli</i> ):GAL4BD	"
pUAGC1	GAL4AD:NblR	Este trabajo
pUAGC3	GAL4BD:NblR	"
pUAGC5	GAL4AD:NtcA	"
pUAGC7	GAL4BD:NtcA	"
pUAGC11	GAL4AD:PII	"
pUAGC12	GAL4BD:PII	"
pUAGC31	GAL4AD:NrtC <sup>Δ(1-272)</sup>	"
pUAGC32	GAL4BD:NrtC <sup>Δ(1-272)</sup>	"
pUAGC51	GAL4AD:NblS <sup>Δ(1-271)</sup>	"
pUAGC52	GAL4BD:NblS <sup>Δ(1-271)</sup>	"
pUAGC53	GAL4AD:NblS	"
pUAGC54	GAL4BD:NblS	"
pUAGC81	GAL4AD:PIP1	"
pUAGC91	GAL4AD:PIP3	"
pUAGC61	GAL4AD:NAGK	"
pUAGC62	GAL4BD:NAGK	"
pUAGC67	GAL4AD:NAGK <sup>11-301</sup>	"
pUAGC69	GAL4AD:NAGK <sup>47-301</sup>	"
pUAGC71	GAL4AD:PipX	"
pUAGC72	GAL4BD:PipX	"
pUAGC59	pipX	"
pUAGC59.1	pipX::Km	"
pUAGC99	GST-PipX	"



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **4.1 Interacciones doble híbrido entre componentes reguladores del metabolismo del nitrógeno en *Synechococcus***

### **4.1.1 Diseño de proteínas de fusión y ensayos de doble híbrido**

Los sistemas de regulación del metabolismo del nitrógeno a nivel transcripcional y a nivel de su asimilación a partir de fuentes sencillas de nitrógeno en *Synechococcus* han sido descritos hasta un cierto nivel de detalle (Herrero et al. 2001), pero aún se desconoce mucho sobre las interacciones proteína-proteína que subyacen a muchos de estos procesos. Con esta premisa, en este trabajo se intentó inicialmente identificar interacciones entre PII y proteínas reguladoras de *Synechococcus* implicadas en la regulación de la asimilación del nitrógeno, como NtcA y NrtC, y entre PII y proteínas implicadas en respuestas a estrés por carencia de nitrógeno como NblR y NblS. Para ello, empleamos el sistema del doble híbrido de levaduras que ha demostrado su validez en la identificación de interacciones entre proteínas reguladoras bacterianas, como por ejemplo miembros de sistemas de dos componentes y proteínas PII (Martinez-Argudo et al. 2002a; Martinez-Argudo et al. 2001; Martinez-Argudo et al. 2002b; Ohta et al. 2003; Salinas et al. 2003). Se realizaron diferentes construcciones, a partir de las cuales se expresan estas proteínas fusionadas a los dominios de GAL4, para su empleo en el sistema del doble híbrido de levaduras. Las estirpes de levaduras empleadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* Y187 y PJ696 que son auxótrofas de histidina y adenina y portadoras de fusiones transcripcionales cromosómicas entre un promotor controlado por GAL4 y un gen testigo. De forma general, se empleó la estirpe Y187 como portadora de los plásmidos derivados de pGBT9 (fusiones al dominio GAL4BD) y la estirpe PJ696 de los plásmidos derivados de pGAD424 (fusiones al dominio GAL4AD). El procedimiento empleado implicaba la conjugación en medio líquido de ambas estirpes y el análisis de la expresión de genes testigo en los diploides resultantes. Si se produce la interacción entre las

dos proteínas de fusión que se expresan en el diploide, se reconstituye la función del activador GAL4, expresándose los genes testigo *HIS3*, *ADE2* y *lacZ*, de manera que la levadura recupera la prototrofia a histidina y adenina, y sintetiza la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Cada pareja de fusiones proteicas a estudio se nombraron siempre como GAL4AD:X/GAL4BD:Y, donde X e Y son los polipéptidos cuya interacción se está estudiando. En ninguna de las fusiones utilizadas en este trabajo se observó autoactivación, que es la capacidad de una proteína de fusión de activar por sí sola a los genes testigo controlados por GAL4.

#### 4.1.2 Interacciones entre proteínas PII

La proteína PII de *Synechococcus* es un trímero en estado nativo (Forchhammer et al. 1994) y puede formar heterotrímeros con sus homólogas de *E. coli* (Forchhammer et al. 1999).

Las interacciones entre GlnB y GlnK de *E. coli* son detectables en el sistema del doble híbrido (Martinez-Argudo et al. 2002b), por lo que fueron empleadas como controles positivos en los ensayos realizados entre proteínas PII. Con el fin de comprobar que la asociación entre monómeros de PII de *Synechococcus* es igualmente detectable mediante este sistema y validar esta proteína de fusión como cebo para los escrutinios de genotecas, se construyeron las proteínas de fusión de PII a los dominios de GAL4. Los plásmidos pUAGC11 y pUAGC12, que expresan las proteínas GAL4AD:PII y GAL4BD:PII en el diploide, le confirieron la capacidad de crecer en medios sin histidina y/o sin adenina y de producir la enzima  $\beta$ -galactosidasa, detectable mediante un ensayo de actividad enzimática en placa en presencia de X-gal. La cuantificación de la expresión del gen testigo *lacZ* se estimó mediante la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en líquido (figura 4.1). Cultivos de un clon de PJ696 que expresan las dos proteínas de fusión, se incubaron con ONPG como sustrato de la enzima. Ya que el ensayo con el resto de proteínas empleadas dio resultados negativos, la interacción detectada de PII consigo misma se consideró específica (tabla 4.2). El motivo estructural implicado en la



interacción con los receptores de PII (T-loop) no participa en la oligomerización (Xu ActaCrist 03), por lo tanto, estos resultados no aseguraban que este motivo estuviera accesible para la interacción con los blancos de PII. A pesar de esto, la detección de la interacción heteróloga con GlnB y GlnK de *E. coli*, y la interacción de estas dos proteínas con uno de sus blancos, NtrB (tabla 4.2), apuntaban a un comportamiento adecuado de PII de *Synechococcus* en el sistema del doble híbrido para la búsqueda de interacciones mediante el escrutinio de genotecas.

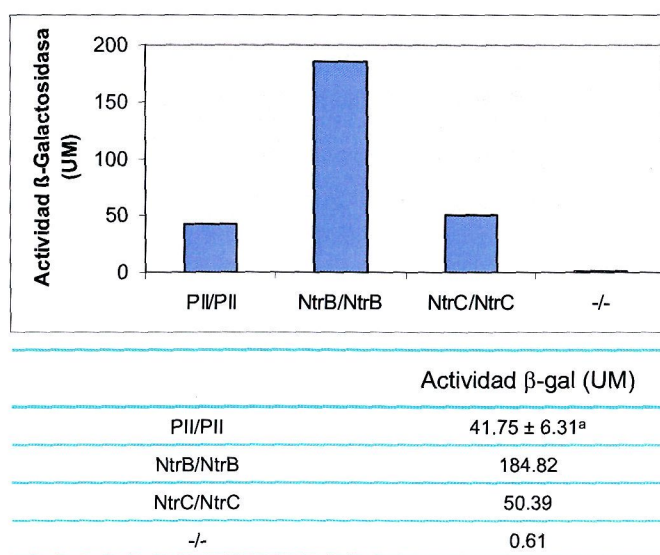


Figura 4.1. Cuantificación de la expresión de la fusión transcripcional UASGAL7-*lacZ* en la estirpe PJ696 mediante un ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. En la tabla se muestra la media y la desviación típica de los valores obtenidos para cuatro clones independientes, excepto para los controles en los que se representa el valor obtenido de un clon representativo. -/- significa ausencia de proteína fusionada a los dominios GAL4AD/GAL4BD.

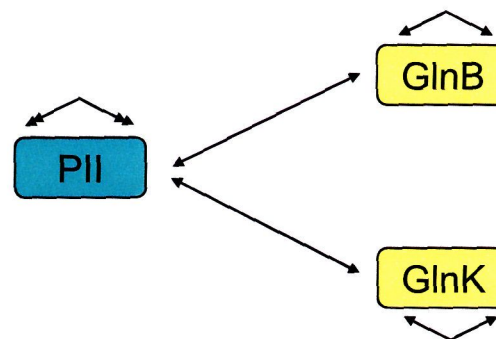


Figura 4.2. Interacciones entre proteínas PII. PII hace referencia a PII de *Synechococcus*, GlnB, y GlnK a las correspondientes proteínas de *E. coli*. El sentido de las flechas es desde la proteína de fusión a GAL4BD hasta la proteína de fusión a GAL4AD. El número de puntas de flecha es proporcional a la intensidad de la interacción, de manera que cada punta de flecha se corresponde con un signo + en el apartado 4.1.6.

### 4.1.3 ¿Interacciona PII físicamente con las proteínas NtcA y NrtC<sup>Δ(1-272)</sup>, implicadas en la represión por amonio?

La proteína NtcA de *Synechococcus* juega un papel central en la regulación a nivel transcripcional de la asimilación de fuentes de nitrógeno en cianobacterias. Está implicada en la regulación de la transcripción de numerosos genes entre los que se incluyen genes reprimibles por amonio (Luque et al. 1994; Vega-Palas et al. 1992) y el gen *nblA* (Luque et al. 2001) que participa en el proceso de clorosis (Collier et al. 1994). NtcA responde a los niveles de 2-OG (Omata 1995; Vazquez-Bermudez et al. 2002) y está sometida a una regulación por PII en condiciones de carencia de nitrógeno (Fadi Aldehni et al. 2003; Paz-Yepes et al. 2003). Con el fin de investigar si esta relación entre PII y NtcA implicaba una interacción directa se ensayó la unión PII-NtcA. Ninguna de las dos parejas de proteínas de fusión permitió la activación de ninguno de los tres genes testigo en el diploide, no obteniéndose, por tanto, evidencia alguna de interacción física entre PII y NtcA. NtcA es un dímero (Luque et al. 1994) en estado nativo, y esta dimerización no ha podido ser detectada en el doble híbrido. Puesto que las construcciones de NtcA se expresan adecuadamente ya que se detecta interacción con otras proteínas (ver más adelante), es de suponer que en la proteína de fusión, los dominios determinantes de la dimerización de NtcA no están accesibles o en la conformación adecuada.

NrtC es un miembro del transportador de tipo ABC (ATP Binding Cassette) de nitrato y nitrito, compuesto por las proteínas NrtA, NrtB, NrtC y NrtD. En *Synechococcus*, este transportador es inhibido por amonio, fenómeno dependiente del dominio C-terminal de NrtC (Kobayashi et al. 1997), que incluye los aminoácidos desde el 279 hasta el 659, y de la proteína PII y su estado de modificación (Lee et al. 2000; Lee et al. 1998). Se investigó la posible implicación de una interacción física entre PII y la proteína truncada NrtC<sup>Δ(1-272)</sup> que se corresponde con el dominio C-terminal implicado en la regulación de la actividad del transportador. No se detectó activación de los genes testigo en los

clones portadores de las parejas de proteínas de fusión, no obteniéndose así, evidencias de unión entre estas dos proteínas.

Ya que la inhibición del transportador de nitrato Nrt en presencia de amonio es dependiente de la presencia de PII pero independiente de su estado de fosforilación (Lee et al. 2000), es de suponer que la propia PII al fosforilarse no deja de inhibir sino que debe ser otro componente de unión a PII, el que detecte que está fosforilado y libere la inhibición. En este sentido, puede existir una proteína que se una a PII como componente adicional en la regulación llevada a cabo por NrtC y PII. El resultado obtenido estaría de acuerdo con una interacción indirecta entre las dos proteínas.

Se investigó la expresión de las proteínas GAL4BD:NrtC<sup>Δ(1-272)</sup> y GAL4BD:PII en la levadura mediante Western Blot detectándose la proteína de fusión GAL4BD:PII en PJ696 pero no GAL4BD:NrtC<sup>Δ(1-272)</sup>. Se utilizaron extractos proteicos totales de varios clones de PJ696. En estos extractos, se analizó la expresión de la proteína de fusión mediante SDS-PAGE y Western Blotting con anticuerpos anti-GAL4BD. Se empleó un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y como sistema de detección, los substratos NBT/BCIP. En todos los clones analizados portadores del plásmido pUAGC12 se observó una banda de aproximadamente 30 KDa correspondiente a la suma de las masas moleculares de GAL4BD (18 KDa) y PII (12 KDa), y no se observó una banda de 60 KDa correspondiente a la suma de las masas de GAL4BD y NrtC<sup>Δ(1-272)</sup>. Este resultado podría implicar que la proteína NrtC<sup>Δ(1-272)</sup> no se expresa correctamente, a falta de evidencias de interacción con ninguna proteína empleada.

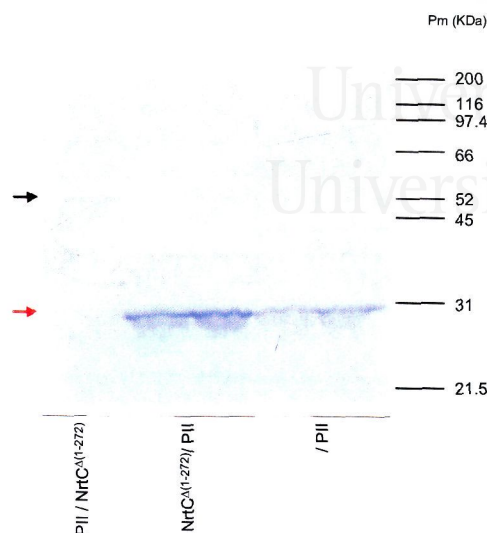


Figura 4.3. Western Blot para detectar la expresión de proteínas de fusión a GAL4BD. Cada calle contiene el extracto proteico de la estirpe de levadura que expresa cada una de la/s proteínas(s) de fusión. Se indica con una flecha roja la posición de la banda que correspondería a la proteína de fusión GAL4BD:PII, y con una flecha negra a una proteína de 52 KDa.

#### 4.1.4 ¿Interacciona PII con la histidina quinasa NbIS, implicada en la inducción de clorosis en condiciones de carencia de nitrógeno?

La proteína NbIS es una histidina quinasa implicada en el fenómeno de clorosis por estrés provocado por carencia de nutrientes, fundamentalmente de nitrógeno, y otros factores como la alta luminosidad (van Waasbergen et al. 2002). Se desconoce cual es la señal molecular que "informa" a NbIS de la ausencia de fuente de nitrógeno y nos preguntamos si PII, que tiene un papel central en la señalización del nitrógeno en otros sistemas, podría estar implicada en este proceso mediante interacción proteína-proteína. Se empleó una versión truncada de NbIS que carece de los primeros 271 aminoácidos ( $NbIS^{\Delta(1-271)}$ ), los cuales contienen las regiones hidrofóbicas transmembrana y un dominio "HAMP linker". Esta proteína mantiene el dominio PAS y el dominio histidina quinasa, y carece de grandes zonas hidrofóbicas que pudieran interferir en la funcionalidad de la proteína en el núcleo (hidrófilo) de la levadura. Las proteínas NbIS y PII, que interaccionan específicamente con otras proteínas en el doble híbrido (Burillo et al. 2004; Espinosa et al.), resultaron no interaccionar entre sí en este sistema.

#### 4.1.5 ¿Interaccionan las proteínas NbIR y NbIS, implicadas en la inducción de la clorosis en condiciones de carencia de nitrógeno, entre sí?

NbIR es un regulador de respuesta implicado en el proceso de clorosis por estrés o bleaching en *Synechococcus*, al igual que NbIS (Schwarz et al. 1998; van Waasbergen et al. 2002). Durante años se consideró que las interacciones entre sensor y regulador de respuesta de los sistemas de dos componentes bacterianos eran demasiado débiles como para ser detectadas mediante el doble híbrido, aunque posteriormente diversos estudios han demostrado la utilidad de esta herramienta. Concretamente, la histidina quinasa NtrB y el regulador de respuesta NtrC, interaccionan de forma específica en el sistema del doble híbrido de levaduras (Martínez-Argudo et al. 2001; Martínez-Argudo et al. 2002b).

NbIS y NbIR están implicadas en el mismo proceso, a pesar de lo cual, no se tienen evidencias experimentales de que constituyan una pareja Sensor – Regulador de respuesta. Con la intención de identificar si constituyen un sistema de dos componentes se ensayó la interacción de NbIR con NbIS y con la proteína NbIS<sup>Δ(1-271)</sup> empleada anteriormente, no detectándose unión entre estas tres proteínas.

Aunque no se tienen evidencias de la estructura cuaternaria de la histidina quinasa NbIS y del regulador de respuesta NbIR, este tipo de proteínas son dímeros u oligómeros (Stock et al. 2000). En algunos reguladores de respuesta la activación de la proteína por fosforilación en un residuo conservado de ácido aspártico provoca un cambio conformacional que permite la dimerización (Birck et al. 1999). En otros casos como el de NtrC la proteína dimeriza antes de la activación por fosforilación y su interacción es detectable en el doble híbrido (Martínez-Argudo et al. 2001). Por lo tanto, la ausencia de interacción en el doble híbrido de levaduras de la pareja NbIR – NbIR, podría ser debida a que no se de, en este organismo, alguna modificación posttraduccional necesaria para la interacción. Es esperable, por otro lado, que la proteína NbIS dimerice. Puesto que existe una unión específica entre NbIS y SipA, una proteína de función

desconocida conservada en cianobacterias (Espinosa et al.), la ausencia de interacción NbIS – NbIS sugiere que los dominios determinantes de la dimerización no están accesibles o en la conformación adecuada en la proteína de fusión.

#### 4.1.6 Resumen de interacciones doble híbrido mediadas por reguladores del nitrógeno

Los resultados obtenidos en los ensayos del doble híbrido con las proteínas mencionadas en esta sección se muestran en la tabla 3.2. Además, se incluyen como controles positivos de interacción las proteínas NtrB y GlnB de *E. coli* (Martinez-Argudo et al. 2001), lo que permite comparar los resultados obtenidos con proteínas cuya intensidad de interacción en el sistema empleado es conocida. La intensidad de interacción se calificó en función del crecimiento del clon en medios sin adenina y/o sin histidina y de su actividad  $\beta$ -galactosidasa, como -: no interacción, +: débil pero significativo, ++: fuerte y +++: muy fuerte.

GAL4BD										
GAL4AD	PII	NtcA	NbIR	NbIS	NbIS $\Delta$ (1-271)	NrtC $\Delta$ (1-272)	NtrB	GlnBcoli	GlnKcoli	
PII	++	-	-	-	-	-	-	+	+	
NtcA	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	
NbIR	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	
NbIS	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	
NbIS $\Delta$ (1-271)	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	
NrtC $\Delta$ (1-272)	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	
NtrB	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	
GlnBcoli	+	-	ND	-	-	ND	+++	+	+	
GlnK	+	ND	ND	ND	ND	ND	+++	+	+	

Tabla 4.2. Interacciones entre las proteínas indicadas de *Synechococcus*. En la horizontal se representan las fusiones proteicas al dominio GAL4BD y en la vertical al GAL4AD. La intensidad de interacción queda representada por el número de +.

Así pues, exceptuando la oligomerización de PII, no se detectó ninguna interacción entre las proteínas de fusión construidas. Aunque es necesario ser cautos con los resultados negativos, estos resultados subrayan la complejidad de la red de transducción de señales del nitrógeno en la que obviamente faltan

componentes por identificar. Por otra parte, los resultados obtenidos con PII, confirmaron el buen funcionamiento de este tipo de proteínas en el doble híbrido. Esto, y especialmente el papel como unidad de procesamiento central, sugerido en enterobacterias (Ninfa et al. 2000), hacían de PII la proteína ideal para ser utilizada como cebo a fin de identificar nuevos componentes de la red de interacciones proteicas del metabolismo del nitrógeno.

## **4.2 Genotecas de expresión y su escrutinio mediante el sistema del doble híbrido con la proteína PII como cebo**

Las proteínas PII caracterizadas en otras bacterias interaccionan con diferentes proteínas implicadas en la asimilación de compuestos nitrogenados y en su regulación. En este contexto, la identificación de proteínas que interaccionan con PII de *Synechococcus* parecía un objetivo razonable, aún más cuando interacciones caracterizadas de enterobacterias se detectan en el doble híbrido (Martinez-Argudo & Contreras 2002a; Martinez-Argudo et al. 2002b) y las fusiones proteicas GAL4BD:PII y GAL4AD:PII interaccionan entre sí específicamente en este sistema.

El objetivo propuesto implica la construcción de genotecas con DNA genómico de *Synechococcus* y su posterior escrutinio en levaduras usando GAL4BD:PII como cebo.

### **4.2.1 Consideraciones generales: Genotecas de expresión y fragmentación enzimática**

Las genotecas construidas en este trabajo son genotecas de expresión, por lo tanto para estimar la calidad de las genotecas son necesarias consideraciones adicionales al hecho de que esté representado todo el genoma en los clones que las constituyen. Se espera que la genoteca contenga todos los fragmentos que expresan los dominios de interacción de todas las proteínas codificadas, lo cual implica un mayor número de clones que los necesarios para representar todo el genoma ya que no todos los fragmentos que contengan estos dominios se dispondrán en la fase adecuada para que tenga lugar su

expresión como proteína de fusión. Otros factores pueden influir en que un dominio en particular no se exprese en este sistema como proteína de fusión como por ejemplo que vaya precedido de codones de stop en el fragmento que lo contiene. Por lo tanto, los dominios de interacción localizados en la región C-terminal de las proteínas tienen mayor probabilidad de ser expresados a partir de la genoteca ya que aguas-arriba contienen región codificante, que puede servir de inicio del fragmento. Por otro lado, la calidad de las genotecas construidas a partir de digestiones parciales está limitada por la frecuencia de corte de la enzima de restricción y por la presencia de sitios de corte en las posiciones adecuadas, lo que no sucede en genotecas por fragmentación mediante métodos físicos como la sonicación o pulverización. En cambio, el empleo de la digestión enzimática tiene la ventaja de que se pueden controlar más fácilmente las condiciones de fragmentación y se obtiene una mayor eficacia en la clonación de los fragmentos genómicos obtenidos.

Para compensar el factor no controlable de la falta de sitios de restricción en posiciones adecuadas, se realizaron genotecas con dos enzimas de restricción, *Sau3AI* y *Tsp509I*, estas dos enzimas poseen características diferentes. Al contrario que la diana de *Sau3AI* (GATC), la de *Tsp509I* (TTAA) tiene una secuencia que es 0% G+C, lo que hace que un genoma como el de *Synechococcus* (55% G+C) tenga potencialmente un menor número de sitios *Tsp509I* que *Sau3AI*, que se localizarán preferentemente en regiones pobres en pares G-C. Además, la diana de restricción TTAA contiene un codón de stop (UAA), por lo tanto, se espera también una disminución en 1/6 de estos sitios en regiones codificantes, correspondiente a una de las 6 pautas de lectura. Estos dos factores hacen que en las genotecas construidas con la enzima *Sau3AI* haya una mayor probabilidad de que quede representado un determinado dominio que interaccione con la proteína empleada como cebo, que en las construidas con la enzima *Tsp509I*.



#### 4.2.2 Construcción de genotecas de *Synechococcus*

En la figura 4.4 se esquematiza el proceso seguido para la construcción de genotecas genómicas de *Synechococcus* en *E. coli*. Se realizaron seis genotecas que se diferencian entre sí en la enzima empleada para la digestión del DNA genómico, en el rango de tamaño de los fragmentos empleados y en la fase de lectura en que se expresan los insertos clonados.

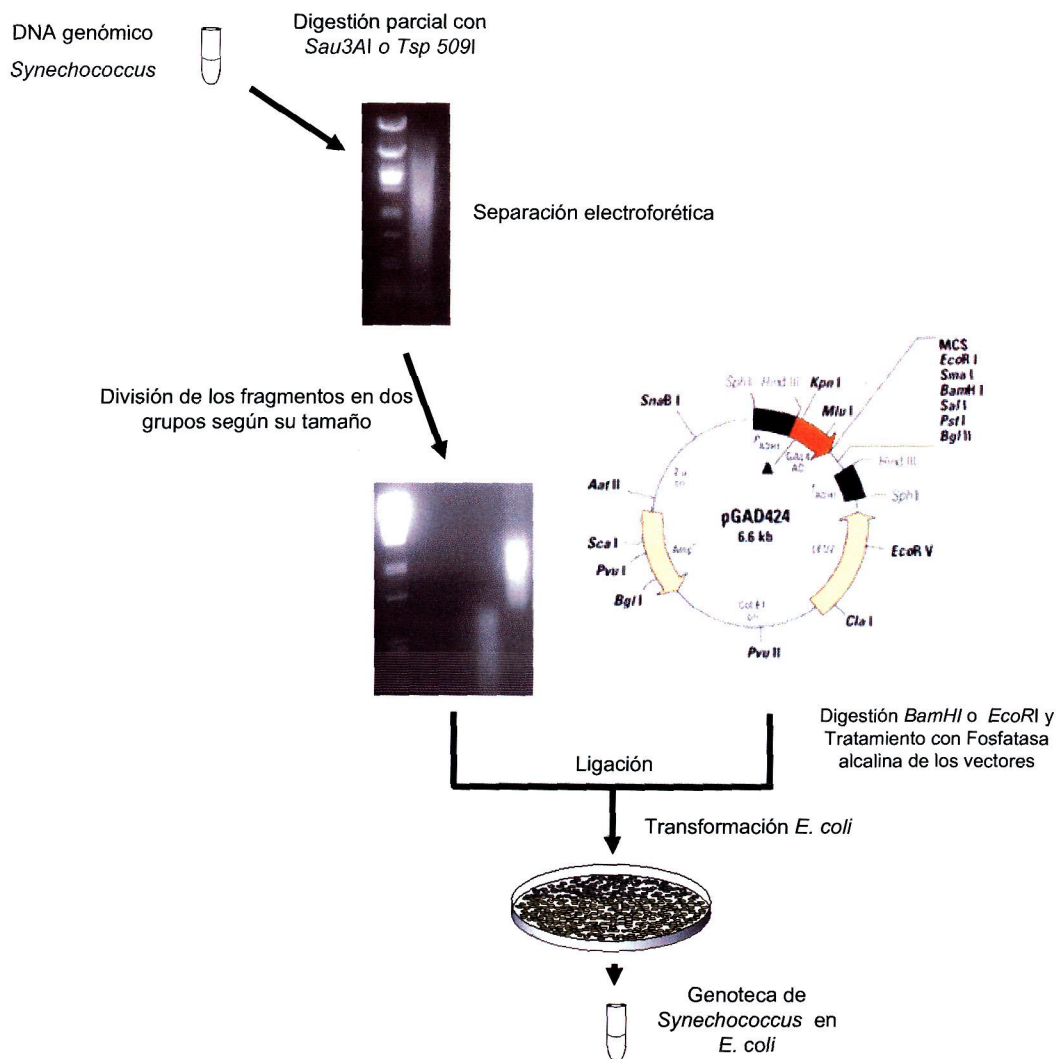


Figura 4.4. Esquema del procedimiento seguido para la construcción de las genotecas genómicas de *Synechococcus* en *E. coli*.

Para la construcción de las genotecas se partió de DNA genómico de *Synechococcus* digerido parcialmente y de forma independiente con las enzimas *Sau3AI* y *Tsp509I*. Cada digestión fue cargada en un gel y dividida en dos grupos, fragmentos de tamaño grande con un rango comprendido entre 0.8 y aproximadamente 2 Kb y fragmentos de tamaño pequeño con un rango comprendido entre aproximadamente 0.3 y 0.8 Kb. Cada uno de los tipos de fragmentos se clonó en una versión de pGAD424 (+0, +1 y +2), o con una mezcla equimolar de las tres versiones del vector, en fase con la pauta de lectura de GAL4AD. Se realizaron ligaciones independientes con cada uno de los tipos de fragmentos con el fin de evitar una sobrerrepresentación artefactual de los fragmentos genómicos pequeños. Se clonaron los fragmentos *Sau3AI* en vectores cortados con la enzima *BamHI* y los fragmentos *Tsp509I* en vectores cortados con *EcoRI*, que entre sí, tienen extremos compatibles. La mezcla de cada ligación se transfirió mediante electroporación a *E. coli* DH5 $\alpha$  y las colonias que crecieron en medio selectivo, que constituyen la genoteca, fueron recogidas en medio líquido LB. En la tabla 4.3 se resumen las características de las genotecas construidas.

GENOTECA	ENZIMA DIGESTIÓN	RANGO TAMAÑO FRAGMENTOS (Kb)	VECTORES	N.C.I.
G3	<i>Sau3AI</i>	0.35 – 0.8	pGAD424(+0)	5 x 10 <sup>5</sup>
G4	<i>Sau3AI</i>	0.35 – 0.8	pGAD424 (+1)	5 x 10 <sup>5</sup>
G5	<i>Sau3AI</i>	0.35 – 0.8	pGAD424 (+2)	5 x 10 <sup>5</sup>
G6	<i>Sau3AI</i>	0.8 - 2	pGAD424 (+0,+1,+2)	3 x 10 <sup>6</sup>
GT1	<i>Tsp509I</i>	< 0.8	pGAD424 (+0,+1,+2)	8 x 10 <sup>6</sup>
GT2	<i>Tsp509I</i>	> 0.8	pGAD424 (+0,+1,+2)	7 x 10 <sup>6</sup>

Tabla 4.3. Genotecas construidas. N. C. I. es el número de clones independientes que constituyen cada genoteca. La nomenclatura +0, +1 y +2, hace referencia a cada una de las tres versiones de los vectores empleados.

Las genotecas G3, G4 y G5, provienen de fragmentos pequeños obtenidos por digestión genómica con la enzima *Sau3AI*, de manera que cada una de ellas expresará los mismos insertos en una pauta de lectura diferente. La genoteca G6 contiene los fragmentos de mayor tamaño de la misma digestión.

En las genotecas G6, GT1 y GT2, la ligación se hizo con una mezcla en relación equimolar de las tres versiones de los vectores, con lo que se quedó una sola genoteca para cada grupo de tamaño de fragmentos.

Con el fin de obtener un rango de fragmentos entre 0.5 Kb y 2 Kb en las digestiones parciales de DNA genómico se optimizó la concentración de enzima *Sau3AI* en las reacciones. Para ello, se hicieron varias digestiones preparativas a pequeña escala (con 1  $\mu\text{g}$  de DNA genómico), manteniendo el tiempo y la temperatura de incubación constante y variando la concentración de enzima. Se realizaron digestiones empleando 3 U (Unidades), 0.3 U, 0.15 U, 0.06 U y 0.03 U de enzima por cada  $\mu\text{g}$  de DNA genómico digerido. Para la construcción de las genotecas se optó por emplear la concentración de enzima de 0.3 U por  $\mu\text{g}$  de DNA, ya que generaban fragmentos mayoritariamente de entre 0.6 y 0.9 Kb y hasta 1.7 Kb. El producto de la digestión de 10  $\mu\text{g}$  de DNA genómico, posteriormente, se dividió en dos grupos de tamaño (figura 4.5). Los fragmentos pequeños, menores de 0.8 Kb (figura 4.5, calle 1), se emplearon para las genotecas G3, G4 y G5. Los fragmentos grandes, mayores de 0.8 Kb (figura 4.5, calle 2) se emplearon para la genoteca G6. Ambos conjuntos de fragmentos solapan, de manera que entre las dos genotecas, cubren todo el rango de tamaños deseado.

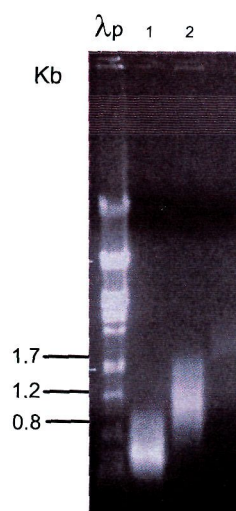


Figura 4.5. Gel de agarosa con los fragmentos de DNA de *Synechococcus* generados por digestión con *Sau3AI* que se emplearon en la construcción de las genotecas.  $\lambda\text{p}$ , marcador de tamaño, indicado en Kb.

Las genotecas GT1 y GT2 se construyeron con fragmentos de DNA generados por digestión con la enzima *Tsp509I*. Para obtener un rango de fragmentos aproximadamente igual al que se obtuvo de las digestiones *Sau3AI* se optimizó el tiempo de incubación con la enzima. Para ello, se realizaron digestiones preparativas, manteniendo constante tanto la concentración de enzima por cada  $\mu\text{g}$  de DNA como la temperatura de incubación. Se comprobó que tras 20 minutos de tiempo de digestión, la mayoría de los fragmentos tenían un tamaño entre 0.3 Kb y 2.5 Kb. La digestión así realizada, se dividió en dos, una parte conteniendo fragmentos grandes con un tamaño mayor de 0.8 Kb y otra los fragmentos menores de 0.8 Kb (figura 4.6). Cada uno de los grupos de fragmentos se empleó para construir una genoteca, de manera similar a como se hizo para la genoteca G6.

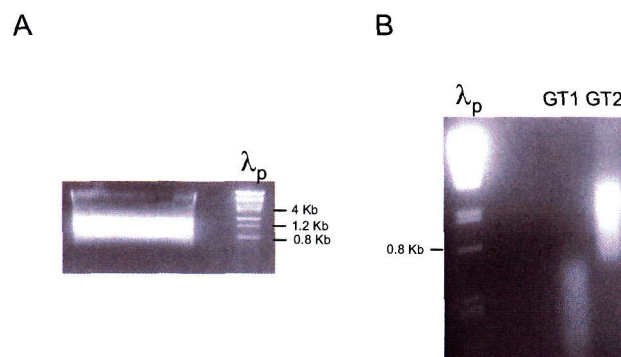


Figura 4.6. (A) Gel con la digestión parcial de DNA genómico de *Synechococcus* con la enzima *Tsp509I* (B) Muestra con los dos tipos de fragmentos genómicos empleados para la construcción de las genotecas GT1 y GT2.  $\lambda_p$ , marcador de tamaño, indicado en Kb.

Con el objetivo de examinar las características de las genotecas construidas, se realizó PCR de diez clones de cada genoteca empleando los cebadores ACTA y ACTB que flanquean el sitio de clonación. Los productos se cargaron en un gel de agarosa para analizar la presencia de DNA amplificado y su tamaño. En la figura 4.7 se muestra el gel obtenido a partir 9 clones de las genotecas GT1 y GT2. En las genotecas de fragmentos grandes (G6 y GT2), 80% de los clones proporcionaron productos de PCR de diferente tamaño. En las genotecas de fragmentos pequeños (G3, G4, G5 y GT1) el porcentaje ascendió al 95%. Este número es una estimación de la presencia de diferentes



fragmentos genómicos en la genoteca y es una comprobación de que los tamaños de los insertos representados son los esperados a partir de los fragmentos genómicos utilizados. Los resultados obtenidos mostraron que en las genotecas había diversidad de fragmentos y que éstos se correspondían con los tamaños de los fragmentos empleados en la construcción de cada genoteca.

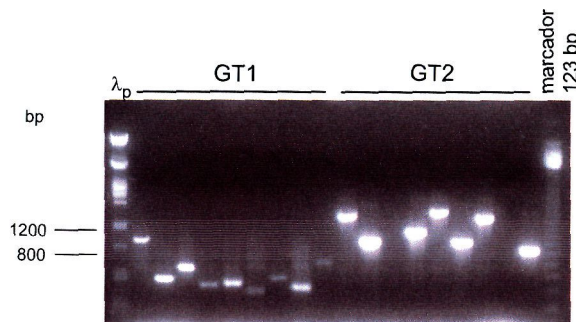


Figura 4.7. Gel de agarosa en el que se observan los productos de la amplificación por PCR de los insertos de 9 clones de las genotecas GT1 y GT2.  $\lambda_p$ , marcador de tamaño, indicado en bp.

### 4.2.3 Escrutinio de las genotecas con el cebo PII

El procedimiento seguido para la identificación de proteínas de *Synechococcus* que interactúan con PII se resume esquemáticamente en la figura 4.8.

Tras la transformación de la estirpe PJ696 portadora del cebo con DNA plasmídico proveniente de una de las genotecas, se seleccionaron los clones que crecieron en un medio selectivo para la interacción. En este trabajo se empleó como medio selectivo, el medio YNB sin histidina con 1mM de 3-AT. Estas condiciones se establecieron específicamente para los escrutinios realizados empleando la estirpe PJ696 y el plásmido cebo pUAGC12.

Se utilizó la siguiente nomenclatura para los clones y plásmidos que se fueron obteniendo durante el proceso de escrutinio:

- Clones totales: Clones capaces de crecer en medio YNB –leu – trp, su número viene determinado por la eficacia de la transformación.
- Clones candidatos: Clones obtenidos tras la selección inicial en medio YNB –his + 3-AT 1mM.

- Clones candidatos recomprobados: Clones candidatos que tras ser aislados de la selección inicial, son capaces de crecer en YNB sin histidina con 3-AT 1mM y/o sin adenina.
- Clones positivos recomprobados o presas: Clones que contienen el plásmido derivado de pGAD424, procedente de los clones candidatos recomprobados, y el plásmido pUAGC12 y que son capaces de crecer en los medios selectivos anteriores.
- Plásmido presa: Es el plásmido derivado de pGAD424 que portan los clones positivos y a partir del cual se expresa la proteína de fusión al péptido que interacciona con PII.
- Clones hermanos: Son clones candidatos o clones positivos que contienen el mismo inserto.

Tras realizar el escrutinio con cada una de las genotecas por separado, se obtuvieron inicialmente clones candidatos que crecen en medio sin histidina con 1mM de 3-AT. Estos clones fueron aislados y se recomprobó la capacidad de crecer en medios sin histidina con diferentes concentraciones de 3-AT y la capacidad de crecer en medio sin adenina, seleccionando así los clones candidatos recomprobados. Para facilitar el aislamiento de los plásmidos de la genoteca, el DNA proveniente de estos clones se transfirió a *E. coli* HB101, cuya auxotrofia para leucina es complementable por el gen marcador *LEU2* de pGAD424. Con el fin de verificar que la activación de los genes testigo es debida a la interacción entre las dos proteínas de fusión y excluir el efecto de posibles mutaciones, se repitió el ensayo de interacción cotransformando un nuevo clon de PJ696 con pUAGC12 y el plásmido proveniente de la genoteca. En estos transformantes, se volvió a analizar la interacción en medio selectivo sin histidina con 1mM de 3-AT y/o sin adenina, obteniéndose los clones positivos recomprobados o presas. Se descartaron clones idénticos mediante PCR y análisis de restricción. En el caso de los escrutinios con las genotecas G3, G4, G5 y G6 se descartaron estos clones de entre los clones positivos, en cambio en las genotecas GT1 y GT2, se hizo antes, analizando los clones candidatos con el fin de simplificar, ya que se obtuvo un mayor número de clones.

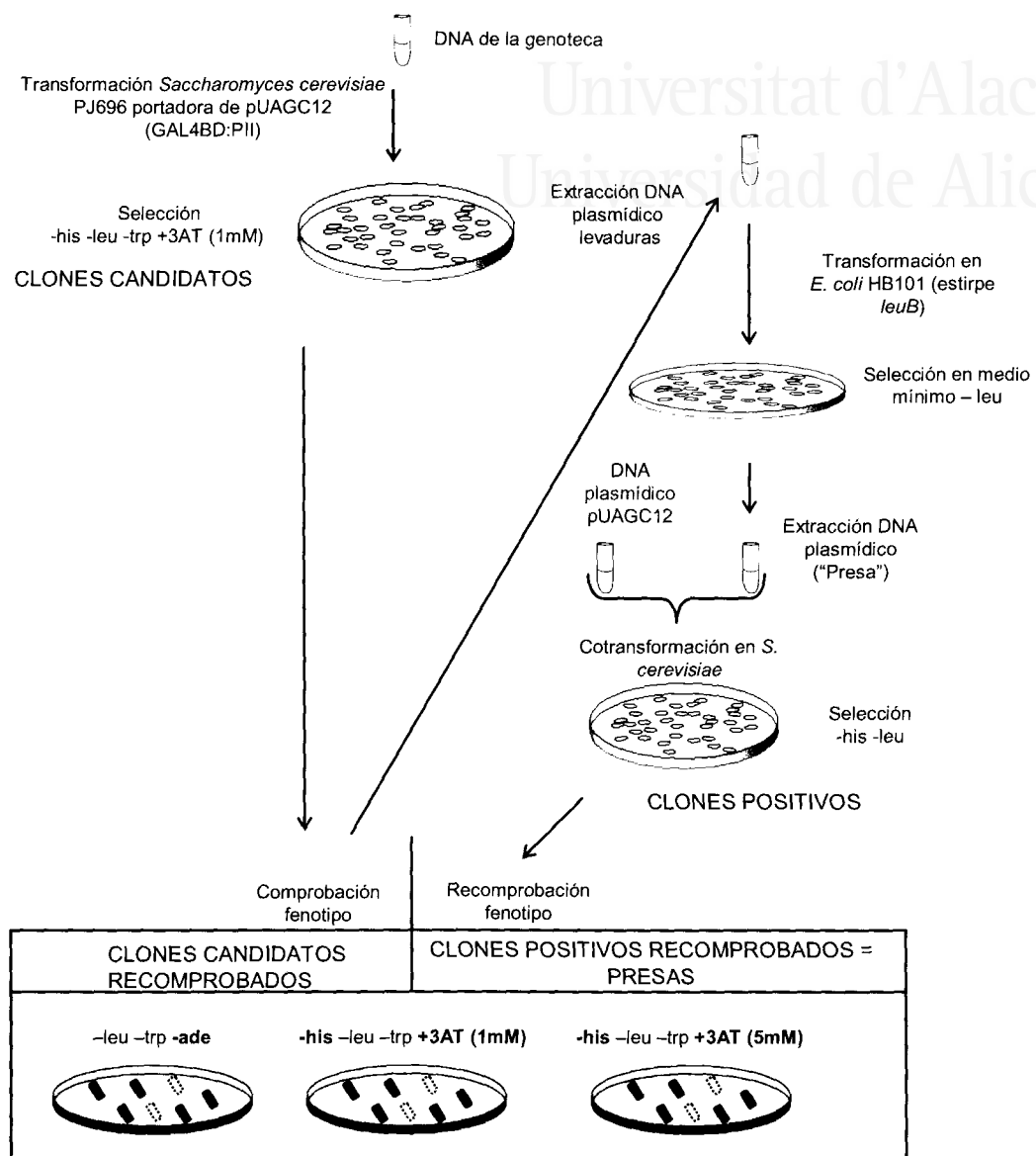


Figura 4.8. Esquema del procedimiento seguido para el escrutinio de genotecas por el sistema del doble híbrido.

#### 4.2.4 Rendimiento de los escrutinios y características de los clones obtenidos

En la tabla 4.4 se muestran las características de cada escrutinio y las presas que se obtuvieron en cada uno de ellos. La eficacia en la transformación se calculó como el número de clones que crecieron en el medio YNB  $-trp -leu$  por cada  $\mu g$  de DNA empleado en la transformación. A partir de la eficacia, se

calculó el número de clones totales.

La secuenciación de los insertos que mostraron características diferentes permitió la identificación de 4 ORF ("open reading frames" o marcos de lectura abierta) diferentes. De estos 4 ORF solo uno de ellos era el homólogo a una proteína de función conocida en otros organismos: ArgB (NAGK). Las otras tres eran proteínas de función desconocida con diferentes grados de conservación en otros organismos y se denominaron Pip1, Pip3 y PipX. También se obtuvo PII de *Synechococcus* como presa. Este era un resultado esperado ya que la enzima *Tsp509I* tiene sitios de corte que flanquean pero no interrumpen la ORF del gen *glnB* de *Synechococcus* muestra que esta enzima genera un fragmento que contiene toda la ORF de dicho gen.

ESCRUTINIO POR TRANSFORMACIÓN EN <i>S. cerevisiae</i> PJ696							
GENOTECA	EFICACIA (clones/ $\mu$ g DNA)	CLONES TOTALES	CANDIDATOS	RECOMPROBADOS	POSITIVOS IDENTIFICADOS		
					NÚMERO DE CLONES	INSERTO Kb	PROTEÍNA FUSIONADA
G3	2 x 10 <sup>5</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	14	10	1	1	GlnB Kpn
					9	0.9	NAGK
G4	2 x 10 <sup>5</sup>	5, x 10 <sup>6</sup>	14	9	9	0.9	NAGK <sub>11-301</sub>
G5	2 x 10 <sup>5</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	11	7	7	0.5	PipX
G6	2 x 10 <sup>5</sup>	5 x 10 <sup>6</sup>	10	7	7	2.7	Pip1
GT1	3 x 10 <sup>5</sup>	7,5 x 10 <sup>6</sup>	9(*) + 20(&)		8(*)	0.8	GlnB 7942
					20(&)	0,8	NAGK <sub>47-301</sub>
					14	0,8	NAGK <sub>47-301</sub>
GT2	3 x 10 <sup>5</sup>	7,5 x 10 <sup>6</sup>	44		3	3.2	Pip3
					17	0.8	GlnB 7942

Tabla 4.4. Resultados obtenidos en los escrutinios de doble híbrido. La eficacia de transformación de levaduras portadoras del plásmido pUAGC12 con las genotecas está expresada en número de transformantes por microgramo de DNA. En la genoteca GT1 se indican con un "\*" y con "&" los números referentes a cada uno de los dos escrutinios que se realizaron. De los positivos obtenidos se indica el número de clones obtenidos con un mismo inserto, el tamaño del inserto en miles de pares de bases y la proteína fusionada a GAL4AD que se expresa. "GlnB Kpn" hace referencia a GlnB de *Klebsiella pneumoniae* y GlnB 7942 a GlnB de *Synechococcus* sp. PCC 7942.

Por otro lado, se obtuvo un clon portador de un inserto que resultó ser GlnK de *Klebsiella pneumoniae*. Se comprobó que no correspondía a un inserto genómico sino a una construcción previamente realizada en el laboratorio y por lo tanto se trataba de una contaminación del DNA de la genoteca, por lo que se



descartó. Este incidente evidencia la importancia de extremar las precauciones en la manipulación de genotecas.

Con el sistema empleado y las condiciones de escrutinio utilizadas se pretendía que la relación entre las presas recomprobadas finalmente y los clones de levadura candidatos obtenidos inicialmente fuera máxima.

Del escrutinio de 4 de las 6 genotecas construidas se obtuvieron clones positivos conteniendo todo o parte del gen *argB* de *Synechococcus* sp. PCC 7942, identificado mediante comparación de secuencias. El gen *argB* de *Synechococcus* codifica para la enzima NAGK. Esta enzima, que pertenece a la familia de las aminoácido quinasas, cataliza la fosforilación del N-acetil glutamato (NAG), en un paso común en la ruta de biosíntesis de arginina de bacterias y plantas (Caldovic et al. 2003). Se obtuvieron 3 plásmidos presa: pUAGC61 tiene un inserto que contiene toda la ORF de *argB* precedida de 24 nucleótidos de región genómica con lo que la proteína de fusión incluye la secuencia de aminoácidos de NAGK completa, pUAGC67 tiene un inserto que contiene la ORF de *argB* desde el nucleótido 34 lo que resulta en la fusión a la proteína NAGK<sub>11-301</sub> y pUAGC69 desde el nucleótido 222 a partir del cual se expresa la fusión a NAGK<sub>47-301</sub> (figura 4.9). La genoteca a partir de la cual se obtuvo cada uno de ellos se indica en la tabla 4. La secuencia del inserto de pUAGC61 fue enviada a la base de datos con número de acceso AY354518.

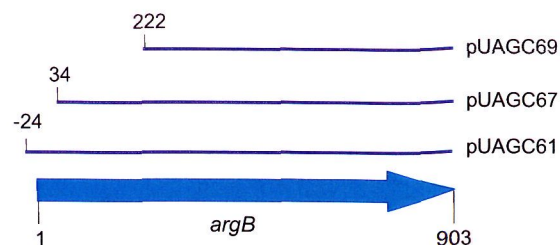


Figura 4.9: Plásmidos obtenidos en los escrutinios del doble híbrido conteniendo secuencias de *argB*. Se muestran los insertos de cada plásmido, la numeración indica la posición de los nucleótidos respecto al inicio de la ORF.

En el escrutinio de la genoteca G5 con PII como cebo se obtuvieron 7 clones con un inserto de 365 bp. Esta secuencia incluía una ORF completa de 89 aminoácidos en fase con el dominio GAL4AD. Al plásmido que contenía este clon se le denominó pUAGC71 y a la ORF identificada, PipX (PII Interacting

Protein X). El inserto de este plásmido incluye los 18 bp que preceden al codón de la metionina inicial de PipX, y que en la proteína de fusión expresada suponen 6 aminoácidos entre el dominio GAL4AD y PipX.

Del escrutinio de la genoteca GT2 se obtuvo un plásmido presa con un inserto de 3.2 Kb que resultó ser una fusión de fragmentos genómicos. Los 1098 bp iniciales fusionados al dominio GAL4AD correspondían a la proteína que se denominó Pip3. Esta proteína presenta homología con fitocromos y una distribución de dominios como los de éstos, esquematizada en la figura 4.10. Posee una región N-terminal con dos dominios GAF que constituye el módulo sensor del fitocromo seguida de una región con dominios PAS y PAC o módulo PAS y un módulo transmisor C-terminal formado por un dominio histidina quinasa y un dominio ATPasa. La región de la proteína obtenida en los escrutinios incluía desde el aminoácido 641 hasta el 1007, lo que supone casi completamente el denominado módulo PAS.

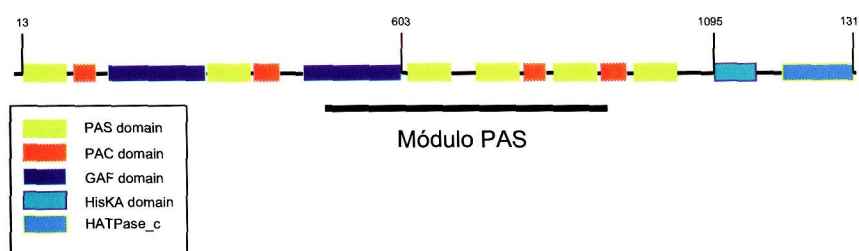


Fig 4.10. Esquema de la distribución en dominios de Pip3 obtenida empleando la base de datos SMART. Se indican algunas posiciones significativas en la secuencia de aminoácidos.

La presa Pip1, presente en siete clones obtenidos del escrutinio con la genoteca G6, es una proteína de 488 aminoácidos que presenta dos dominios de función desconocida conservados en bacterias, el programa COGNITOR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/xognitor.html>) la sitúa en el COG2308, en el que se encuentran proteínas de tipo BCR o transportadores de membrana plasmática. En este mismo grupo se encuentran otras proteínas cianobacterianas con las que presenta homología de secuencia, son: sll0335 de *Synechocystis* sp. PCC 6803, gll2069 de *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, tll1971 de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 y SYNW2456 de *Synechococcus* sp. WH8102.

#### 4.2.5 Análisis doble híbrido de las presas de PII

Con el objetivo de establecer conexiones entre las proteínas identificadas en los escrutinios y proteínas de interés en transducción de señales del nitrógeno, y obtener información sobre los requerimientos de sus interacciones con PII, se hicieron nuevos ensayos doble híbrido. En ellos se emplearon proteínas de fusión ya utilizadas y nuevas construcciones con derivados de PII en los que se sustituyó la serina 49 por alanina, ácido aspártico y ácido glutámico. Se obtuvieron tres tipos de resultados: se confirmó la especificidad en la interacción con PII de dos de las presas obtenidas, NAGK y PipX, se identificó la interacción PipX-NtcA y se analizó la importancia de la serina 49 y el estado de fosforilación de PII en el contexto de su interacción con NAGK y PipX.

##### 4.2.5.1 NAGK Y PIPX INTERACCIONAN ESPECÍFICAMENTE CON PII DE *Synechococcus*

Con el fin de realizar los ensayos de interacción en las dos orientaciones, es decir, fusionando las proteínas a cada uno de los dos dominios de GAL4, los insertos de los plásmidos presa, derivados del plásmido pGAD424, se clonaron en el plásmido pGBT9 mediante el procedimiento de gap-repair en levaduras. Mediante esta técnica, a partir del plásmido presa pUAGC61, se obtuvo el plásmido pUAGC62 que expresa la proteína de fusión GAL4BD:NAGK y a partir del plásmido presa pUAGC71, el pUAGC72 que expresa GAL4BD:PipX. En la tabla 4.5 se representa un ensayo de interacción por conjugación entre las presas obtenidas que eran capaces de verificar la interacción, esto es, NAGK y PipX y las proteínas anteriormente empleadas con las que se detectó interacción, es decir, NtcA y PII. Se incluyeron como controles las proteínas GlnB y GlnK de *E. coli* cuya interacción mediante un sistema similar ya ha sido caracterizada (Martinez-Argudo et al. 2002b).

Las interacciones de PII con las presas identificadas NAGK y PipX resultaron ser específicas con respecto a otras proteínas empleadas previamente en este trabajo y a proteínas control. Además, su interacción fue verificada en ensayos por conjugación, en lugar de cotransformación. Por el



contrario, las interacciones PII-Pip3 y PII-Pip1, no se detectaban en este tipo de ensayos. Estas dos proteínas interaccionaron en el doble híbrido con PII usando la cotransformación como método para crear la estirpe que expresa las dos fusiones, que es el método que se emplea en los escrutinios. Asimismo, la interacción específica se recomprobó en varias ocasiones, al volver a ser cotransformada la estirpe PJ696 con los plásmidos que codifican para ambas fusiones proteicas. Pero, al contrario que las presas PipX y NAGK, resultaron no mostrar evidencias de unión cuando se empleaba la conjugación como método para crear la estirpe portadora de los dos plásmidos. Este hecho impedía el trabajo con estas proteínas a nivel de interacción en el doble híbrido, y, por este motivo, se eligieron NAGK y PipX para caracterizaciones posteriores.

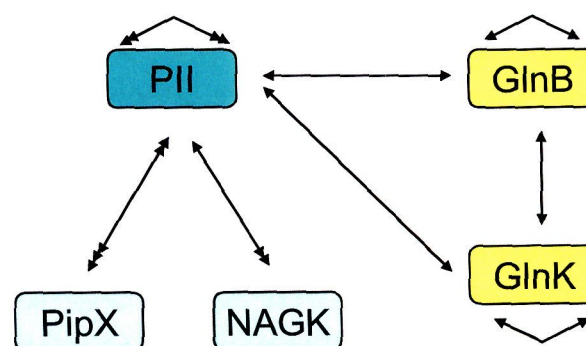


Figura 4.11. Interacciones doble híbrido entre proteínas PII y las presas NAGK y PipX. Las cajas amarillas representan proteínas de *E. coli* y las cajas verdes de *Synechococcus*. Detalles como en figura 3.2.

		<i>Synechococcus</i>				<i>E. coli</i>		
		PII	PipX	NAGK	NtcA	GlnB	GlnK	NP
<i>Synechococcus</i>	PII	++	++	+	-	+	+	-
	NtcA	-	+	-	-	-	-	-
	PipX	+++	-	-	+	-	-	-
	NAGK	++	-	+	-	-	-	-
	PIPI	-	-	-	-	-	-	-
	PIP3	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	GlnB	+	-	-	-	+	+	-
	GlnK	+	-	-	-	+	+	-
	NP	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4.5. Interacciones de las proteínas identificadas en los escrutinios, NAGK y PipX. Detalles como en tabla 4.2.

#### 4.2.5.2 PIPX INTERACCIONA CON NTC A

De entre las interacciones ensayadas se detectó unión específica en el doble híbrido de PipX a NtcA que se comprobó en los ensayos por conjugación (tabla 4.5). La validez de este hallazgo ha sido posteriormente confirmada mediante diferentes aproximaciones *in vitro* e *in vivo*. La interacción entre PipX y NtcA, junto con la interacción ya comentada entre PII y PipX conecta a los dos reguladores clave en la asimilación del nitrógeno. Por otra parte, también se ha confirmado posteriormente que PipX es un monómero, lo que se deducía de los estudios doble híbrido presentados.

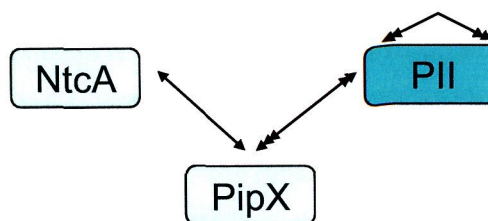


Figura 4.12. Interacciones en el doble híbrido entre PipX, PII y NtcA. Detalles como en figura 4.2.

#### 4.2.5.3 MUTACIONES EN LA SERINA 49 DE PII ELIMINAN SU INTERACCIÓN CON NAGK PERO NO CON PIPX EN EL DOBLE HÍBRIDO

La Serina 49 de PII de *Synechococcus* es el sitio de regulación por fosforilación (Forchhammer et al. 1995). Ha sido descrito el efecto de sustituciones de la serina 49 de PII por aminoácidos que simulan los estados fosforilado y desfosforilado de esta proteína sobre la regulación del transporte de nitrato (Lee et al. 2000) y nos preguntamos su efecto en las nuevas interacciones identificadas. Para ello, se construyeron plásmidos en los que se fusionaron a los dominios de GAL4 versiones de la proteína PII portadoras de las mutaciones puntuales S49A, S49E y S49D. La proteína PII<sup>S49A</sup> tiene una alanina en la posición 49 y es incapaz de ser fosforilada. Las proteínas PII<sup>S49D</sup> y PII<sup>S49E</sup> tienen un ácido aspártico y un ácido glutámico, respectivamente, en dicha posición, cuyo tamaño y carga negativa podrían mimetizar al grupo fosfato de la proteína fosforilada.

Los resultados obtenidos indicaron que PipX interacciona con los derivados de PII de manera similar a como lo hace con la proteína silvestre (tabla 4.6), aunque se observa una intensidad ligeramente mayor en la interacción GAL4AD:PII<sup>S49E</sup>/GAL4BD:PipX. Este resultado sugiere que la interacción no depende del estado de fosforilación de PII.

Por el contrario, se observó que la interacción NAGK – PII se veía abolida en el doble híbrido con cualquiera de los tres cambios en la S49 (tabla 4.6), mostrando la importancia de la conservación de este residuo para la interacción. La serina 49 está conservada en organismos que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica, es decir, cianobacterias, algas y plantas. En algunos miembros de estos tres grupos en los que se ha ensayado la capacidad de las proteínas correspondientes de interactuar en el doble híbrido los resultados han sido positivos (Burillo et al. 2004; Sugiyama et al. 2004).

Debido a que en la levadura no existen la quinasa y fosfatasa de PII, es de suponer que la proteína se encuentra desfosforilada y, por lo tanto, es en este estado de PII, en el que se produce la interacción. Ya que la proteína PII<sup>S49A</sup> no se une a NAGK en el doble híbrido, ésta no se comporta, tal como se había sugerido previamente (Lee et al. 2000) como una proteína silvestre constitutivamente desfosforilada en lo que respecta a esta interacción.

	GAL4BD	PII	PII <sup>S49A</sup>	PII <sup>S49D</sup>	PII <sup>S49E</sup>	PipX	NAGK
GAL4AD							
PII		++	++	++	++	++	+
PII <sup>S49A</sup>		++	++	++	++	++	-
PII <sup>S49D</sup>		++	++	++	++	++	-
PII <sup>S49E</sup>		++	++	++	++	+++	-
PipX		+++	+++	+++	+++	-	+
NAGK		++	-	-	-	+	+

Tabla 4.6. Interacciones entre las proteínas NAGK, PipX, PII y derivados de ésta. Detalles como en tabla 4.2.



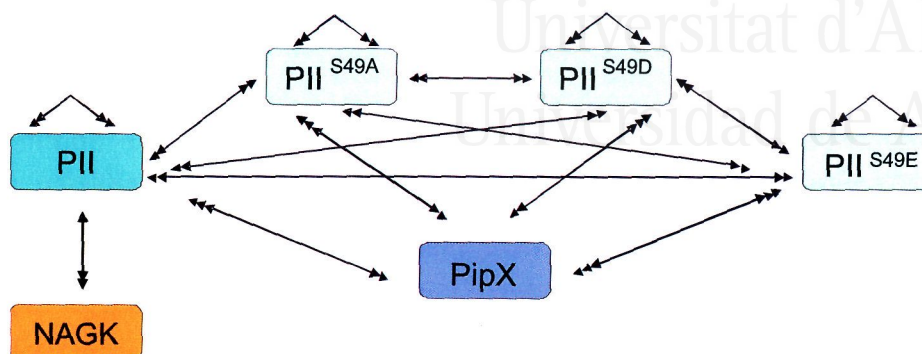


Figura 4.13. Interacciones entre PII y derivados de PII con las presas NAGK y PipX. Detalles como en figura 3.2.

## 4.3 Características de la interacción PII – NAGK

### 4.3.1 PII estimula la actividad NAGK en *Synechococcus*

Con la intención de investigar si la interacción PII-NAGK tenía algún efecto sobre la actividad NAGK por parte de PII, se cuantificó la actividad NAGK en el mutante PII nulo MP2, en el mutante puntual MP2A portador de la proteína PII<sup>S49A</sup>, y en la estirpe silvestre. Para ello, se obtuvieron extractos proteicos de cultivos de estas estirpes de *Synechococcus* en amonio y tras ser cultivados durante cinco horas sin fuente de nitrógeno. Los extractos se obtuvieron en presencia de 5mM de 2-oxoglutarato con el fin de compensar su dilución al romper las células, y evitar la consiguiente alteración del estado de fosforilación de PII. Tras ello, se realizó la cuantificación de la actividad enzimática utilizando como sustratos L-NAG y ATP. Como se puede observar en la figura 4.14, en el mutante PII la actividad NAGK es inferior a la del silvestre lo que implica que esta actividad es estimulada por PII. Se observó, así mismo, que la actividad en el silvestre era 3 veces mayor cuando era cultivado en amonio que en ausencia de fuente de nitrógeno. Esta diferencia en la actividad NAGK entre las dos condiciones de nitrógeno está de acuerdo con los datos obtenidos paralelamente por otros autores (Heinrich et al. 2004) donde se documenta una inducción de 5 veces en la actividad NAGK, e implica que es en el estado desfosforilado en el que PII estimula la actividad NAGK.

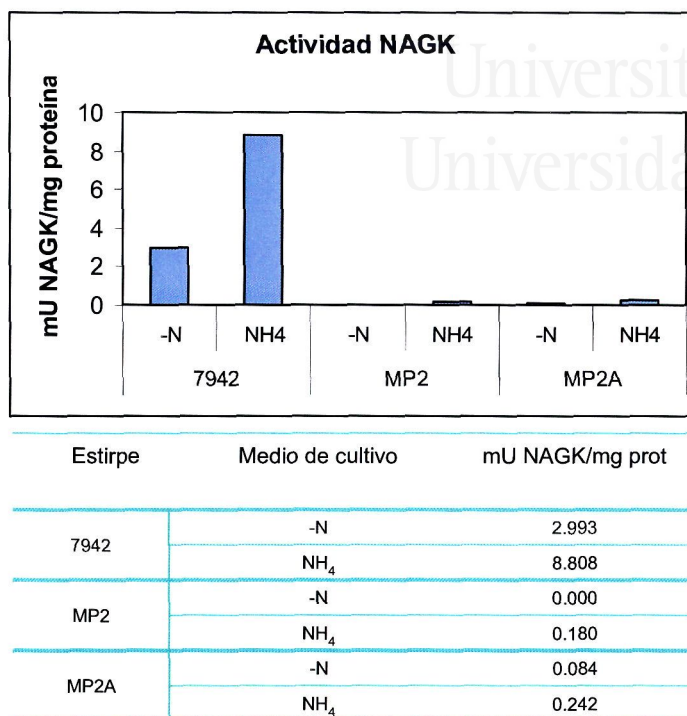


Figura 4.14. Actividad NAGK en extractos proteicos de las estirpes silvestre (7942), mutante nulo PII (MP2) y mutante PII<sup>S49A</sup> (MP2A), en presencia de amonio como fuente de nitrógeno (NH<sub>4</sub>) y tras 5 horas en ausencia de fuente de nitrógeno (-N). Los datos indicados en la tabla inferior son el resultado de un experimento representativo y se corresponden con el diagrama de barras superior.

NAGK además de suponer el único blanco de PII identificado hasta el momento en *Synechococcus*, es la única función para la cual se ha descrito el mecanismo molecular: PII en su estado desfosforilado se une a NAGK induciendo la actividad de la enzima: disminuyendo la Km en un factor de 10 y amuentando la Vmax en un factor de 4 (Maheswaran et al. 2004). Las funciones conocidas hasta ahora de PII en bacterias incluyen modificación de la actividad de proteínas reguladoras, de enzimas y de transportadores. Todas las funciones nombradas están enmarcadas en el contexto de la asimilación de fuentes sencillas de nitrógeno como nitrato o amonio y la fijación de nitrógeno. La regulación de NAGK extiende el espectro de los procesos regulados por PII hacia niveles más avanzados en el metabolismo de compuestos nitrogenados.

En *Synechococcus* sp. PCC 7942, al contrario que en otras cianobacterias, no se acumula como cianoficina. El exceso de arginina no metabolizado se excreta y es utilizado por la enzima L-AOX para generar amonio en el espacio periplásmico (Bockholt et al. 1996). Mutaciones en la



enzima NAGK que provocan la ausencia de inhibición por arginina de la enzima dan lugar a una excreción de este aminoácido al medio extracelular por exceso de su síntesis en cultivos crecidos con nitrato como fuente de nitrógeno (Wolters et al. 1991). El efecto de estas mutaciones es parcialmente análogo al de la proteína PII, que al unirse a NAGK, además de estimular su actividad, disminuye en gran medida el efecto inhibitorio de la arginina (Maheswaran et al. 2004). Esto hace suponer que la interacción PII - NAGK provocará una mayor síntesis de arginina y su exceso podrá ser reciclado en parte para la síntesis de amonio por la enzima L-AOX. Posteriores trabajos serían necesarios para entender la relación entre la interacción PII - NAGK y el resto de interacciones de PII (físicas y genéticas) implicadas en la asimilación de fuentes sencillas de nitrógeno.

#### 4.3.2 Evolución de ArgB y PII

PII de *Synechococcus*, además de presentar a nivel de secuencia porcentajes de similitud mayores con eucariotas fotosintéticos que con el resto de bacterias, comparte con los primeros, residuos concretos en el T-loop, como aquellos de las posiciones 42 y 51 (figura 4.15). El aminoácido de la posición 51 tiene un claro significado funcional ya que es la tirosina que se uridila en enterobacterias. Este residuo está conservado en cianobacterias, y concretamente PII de *Synechococcus* es uridilable con baja eficacia en esta posición (Forchhammer et al. 1999). En plantas, esta posición está ocupada por una fenilalanina. En la posición 42 todas las cianobacterias y el alga roja *P. purpurea* tienen una glutamina y las plantas una serina, mientras que el resto de las bacterias analizadas que tienen una histidina. Por tanto, el aminoácido que ocupa esta posición diferencia entre las proteínas PII de cianobacterias y plantas, sin tener en cuenta la secuencia del T-loop en *C. caldarium* que parece ser una excepción (figura 4.15). Los aminoácidos de las posiciones 49 y 45 están conservados y son los que diferencian más claramente organismos fotosintéticos oxigénicos de bacterias no pertenecientes al grupo de las cianobacterias. En conjunto, parece que existen peculiaridades en la secuencia del T-loop exclusivas de PII de organismos fotosintéticos.

Como se ha discutido previamente, la importancia de la serina 49 para la

interacción con NAGK y el hecho de que este residuo sea específico de cianobacterias, algas y plantas, sugiere la posibilidad de que la interacción suceda en organismos que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica, y no en proteobacterias como *E. coli* en las que esta serina está ocupada por una alanina.

	37	54
<i>Synechococcus PCC 7942</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>Anabaena PCC 7120</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>Nostoc punctiforme</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>Fremyella diplosiphon</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>T. elongatus BP-1</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>Synechocystis PCC 6803</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>Synechococcus PCC 7002</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>T. erythraeum IMS101</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>P. marinus MIT9313</i>	GRQKGQVERYRGSEFT-VE	
<i>Synechococcus WH8102</i>	GRQKGQVERYRGSEFT-VE	
<i>Gloeobacter violaceus PCC7401</i>	GRQKGQTERYRGSEYT-VE	
<i>Porphyra purpurea</i>	GRQKGQTERYKGYSEYS-ID	
<i>Cyanidium caldarium</i>	GKQIGGIERSKGVYD-SE	
<i>Medicago sativa</i>	GAQGGSKERQGGSEFSEDN	
<i>Ricinus communis</i>	GAQGGSTERQGGSEFSEDK	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GAQGGSTERHGGSEFSEDK	
<i>Oryza sativa</i>	GAQGGSTERHEGSEFAEDT	
<i>Escherichia coli</i>	GRQKGHTELYRGAEYM-VD	
<i>Salmonella typhimurium</i>	GRQKGHTELYRGAEYM-VD	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GRQKGHTELYRGAEYV-VD	
<i>Rhizobium meliloti</i>	GRQKGHTELYRGAEYV-VD	
<i>Mesorhizobium loti</i>	GRQKGHTELYRGAEYV-VD	
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	GQKKGHTEVYRGAEYA-VD	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	GRQKGHTEVYRGAEYS-VD	
<i>Streptomyces coelicolor</i>	GRQRGHTVYRGAEYT-VD	
<i>Bifidobacterium longum</i>	GRQRGHTVYRGAEYT-VD	

Fig 4.15. Alineamiento de las secuencias deducidas del T-loop de proteínas PII de los organismos indicados. Se han sombreado en gris residuos relevantes. Los organismos enmarcados en verde incluyen cianobacterias y eucariotas con cloroplastos y en amarillo otras bacterias.

En este contexto, nos preguntamos si la presencia de serina en esa posición se correspondía con algún aspecto evolutivo de la proteína NAGK. Se hicieron alineamientos y árboles de genes de las proteínas PII y NAGK. Los árboles obtenidos usando los modelos de evolución Neighbour-joining y Minimum evolution dieron la misma topología. Se consideraron los árboles obtenidos mediante el modelo de Minimum evolution, que muestran en común el agrupamiento de las cianobacterias y plantas en un cluster diferenciado del resto de bacterias, para ambas proteínas (figura 4.16). Con el mismo objetivo, se realizaron alineamientos de las proteínas completas NAGK de cianobacterias, algas, plantas y dos proteobacterias, observándose que en los 80 aminoácidos C-terminales de la proteína existía una conservación de secuencia específica de

cianobacterias y eucariotas fotosintéticos no compartida con sus homólogas en *E. coli* y *P. aeruginosa* (fig 4.17). Esta conservación podría suponer una especialización en las secuencias de estos organismos, que se muestran agrupados en los árboles filogenéticos tanto de PII como de NAGK (fig 4.16). El hecho de que la conservación de esta región también se corresponda con un perfil en cuanto a interacciones en el doble híbrido (Burillo et al. 2004; Sugiyama et al. 2004) sugiere que dicha región podría determinar algunas propiedades específicas de NAGK en organismos fotosintéticos oxigénicos.

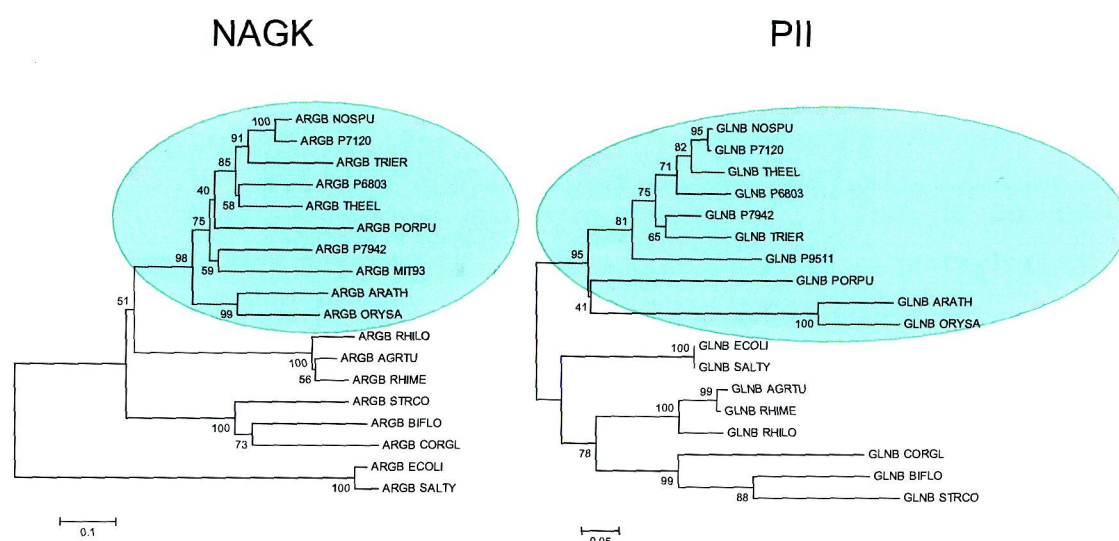


Figura 4.16. Árboles de genes de las proteínas ArgB y PII, usando el modelo de evolución Minimum Evolution. Se ha redondeado en verde el subárbol formado por los organismos pertenecientes al grupo de las cianobacterias y eucariotas con cloroplastos. En los nodos de cada ramificación se indican los valores de bootstrap. Los nombres de los organismos están abreviados de manera que NOSPU es *Nostoc punctiforme*, P7120 es *Ababaena* sp. PCC 7120, TRIER es *Trichodesmium erythraeum*, P6803 es *Synechosystis* sp. PCC 6803, THEEL es *Thermosynechococcus elongatus*, PORPU es *Porphyras purpurea*, P7942 es *Synechococcus* sp. PCC 7942, MIT93 es *Prochlorococcus marinus* MIT9313, ARATH es *Arabidopsis thaliana*, ORYSA es *Oryza sativa*, BIFLO es *Bifidobacterium longum*, CORGL es *Corynebacterium glutamicum*, STRCO es *Streptomyces coelicolor*, AGRTU es *Agrobacterium tumefaciens*, RHIME es *Rhizobium meliloti*, RHIL0 es *Mesorhizobium loti*, ECOLI es *Escherichia coli* y SALTY es *Salmonella typhimurium*.

Por otro lado, la migración de los genes *argB* y *glnB* durante la evolución de los organismos que realizan fotosíntesis oxigénica desde el cloroplasto al núcleo sucedió aproximadamente en el mismo momento evolutivo (Martin et al. 2002). El hecho de que, las proteínas NAGK y PII interactúan en entidades biológicas emparentadas como las cianobacterias y los cloroplastos de algas y plantas sugiere que se trata de una interacción funcional lo suficientemente

importante para que se haya conservado en la evolución desde un organismo ancestral común (Burillo et al. 2004).

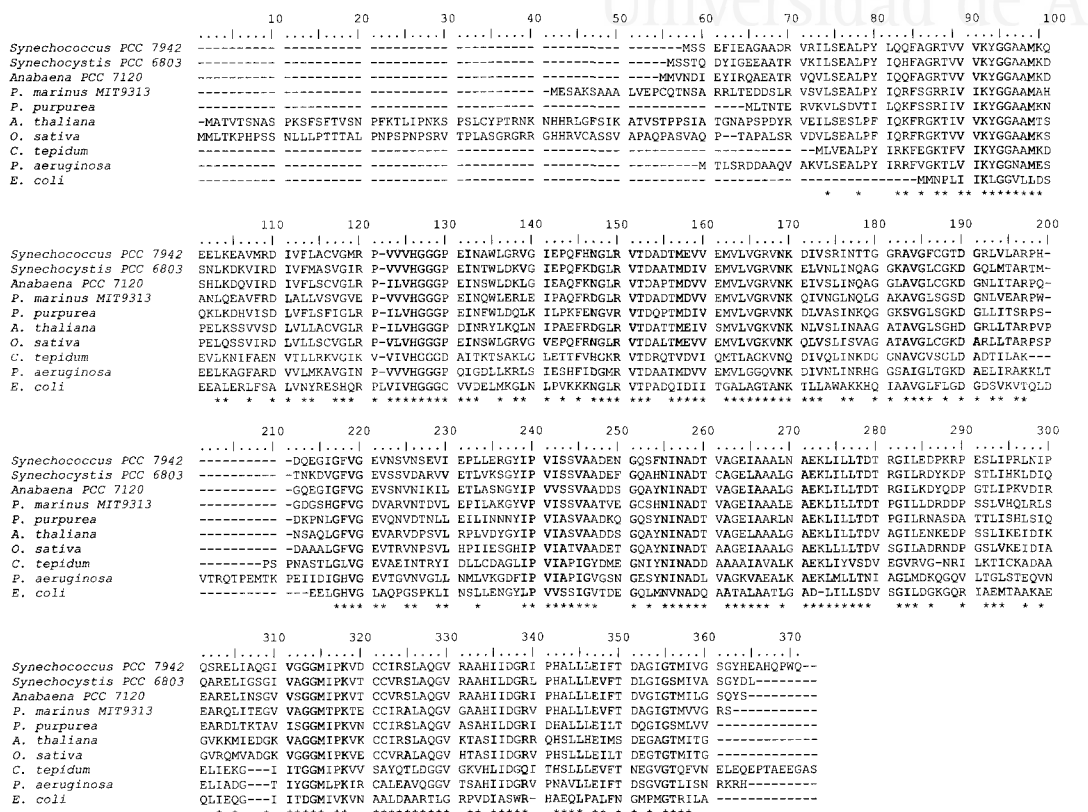


Fig 4.17. Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos de las proteínas NAGK de los organismos que se indican. Se han sombreado las posiciones conservadas en todas las secuencias, los asteriscos indican las posiciones conservadas en las secuencias pertenecientes a cianobacterias, algas y plantas.

Al igual que la proteína NAGK de *Synechococcus*, las de *Thermotoga marítima* y *Pseudomonas aeruginosa* tienen una estructura cuaternaria en forma de hexámeros (Fernandez-Murga et al. 2004; Maheswaran et al. 2004), en contraposición con la de *E. coli* que forma dímeros (Ramon-Maiques et al. 2002). Asimismo, la biosíntesis de arginina en organismos con NAGK hexaméricas inhibibles por este aminoácido, se realiza a través de la generación de ornitina por una ruta cíclica mientras que en *E. coli* ésta se realiza a través de una ruta lineal (Caldovic & Tuchman 2003). De este modo, parece que las NAGK's que forman hexámeros son las que muestran inhibición por arginina y es probable que esta propiedad estructural esté relacionada con este tipo de inhibición. En



plantas, que tienen una ruta de síntesis de arginina como la de *Synechococcus* (Slocum 2005), NAGK ha sido poco estudiada y no se ha demostrado la estructura hexamérica. Los únicos datos disponibles de la proteína de plantas son los que se refieren a la proteína de *Pisum sativum* para la que se ha sugerido una estructura de heterotetrámero cuya actividad es inhibida por arginina (McKay et al. 1981). Dada la conservación de las proteínas de algas y plantas y su comportamiento muy similar en el doble híbrido a las proteínas de cianobacterias, parece razonable sugerir la posibilidad de que tengan una estructura hexamérica, surgiendo así la cuestión de si esta estructura es determinante en la regulación por PII. Esta cuestión parece resolverse con que no lo es, ya que en *P. aeruginosa* la actividad de NAGK no es estimulada por PII (V. Rubio, comunicación personal). Por lo tanto, como se ha propuesto anteriormente, debe ser la conservación de residuos específicos tanto en PII como en NAGK de organismos fotosintéticos la que determine la conservación de la interacción.

## 4.4 Caracterización preliminar de PipX

### 4.4.1 Obtención de secuencias adyacentes al gen *pipX*

Con el objetivo de obtener la secuencia de las regiones flanqueantes al gen *pipX*, que permitiese analizar la presencia y conservación de genes contiguos, verificar cual es la metionina inicial y llevar a cabo la inactivación de dicho gen, empleamos la técnica PCR-walking. Para obtener la región a 5' del gen se realizaron varias digestiones genómicas independientes con las enzimas *EcoRV*, *RsaI*, *Scal* y *SspI*, que generan extremos romos y no cortan entre la secuencia correspondiente al oligonucleótido específico PIP2-2R y la secuencia conocida aguas-arriba. Cada uno de estos DNA digeridos se ligó en romo con un acoplador formado por los oligonucleótidos TRANS P-01 y TRANS P-02. Puesto que el acoplador solamente es romo en un extremo, solo se puede ligar en una determinada orientación. Los productos de la ligación se digirieron con *SalI*, que corta aguas - abajo del sitio de hibridación del oligonucleótido PIP2-2R en la

secuencia de *pipX*. Tras ello, se realizó una reacción de PCR para cada una de las digestiones iniciales en romo, empleando los oligonucleótidos TRANS P-01 y PIP2-2R. Se obtuvieron 2 productos de PCR, que provenían de las digestiones con las enzimas *Sspl* y *Rsal*, el primero de aproximadamente 0.8 Kb y el segundo de aproximadamente 1.7 Kb (figura 4.18 A).

Los productos obtenidos de estas PCR se secuenciaron con el oligonucleótido TRANS P-01 y ambos contenían secuencias adyacentes a la que disponíamos. La secuencia proveniente del producto mayor contenía la secuencia del producto menor, como es esperable. Con el fin de comprobar que la secuencia obtenida era correcta se amplificó mediante PCR, a partir de DNA genómico, con el oligonucleótido PIP2-2R y un oligonucleótido que hibrida en la secuencia obtenida, PIPX-126-F. Este producto se secuenció con el oligonucleótido PIPX-126-F. La secuencia disponible en este punto se mandó al GenBank con número de acceso AY301618.

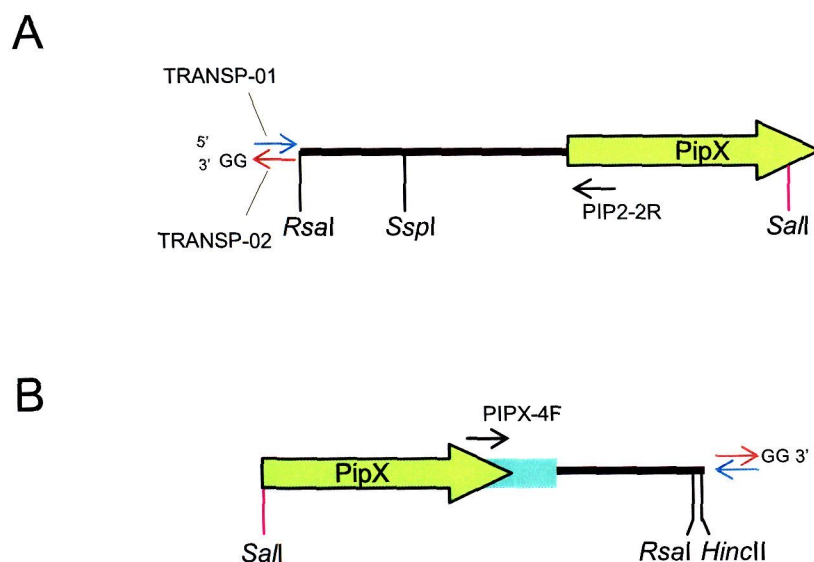


Figura 4.18: Esquema de los productos intermedios de PCR-walking a 5' (A) y a 3' (B) a partir de los que se obtuvieron secuencias adyacentes a *pipX* (línea negra). La secuencia perteneciente a la ORF de *pipX* viene representada como una flecha, la secuencia conocida fuera de *pipX* como una caja verde. Se indican las posiciones de corte de las enzimas y los sitios de hibridación de oligonucleótidos empleados.

Para obtener secuencia adicional a 3' del gen *pipX* se utilizó la misma estrategia. Partiendo de digestiones con las enzimas *Rsal*, *HincII*, *SmaI*, *PvuII*,

*SspI* y *EcoRV*, y usando como oligonucleótido específico PIPX-4F y como oligonucleótido presente en el acoplador TRANS P-01. Se obtuvieron dos productos de PCR de aproximadamente 400 bp procedentes de las digestiones con las enzimas *HincII* y *RsaI* (figura 4.18 B).

La secuencia obtenida en los dos ensayos se comprobó amplificando por PCR, a partir de DNA genómico, con los oligonucleótidos LCY-PIPX-1F y PIPX-5R y secuenciando este producto con LCY-PIPX-1F, el cual hibrida en el gen *lcy*, localizado aguas-arriba de *pipX*. La ORF de este gen, que codifica para la enzima licopeno ciclasa, termina 144 pares de bases aguas-arriba del codón de inicio de *pipX*. A 25 pares de bases del codón de stop se inicia otra ORF, *selo03001348*, que codifica para una proteína de función desconocida conservada en cianobacterias (figura 4.19).

Para obtener un producto mediante esta técnica se requiere que haya, en la secuencia que se obtiene, al menos, una diana para una de las enzimas usadas más cercana al oligonucleótido específico que la próxima diana *SaI*. También se requiere que la distancia entre ésta y el oligonucleótido específico sea del tamaño adecuado para que se produzca la amplificación por PCR. Es por ello, que solo a partir de algunas de las digestiones genómicas iniciales se obtienen finalmente productos de PCR.

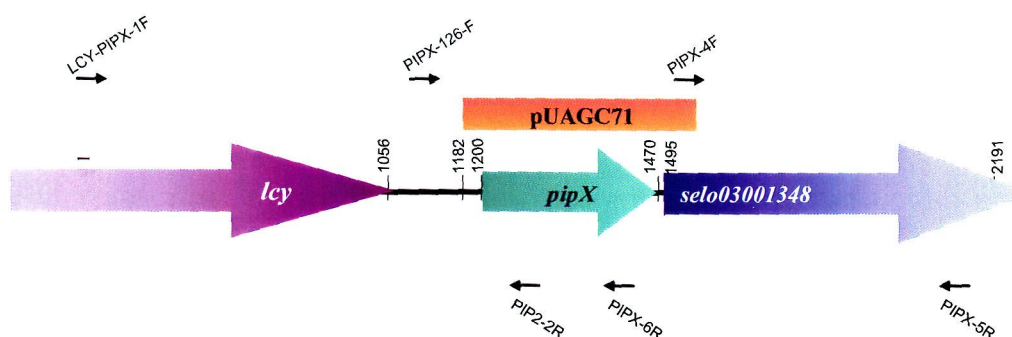


Figura 4.19: Esquema de la estructura de la región genómica que contiene al gen *pipX*. La ORF del gen *lcy*, que codifica para la enzima licopeno ciclasa, termina 144 pares de bases aguas-arriba del codón de inicio de *PipX*. A 25 pares de bases del codón de stop de *pipX* se inicia otra ORF, *selo03001348*, que codifica para una proteína de función desconocida conservada en cianobacterias. Los números indican la posición relativa en pares de bases. La barra marcada pUAGC71 se indica la región presente en el inserto de dicho plásmido. Se indica el lugar de hibridación de algunos oligonucleótidos empleados.

#### 4.4.2 Conservación de *pipX* en cianobacterias

Con el fin de obtener información sobre la presencia de homólogos de *pipX* en otros organismos, se realizaron búsquedas en las bases de datos de secuencias con el programa BLAST. Se observó que el gen que codifica para la proteína PipX estaba presente únicamente en cianobacterias y que no mostraba homología con ninguna otra proteína. El alineamiento de las secuencias cianobacterianas mostró un alto grado de similitud entre ellas.

```

PCC7942 -----MASENYLNHPTFGLLYQICSGFDS-----KELFATLYAQRLLFFLVAF-DARGTRFEPTGRNEARMLVDNRLRQLRR---DASLQEYNQLQVFKQTFI 89
cc9902 -----MASERYLNHPTFGMLYRVAPAGEG-----RDVYATLYAQRMFELVTL-QPRGAQFEVIPYGDARHHAENVISRCRR---DG-SDDLVSWRQLFDQTFI 88
cc9605 -----MASERYLNHPTFGMLYRVAPAGEG-----RDVYATLYAQRMFELVTL-QPRGAQFEVIPYGDARHHAENVHLGRCCR---DG-SDELENWSQLFDQTFI 88
WH8102 -----MMEAAASMAAERYLNHPTFGMLYRVAPAGEG-----RDVYATLYAQRMFELVTL-QPRGAQFEVIPYGDARHHAENVHLGRCCR---AG-SELENWRQLFDQTFI 94
MIT9313 -----MSAERYLNHPTFGMLYRVAPAGDGG-----RDVYATLYAQRMFELVTL-QPRGAQFEVIPYQDARHYAELHLTHCRR---DR-SPEYESWQQLFAQTFI 88
MED4 -----MSSERYLNHPTFGMLYQVSLGIEG-----KDIYATLYAQRMFELVEV-KQREVFVEVIPYLDARNSQSELNLRQRARR---QG-SEDFSKWQNLFRQTFI 88
PCC6803 -----MSNEIYLNHPTFGLLYQICFLDDN-----QEIFFTLYAQRLLFFLVGN-TFNNTQFEPI TRADAKLLENLRRLRRLRR---AGDFKAYDVLAKLHKNTF 88
PCC7120 -----MNPENAEYINHPITWGLLYKICMVDDES-----QDLFTTYAQRLLFFLVGN-DIKAIKQPIGRTEARMLENLRRLRRLRR---NGSQEYDQLQSVFQRTFQ 92
ATCC29133 -----MNPENAEYINHPITWGLLYKICMVDDET-----QDLFTTYAQRLLFFLVGN-DVKGVKQPIGRTEARMLENLRRLRRLRR---SGHSQEYDQLQSVFQRTFQ 92
WH8501 -----MSSEYTFNHPTFGLLYRVCLLDDN-----QELFTTYAQRLLFFLVKM-IPDNTVLEPI SRSDARLVLVEKRLRLNLRH---LGLIEEYKFKQAMKQTF 89
IMS101 -----MTNETYMNHPFGLLYRVCLIEIENKKNKELFTTYAQRLLFFLVVNEIGVIKFEPVSRSDARLVMVEIRLRLRRLRR---NRQTDYQKQLQVHKNTFQ 95
BP-1 -----MKPPI TAEQYLNHPTFGLLYGVCLDEH-----RQLFTTYAQRLLFFLVSH-RPGGMKFESISRTDARMLIEQRLRSLRRLRR---LGTAEYKALEIHRQAFI 93
gsr0474 -----MLRRMTSEQYLTHPTFGLLFLICPVGEE-----SALYSTLYAQRLLFFLVTV--LIPVLGFEP I GREKARRIVENR I KILRA---L GENTALDRLQVQFQRHF 91
gll2393 MVEPMTKPKGCSVLYITTWNVNNEQLQHPHFLMFLVCSLGPX-----KGLFATLYAQRMLFVVITEAEITMQFESLSRLQARQLIDDRMRACRRGTLELDHQTLDRMKAIFYQHAL- 113
          * * * * *
          * * * * *
          *
  
```

Figura 4.20. Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de PipX de cianobacterias. PCC7942 hace referencia a PipX de *Synechococcus sp.* PCC 7942, cc9902 de *Synechococcus sp.* CC9902, cc9605 de *Synechococcus sp.* CC9605, WH8102 de *Synechococcus sp.* WH 8102, MIT9313 de *Prochlorococcus marinus* MIT9313, MED4 de *Prochlorococcus marinus* MED4, PCC6803 de *Synechocystis sp.* PCC 6803, PCC7120 de *Anabaena sp.* PCC 7120, ATCC29133 de *Nostoc punctiforme* ATCC 29133, WH9501 de *Crocospaera watsonii* WH8501, BP-1 de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, IMS101 de *Trichodesmium erythraeum* IMS101, gsr0474 y gll2393 a dos ORF's de *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Están sombreadas en gris las zonas de mayor similitud en todas las secuencias comparadas. Con asterisco se indican las posiciones idénticas en todas las secuencias.

#### 4.4.3 Inactivación del gen *pipX* en *Synechococcus*

Con el objetivo de iniciar la caracterización funcional del gen *pipX* se llevó a cabo la generación de un mutante nulo del gen *pipX*. Para ello se substituyó gran parte de la región codificante de *pipX* por la cassette de resistencia a kanamicina CK1 (Elhai et al. 1988) (figura 4.21). Esta mutación se llevó a cabo mediante sustitución génica por doble recombinación.

Se transformó con el plásmido pUAGC59.1, que al ser no replicativo en *Synechococcus* permite la selección directa de los clones que hayan incorporado a su cromosoma el gen de resistencia presente en la CK1. La sustitución génica por doble recombinación se comprobó por PCR con las parejas de oligonucleótidos PIPX-126-F/PIPX-5R y LCY-PIPX-1F/PIPX-6R



(figura 4.22). Las parejas de oligonucleótidos empleadas hibridan flanqueando el sitio de inserción de la cassette, que tiene 1.3 Kb. El producto de PCR en la estirpe silvestre para la pareja de oligonucleótidos PIPX-126-F/PIPX-5R era de 800 bp, y en el cromosoma de la estirpe inactivada se observó una banda de 2.1 Kb, que corresponde al tamaño del fragmento que contiene la inserción (figura 4.22). Se pudo comprobar que la segregación era completa ya que no se observaba la banda correspondiente a la amplificación a partir de un cromosoma silvestre. A esta estirpe de *Synechococcus* mutante *pipX*, se le llamó SP591.

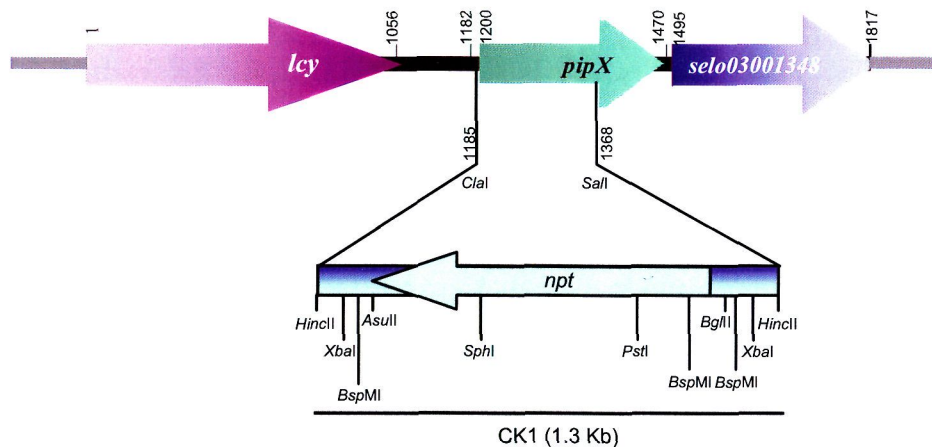


Figura 4.21: Esquema de la región genómica que incluye a *pipX* y de la cassette CK1 indicando la posición en la que se insertó la cassette y su mapa de restricción. El gen *npt* confiere la resistencia a kanamicina.

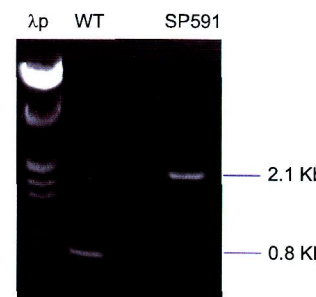


Figura 4.22: Comprobación de la inserción de la cassette CK1 en el gen *pipX* mediante PCR con los oligonucleótidos PIPX-126-F y PIPX-5R empleando como molde DNA total de las estirpes silvestre (WT) y SP591. La calle  $\lambda p$  del gel contiene DNA de lambda digerido con *PstI* como marcador de tamaño.

Puesto que PipX intreracciona en el doble híbrido con NtcA, nos preguntamos si el fenotipo del doble mutante *pipX ntcA* proporcionaría

evidencias de interacción genética. Para ello, se utilizó la estirpe CS37 (Vega-Palas et al. 1992) portadora de una mutación nula de *ntcA*, en la que se inactivó *pipX* del mismo modo que se hizo en la estirpe silvestre. Se analizó la presencia de la inserción, de igual modo que en la estirpe SP591, y se observó segregación incompleta (figura 4.23), apareciendo una banda procedente de un cromosoma silvestre y otra banda procedente de un cromosoma con la cassette insertada. Algunos de los clones resistentes a kanamicina se cultivaron en BG11<sub>A</sub> líquido con el doble o triple de la concentración de este antibiótico utilizada inicialmente, pero no se consiguió la segregación total en ningún caso.

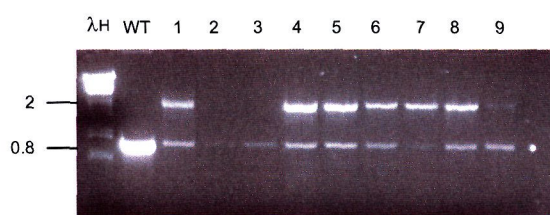


Figura 4.23. Detección de la presencia de la mutación por inserción de la cassette CK1 en el gen *pipX* en la estirpe derivada de CS37 mediante PCR a partir de biomasa de nueve clones transformantes (calles 1 a 9) y a partir de DNA total de la estirpe silvestre (WT). Se indican las posiciones para las bandas de tamaño 0.8 Kb que resulta de la amplificación a partir de un cromosoma sin inserción y la de 2Kb con inserción de la cassette CK1. En la calle  $\lambda_H$ , se ha cargado DNA del fago lambda digerido con *HindIII* como marcador de tamaño.

Debido a que no se conoce hasta el momento ninguna mutación adicional viable sobre el mutante *ntcA* de *Synechococcus* y a que éste se ve afectado en su crecimiento, no nos sorprendió el hecho de que no se consiga la segregación completa del mutante *pipX* en la estirpe con fondo genético *ntcA*. Esto puede ser debido a que la estirpe *ntcA* no admite más mutaciones porque se esté afectando la fisiología de la célula de tal manera que no sea viable. La caracterización del mutante *pipX* ha sido abordada con posterioridad a este trabajo y ha permitido concluir que PipX y NtcA forman parte de la misma ruta de transducción de señales.

#### 4.4.4 Ensayos de interacción PipX-Pil mediante GST-pulldown con extractos proteicos totales

Con el objetivo de purificar la proteína PipX fusionada a la GST se construyó un plásmido a partir del cual se sobreexpresó la proteína de fusión

GST:PipX. Se empleó como sistema de expresión el vector pGEX-3X y la estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$ .

El gen *pipX* se clonó en pGEX-3X eliminándose el codón de la metionina inicial y dando lugar al vector pUAGC99. En los ensayos de sobreexpresión, los cultivos se incubaron a 30° y la inducción se hizo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1mM. La purificación se realizó mediante el uso de columnas GSTrapFF, que contienen una resina de sepharosa con glutatión unido, en un FPLC o sistema automatizado de cromatografía líquida a baja presión. Se obtuvo un rendimiento de 530  $\mu$ g de proteína por cada 200 ml de cultivo de partida. Las muestras así purificadas se sometieron a SDS-PAGE y se estimó la pureza de la proteína por inspección visual de geles teñidos con azul coomassie en aproximadamente un 80% - 90%. En la figura 4.24 B se muestra la proteína purificada sometida a SDS-PAGE, transferida a membrana de PVDF y teñida con fast-green. Paralelamente se purificó, mediante el mismo sistema, la proteína GST a fin de ser utilizada como control.

Con la intención de aportar nuevas evidencias sobre la interacción detectada en el doble híbrido entre PII y PipX, se llevó a cabo un ensayo de unión PipX- PII *in vitro*, empleando la técnica de GST-pulldown.

Se realizó el ensayo de interacción con GST:PipX silvestre purificada y un extracto proteico de un cultivo de *Synechococcus* en BG11. La detección de la interacción se hizo mediante SDS-PAGE y Western Blotting con anticuerpos anti-PII. Se emplearon cultivos con nitrato como única fuente de nitrógeno. En este medio está inducida la expresión del gen *glnB* y la proteína PII se encontrará tanto fosforilada como desfosforilada. Los resultados del doble híbrido no muestran diferencias de interacción entre PipX y los derivados de PII que simulan ambos estados de fosforilación (tabla 4.6). Por lo tanto, es esperable que en nitrato haya una mayor cantidad de proteína PII capaz de interaccionar con PipX, que en un medio con amonio como fuente de nitrógeno.

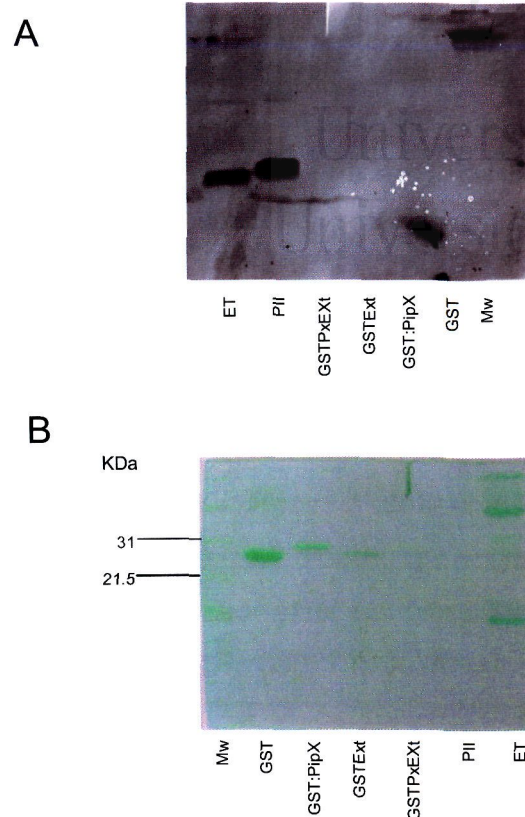


Figura 4.24. (A) Western Blot con anticuerpos anti-P11 de *Synechococcus* para la detección de la interacción P11-GST:PipX mediante GST-pulldown. ET: extracto total, P11: His-P11, GSTPxEt: eluido de la mezcla de incubación entre GST:PipX y el ET, GSTExt: eluido de la mezcla de incubación entre GST y el ET, GST: proteína purificada GST y GST:PipX: proteína purificada GST:PipX, Mw: marcador de tamaño "BioRad SDS-PAGE standards, Broad Range". (B) Membrana empleada en el Western Blot, teñida con fast-green. Las calles se han nombrado como en A. La proteína GST tiene 26 KDa, la proteína PipX tiene 10.4 KDa teóricos y la proteína de fusión GST:PipX, 36.8 KDa.

En las condiciones utilizadas, detalladas en el apartado 3.5.5 de materiales y métodos, no se detectó mediante esta técnica la unión GST:PipX – P11 (figura 4.24 A y 4.24 B). El hecho de que no se detectara la unión mediante esta técnica no implica que la interacción entre las proteínas PipX y P11 no ocurra *in vivo*. En el sistema de GST-pulldown puede suceder que la interacción entre las dos proteínas no se lleve a cabo bien en los tampones o temperaturas empleados o que la fusión GST:PipX se pliegue mal o, de tal modo, que se impida su interacción con P11. También influyen otros factores técnicos que afectan al estado en el que se encuentra la proteína P11 como la preparación de los extractos proteicos y las condiciones fisiológicas de los cultivos de partida.

Aunque durante la realización de esta tesis no pudimos obtener evidencias mediante otras aproximaciones experimentales, posteriores estudios



del grupo de investigación han confirmado la formación de complejos PII-PipX *in vitro*, y la interacción entre ambas proteínas en el sistema del doble híbrido de bacterias (Karimova et al. 1998).

## 4.5 Análisis de la co-evolución en la interacción NbIS-SipA

Dos proteínas que interactúan deben tener una evolución correlacionada durante el periodo en el que se mantiene la interacción. Esto es debido a que la conservación de la interacción restringe la posibilidad de cambio en residuos implicados. Una metodología para el análisis de la co-evolución de dos proteínas que interactúan está basada en la correlación entre sus matrices de distancias (Goh et al. 2000; Ramani et al. 2003) y es la que se empleó en este trabajo.

La proteína GAL4BD:NbIS<sup>Δ(1-271)</sup>, que no interactuó en el doble híbrido con ninguna de las proteínas con las que se ensayó, fue posteriormente usada como cebo en escrutinios de las “genotecas Sau3AI” construidas en este trabajo, obteniéndose la presa a la que se le dio el nombre de SipA (Espinosa et al.). La proteína SipA de *Synechococcus* tiene 78 aminoácidos e interactúa con el dominio de unión a ATP de NbIS. Esta proteína está presente en cianobacterias y plantas, pero no se han detectado homólogos en algas. Curiosamente, NbIS, que está presente en algas y en cianobacterias, siendo la histidina quinasa más conservada en este grupo, no está presente en plantas. Por lo tanto, solo tiene sentido hablar de interacción NbIS – SipA en cianobacterias.

Se estudió la co-evolución entre NbIS y SipA en el grupo de las cianobacterias. Para la estimación de la co-evolución se calculó el r.m.s.d. (root mean square difference) como medida de la correlación existente entre las matrices de distancias de ambas proteínas. Se incluyeron en el análisis las secuencias de proteínas de las siguientes cianobacterias: *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Nostoc punctiforme* PCC 73102, *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Thermosynechococcus*

*elongatus* BP-1, *Crocospaera watsonii* WH 8501 y *Gloeobacter violaceus* PCC 7421. Los controles empleados, que son proteínas para las que no se espera co-evolución ni interacción de ningún tipo con SipA, fueron: la histidina quinasa SphS y los dominios de unión a ATP de la misma familia que el presente en NblS, de las proteínas Hsp90, GyrB y SphS. Se observaron los valores más bajos de rmsd y, por lo tanto, una mayor correlación, para las parejas formadas por SipA y el dominio de unión a ATP de NblS (aminoácidos 460 a 664) y NblS completo (tabla 4.7). Los resultados muestran co-evolución entre las proteínas para las que se ha demostrado interacción en las ocho cianobacterias incluidas en el análisis y, siendo esta una característica de dos proteínas que interactúan, sugieren la conservación de la interacción NblS-SipA en cianobacterias.

	r.m.s.d.
NblS <sup>ATPB</sup>	0.234
NblS	0.291
SphS <sup>ATPB</sup>	0.324
SphS	0.517
GyrB <sup>ATPB</sup>	0.465
Hsp90 <sup>ATPB</sup>	0.388

Tabla 4.7. Co-evolución entre SipA y NblS. Se muestran los valores de correlación, calculada mediante rmsd, entre las matrices de distancias de SipA y las proteínas indicadas. ATPB indica dominio de unión a ATP.

Este análisis supone un apoyo para la validación de la interacción detectada mediante el sistema del doble híbrido y un método de análisis evolutivo de la interacción NblS-SipA.

A pesar de haber recibido el mismo nombre, esta proteína cianobacteriana no presenta ningún tipo de similitud con la proteína SipA de *Salmonella* implicada en el proceso de invasión llevado a cabo por esta bacteria.

La gran cantidad y creciente información genómica disponible debe permitir hacer predicciones sobre diversos aspectos de la biología molecular. A parte de la identificación de proteínas homólogas, dominios proteicos y funciones de genes, la predicción de interacciones físicas entre proteínas parece ser un objetivo razonable. Es por ello, que en los últimos años se han

desarrollado diversas metodologías y trabajos con este fin (Bickel et al. 2002; Goh et al. 2000; Huynen et al. 2000; Pellegrini et al. 1999; Phizicky et al. 1995; Ramani & Marcotte 2003; Sprinzak et al. 2001). En este trabajo se ha obtenido un mismo resultado mediante una aproximación bioinformática que el observado previamente mediante una aproximación experimental, lo que incrementa la validez tanto del resultado obtenido como de los dos métodos empleados, además se ha podido hacer una predicción, extendiendo a un grupo de organismos una interacción a partir de su observación en uno de ellos.

#### **4.6 Interacciones en la regulación del metabolismo del nitrógeno en *Synechococcus*. Aportaciones de esta tesis.**

La figura 4.25 resume esquemáticamente el conocimiento actual sobre las interacciones reguladoras implicadas en el metabolismo del nitrógeno.

De entre las proteínas modificadoras de PII, actualmente, solo se ha identificado la fosfatasa de PII en *Synechocystis*, denominada PphA (Irmeler et al. 2001). Esta proteína tiene una homóloga en *Synechococcus* que es de esperar que cumpla una función similar. Por el contrario, la quinasa de PII aún no se ha identificado. En la regulación por amonio del transporte de nitrato participan PII y NrtC (Kobayashi et al. 1997; Lee et al. 1998) pero sigue sin conocerse ninguna interacción proteína-proteína involucrada en el proceso. Lo mismo sucede con los reguladores implicados en las respuestas a estrés, NbIR y NbIS, que parecen estar implicados en el mismo proceso (Grossman et al. 2001) pero entre los que no se tienen evidencias de que exista interacción directa. Por su parte, NbIR junto con NtcA participa en la activación del gen *nblA* (Luque et al. 2001) implicado en la degradación de los ficobilisomas del aparato fotosintético cianobacteriano. NtcA fue identificado al principio de los años 90 (Vega-Palas et al. 1992; Vega-Palas et al. 1990) y denominado el regulador global del nitrógeno por su papel en la represión por amonio de genes implicados en la asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno. El regulón *ntc* indicado en la figura 4.25

estaría compuesto por todos los genes controlados por NtcA.

La primera proteína regulada por PII identificada en cianobacterias ha sido la N-acetil glutamato quinasa o NAGK, identificada en las genotecas construidas en este trabajo y anotada con nº de acceso AY354518 en 2003. Además de averiguar el efecto positivo de PII para la actividad NAGK, hemos aportado datos sobre la conservación evolutiva de la interacción (Burillo et al. 2004), que están siendo apoyados por trabajos posteriores (Sugiyama et al. 2004). Las propiedades de los complejos PII-NAGK y de sus consecuencias en la actividad catalítica de NAGK han sido ya estudiadas en detalle (Heinrich et al. 2004; Maheswaran et al. 2004). El siguiente paso es la obtención de información estructural detallada sobre los complejos NAGK-PII en un trabajo que está en marcha en colaboración con otros grupos.

Una segunda proteína identificada en los escrutinios con PII fue PipX, proteína de función desconocida, anotada con nº de acceso AY301618 en 2003 y que además interacciona con NtcA. Aunque en esta tesis no pudimos demostrar su relevancia fisiológica, investigaciones posteriores, están aportando abundante información que esperamos publicar en un futuro próximo.

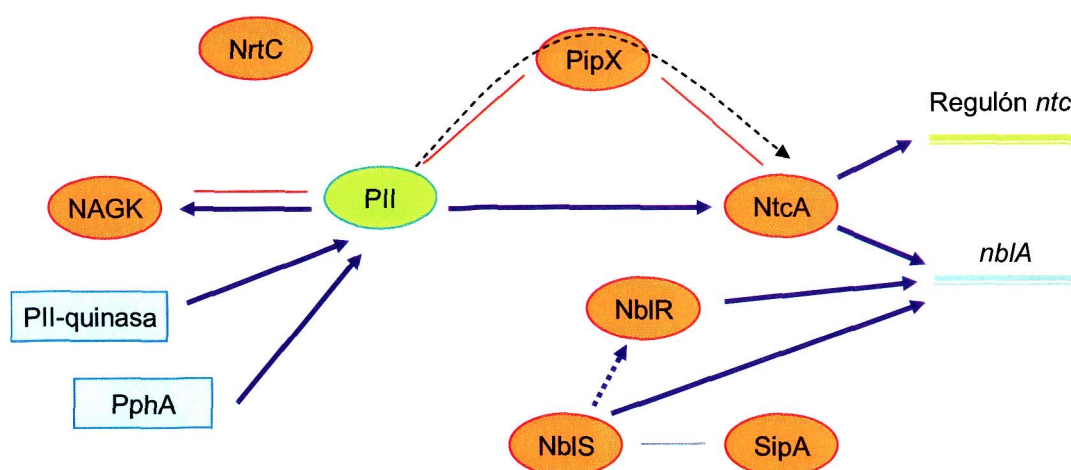


Figura 4.25. Interacciones relevantes en transducción de señales del nitrógeno. Las proteínas representadas por un círculo han sido empleadas en este trabajo, al contrario que las representadas por un cuadrado azul. Las flechas azules indican interacciones funcionales entre genes y proteínas, la flecha azul discontinua representa una posible interacción funcional no demostrada, las flechas negras apuntan hacia procesos fisiológicos en los que están implicados los genes o proteínas de las que parten, la flecha negra discontinua apunta a una posible interacción funcional y las líneas rojas indican interacciones físicas en el sistema del doble híbrido detectadas en este trabajo. La línea gris que conecta NblS y SipA indica evidencias de interacción en el doble híbrido apoyadas mediante aproximaciones bioinformáticas.



Mediante el sistema del doble híbrido, a partir de genotecas construidas en este trabajo, ha sido identificada la proteína SipA (Espinosa et al.). Además, en esta tesis se han aportado evidencias bioinformáticas de la co-evolución y conservación de esta interacción en el grupo de las cianobacterias.

Recientemente se ha publicado la identificación, en *Synechocystis* de PamA, proteína que interacciona con PII (Osanai et al. 2005). Aun así, no existen evidencias de que la interacción PamA-PII tenga lugar en todas las cianobacterias en las que está presente PamA, como *Synechococcus*.

En resumen, parte de los datos presentados en esta memoria han contribuido ya a dos publicaciones y confiamos que contribuyan a una tercera en preparación. No menos importante, las herramientas genéticas y datos generados han supuesto una importante contribución al grupo de investigación y han propiciado sólidas colaboraciones científicas con otros grupos.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 4. CONCLUSIONES

En este trabajo:

Se ha utilizado el sistema del doble híbrido en el análisis de proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno. Se ha detectado la interacción entre monómeros de la proteína PII de *Synechococcus* pero no entre PII y ninguna de las proteínas reguladoras NtcA, NrtC<sup>Δ(1-272)</sup> y NblS.

Se han construido genotecas y se han llevado a cabo escrutinios de éstas mediante el sistema del doble híbrido usando como cebo PII que han permitido identificar interacciones de interés en el contexto de esta tesis, como las proteínas NAGK y PipX. Además estas genotecas continúan siendo utilizadas en escrutinios con otros cebos.

Se ha obtenido y caracterizado la interacción NAGK-PII a diferentes niveles. Se ha mostrado que la interacción detectada supone una regulación de NAGK por parte de PII y se han aportado evidencias que sugieren su conservación en organismos pertenecientes al linaje cianobacteria – cloroplasto.

Se han identificado las interacciones PII-PipX y NtcA-PipX, lo que supone una conexión física entre dos reguladores centrales en transducción de señales del nitrógeno en cianobacterias.

Ya que durante la realización de gran parte de este trabajo no se disponía del genoma completo de *Synechococcus* sp. PCC 7942, se obtuvo la secuencia de la región genómica que contiene al gen *pipX*, que se ha enviado y ha sido anotada funcionalmente en la base de datos de secuencias. La obtención de esta secuencia también permitió la generación del mutante *pipX*.

Se ha generado un mutante nulo *pipX* como un paso inicial para la caracterización funcional del gen.

Se ha puesto de manifiesto mediante la aplicación de una aproximación bioinformática, la existencia de co-evolución entre la pareja de proteínas que interaccionan en el doble híbrido NblS y SipA. Esto supone un refuerzo al significado funcional de la interacción al sugerir su conservación en el grupo de las cianobacterias.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 5. BIBLIOGRAFÍA

Arcondeguy T, Jack R, Merrick M. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65 (1):80-105.

Atkinson MR, Kamberov ES, Weiss RL et al. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of the transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). *J Biol Chem* 1994; 269 (45):28288-93.

Atkinson MR, Ninfa AJ. Characterization of the GlnK protein of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1999; 32 (2):301-13.

Austin S, Buck M, Cannon W et al. Purification and in vitro activities of the native nitrogen fixation control proteins NifA and NifL. *J Bacteriol* 1994; 176 (12):3460-5.

Bartel P, C. T. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. Using the twohybrid system to detect protein-protein interactions. In: DA Hartley, editor, translator and editor Cellular interactions in development: a practical approach. Oxford, United Kingdom: Oxford Univertisty Press; 1993; p. 153-79.

Bickel PJ, Kechris KJ, Spector PC et al. Inaugural Article: finding important sites in protein sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (23):14764-71.

Birck C, Mourey L, Gouet P et al. Conformational changes induced by phosphorylation of the FixJ receiver domain. *Structure Fold Des* 1999; 7 (12):1505-15.

Bockholt R, Scholten-Beck G, Pistorius EK. Construction and partial characterization of an L-amino acid oxidase-free *Synechococcus* PCC 7942 mutant and localization of the L-amino acid oxidase in the corresponding wild type. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1307 (1):111-21.

Boussiba S, Dilling W, Gibson J. Methylammonium transport in *Anacystis nidulans* R-2. *J Bacteriol* 1984; 160 (1):204-10.

Brent R, Finley RL, Jr. Understanding gene and allele function with two-hybrid methods. *Annu Rev Genet* 1997; 31:663-704.

Burbulys D, Trach KA, Hoch JA. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 1991; 64 (3):545-52.

Burillo S, Luque I, Fuentes I et al. Interactions between the nitrogen signal transduction protein PII and N-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J Bacteriol* 2004; 186 (11):3346-54.

Cagney G, Uetz P, Fields S. High-throughput screening for protein-protein interactions using two-hybrid assay. *Methods Enzymol* 2000; 328:3-14.

Caldovic L, Tuchman M. N-acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochem J* 2003; 372 (Pt 2):279-90.

Castenholz RW, Waterbury JB. Group 1. Cyanobacteria. In: J. T. Staley; M. P. Bryant; NP & et al., editors, translator and editor Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins; 1989; p. 1710-27.

Collier JL, Grossman AR. Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J Bacteriol* 1992; 174 (14):4718-26.

Collier JL, Grossman AR. A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *Embo J* 1994; 13 (5):1039-47.

Coutts G, Thomas G, Blakey D et al. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *Embo J* 2002; 21 (4):536-45.

Cheah E, Carr PD, Suffolk PM et al. Structure of the *Escherichia coli* signal transducing protein PII. *Structure* 1994; 2 (10):981-90.

Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R et al. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88 (21):9578-82.

Dodsworth JA, Cady NC, Leigh JA. 2-Oxoglutarate and the PII homologues Nif11 and Nif12 regulate nitrogenase activity in cell extracts of *Methanococcus maripaludis*. *Mol Microbiol* 2005; 56 (6):1527-38.

Dolganov N, Grossman AR. A polypeptide with similarity to phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase involved in degradation of phycobilisomes. *J Bacteriol* 1999; 181 (2):610-7.

Elhai J, Wolk CP. A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* 1988; 68 (1):119-38.

Espinosa J, Fuentes I, Burillo S et al. SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS. *FEMS Microbiology Letters*.

Estojak J, Brent R, Golemis EA. Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol Cell Biol* 1995; 15 (10):5820-9.

Fadi Aldehni M, Sauer J, Spielhauer C et al. Signal transduction protein P(II) is required for NtcA-regulated gene expression during nitrogen deprivation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J Bacteriol* 2003; 185 (8):2582-91.

Falkowski PG, Katz ME, Knoll AH et al. The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. *Science* 2004; 305 (5682):354-60.

Fernandez-Murga ML, Gil-Ortiz F, Llacer JL et al. Arginine biosynthesis in *Thermotoga maritima*: characterization of the arginine-sensitive N-acetyl-L-glutamate kinase. *J Bacteriol* 2004; 186 (18):6142-9.

Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989; 340 (6230):245-6.

Forchhammer K, Hedler A, Strobel H et al. Heterotrimerization of PII-like signalling proteins: implications for PII-mediated signal transduction systems. *Mol Microbiol* 1999; 33 (2):338-49.

Forchhammer K, Tandeau de Marsac N. Functional analysis of the phosphoprotein PII (glnB gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 1995a; 177 (8):2033-40.

Forchhammer K, Tandeau de Marsac N. Phosphorylation of the PII protein (glnB gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of *in vitro* kinase activity. *J Bacteriol* 1995b; 177 (20):5812-7.

Forchhammer K, Tandeau de Marsac N. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 is modified by serine

phosphorylation and signals the cellular N-status. *J Bacteriol* 1994; 176 (1):84-91.

Garcia-Dominguez M, Reyes JC, Florencio FJ. Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (13):7161-6.

Garcia-Dominguez M, Reyes JC, Florencio FJ. NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 2000; 35 (5):1192-201.

Garcia-Fernandez JM, de Marsac NT, Diez J. Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68 (4):630-8.

Giovannoni SJ, Turner S, Olsen GJ et al. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol* 1988; 170 (8):3584-92.

Goh CS, Bogan AA, Joachimiak M et al. Co-evolution of proteins with their interaction partners. *J Mol Biol* 2000; 299 (2):283-93.

Golden S, Sherman L. Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J Bacteriol* 1984; 158 (1):36-42.

Golemis E. Protein-protein interactions: a molecular cloning manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. ix, 682 p.

Grossman AR, Bhaya D, He Q. Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. *J Biol Chem* 2001; 276 (15):11449-52.

Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG et al. Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. *J Bacteriol* 1993a; 175 (3):575-82.

Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG et al. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev* 1993b; 57 (3):725-49.



Haas D, Leisinger T. N-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and ligand-directed association-dissociation. *Eur J Biochem* 1975; 52 (2):365-75.

Hanahan D. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: D Glover, editor, translator and editor DNA cloning. Vol. 1: IRL Press, Oxford, United Kingdom; 1985; p. 109–35.

Harper JW, Adami GR, Wei N et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75 (4):805-16.

He L, Soupene E, Ninfa A et al. Physiological role for the GlnK protein of enteric bacteria: relief of NifL inhibition under nitrogen-limiting conditions. *J Bacteriol* 1998; 180 (24):6661-7.

Heinrich A, Maheswaran M, Ruppert U et al. The *Synechococcus elongatus* PII signal transduction protein controls arginine synthesis by complex formation with N-acetyl-L-glutamate kinase. *Mol Microbiol* 2004; 52 (5):1303-14.

Herrero A, Muro-Pastor AM, Flores E. Nitrogen control in cyanobacteria. *J Bacteriol* 2001; 183 (2):411-25.

Hesketh A, Fink D, Gust B et al. The GlnD and GlnK homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2) are functionally dissimilar to their nitrogen regulatory system counterparts from enteric bacteria. *Mol Microbiol* 2002; 46 (2):319-30.

Hisbergues M, Jeanjean R, Joset F et al. Protein PII regulates both inorganic carbon and nitrate uptake and is modified by a redox signal in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Lett* 1999; 463 (3):216-20.

Hodges M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J Exp Bot* 2002; 53 (370):905-16.

Honda D, Yokota A, Sugiyama J. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J Mol Evol* 1999; 48 (6):723-39.

Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ et al. A PII-like protein in *Arabidopsis*: putative role in nitrogen sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (23):13965-70.

Huynen M, Snel B, Lathe W, 3rd et al. Predicting protein function by genomic context: quantitative evaluation and qualitative inferences. *Genome Res* 2000; 10 (8):1204-10.

Irmeler A, Forchhammer K. A PP2C-type phosphatase dephosphorylates the PII signaling protein in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (23):12978-83.

Irmeler A, Sanner S, Dierks H et al. Dephosphorylation of the phosphoprotein P(II) in *Synechococcus* PCC 7942: identification of an ATP and 2-oxoglutarate-regulated phosphatase activity. *Mol Microbiol* 1997; 26 (1):81-90.

Ishige K, Nagasawa S, Tokishita S et al. A novel device of bacterial signal transducers. *Embo J* 1994; 13 (21):5195-202.

James P, Halladay J, Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996; 144 (4):1425-36.

Javelle A, Severi E, Thornton J et al. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. *J Biol Chem* 2004; 279 (10):8530-8.

Jiang P, Atkinson MR, Srisawat C et al. Functional dissection of the dimerization and enzymatic activities of *Escherichia coli* nitrogen regulator II and their regulation by the PII protein. *Biochemistry* 2000; 39 (44):13433-49.

Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ. Enzymological characterization of the signal-transducing uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and its interaction with the PII protein. *Biochemistry* 1998; 37 (37):12782-94.

Jiang P, Zucker P, Ninfa AJ. Probing interactions of the homotrimeric PII signal transduction protein with its receptors by use of PII heterotrimers formed in vitro from wild-type and mutant subunits. *J Bacteriol* 1997; 179 (13):4354-60.

Kamberov ES, Atkinson MR, Ninfa AJ. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein is activated upon binding 2-ketoglutarate and ATP. *J Biol Chem* 1995; 270 (30):17797-807.

Karimova G, Pidoux J, Ullmann A et al. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (10):5752-6.

Kessler PS, Daniel C, Leigh JA. Ammonia switch-off of nitrogen fixation in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*: mechanistic features and requirement for the novel GlnB homologues, Nifl(1) and Nifl(2). *J Bacteriol* 2001; 183 (3):882-9.

Kloft N, Rasch G, Forchhammer K. Protein phosphatase PphA from *Synechocystis* sp. PCC 6803: the physiological framework of PII-P dephosphorylation. *Microbiology* 2005; 151 (Pt 4):1275-83.

Kobayashi M, Rodriguez R, Lara C et al. Involvement of the C-terminal domain of an ATP-binding subunit in the regulation of the ABC-type nitrate/nitrite transporter of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Biol Chem* 1997; 272 (43):27197-201.

Kolonin MG, Zhong J, Finley RL. Interaction mating methods in two-hybrid systems. *Methods Enzymol* 2000; 328:26-46.

Kuhlemeier C, Thomas A, van der Ende A et al. A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Plasmid* 1983; 10 (2):156-63.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (5259):680-5.

Lancien M, Ferrario MrS, Roux Y et al. Simultaneous expression of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase and other Krebs cycle genes after nitrate resupply to short-term nitrogen-starved tobacco. *Plant Physiol* 1999; 120 (3):717-26.

Lee HM, Flores E, Forchhammer K et al. Phosphorylation of the signal transducer PII protein and an additional effector are required for the PII-mediated

regulation of nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Eur J Biochem* 2000; 267 (2):591-600.

Lee HM, Flores E, Herrero A et al. A role for the signal transduction protein PII in the control of nitrate/nitrite uptake in a cyanobacterium. *FEBS Lett* 1998; 427 (2):291-5.

Lee HM, Vazquez-Bermudez MF, de Marsac NT. The global nitrogen regulator NtcA regulates transcription of the signal transducer PII (GlnB) and influences its phosphorylation level in response to nitrogen and carbon supplies in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 1999; 181 (9):2697-702.

Li J, Swanson RV, Simon MI et al. The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry* 1995; 34 (45):14626-36.

Little R, Colombo V, Leech A et al. Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. *J Biol Chem* 2002; 277 (18):15472-81.

Little R, Reyes-Ramirez F, Zhang Y et al. Signal transduction to the *Azotobacter vinelandii* NIFL-NIFA regulatory system is influenced directly by interaction with 2-oxoglutarate and the PII regulatory protein. *Embo J* 2000; 19 (22):6041-50.

Luque I, E. Flores, and A. Herrero. Nitrate and nitrite transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 are mediated by the same permease. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1184:296–8.

Luque I, Flores E, Herrero A. Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *Embo J* 1994; 13 (23):5794.

Luque I, Zabulon G, Contreras A et al. Convergence of two global transcriptional regulators on nitrogen induction of the stress-acclimation gene *nblA* in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Mol Microbiol* 2001; 41 (4):937-47.

Ma J, Ptashne M. Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 1988; 55 (3):443-6.

Maheswaran M, Urbanke C, Forchhammer K. Complex formation and catalytic activation by the PII signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *Synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J Biol Chem* 2004; 279 (53):55202-10.

Maloy SR. Experimental techniques in bacterial genetics. Boston: Jones and Bartlett; 1990. 180 P. p. (Jones and Bartlett series in biology).

Marinus MG. Location of DNA methylation genes on the *Escherichia coli* K-12 genetic map. *Mol Gen Genet* 1973; 127 (1):47-55.

Martin W. Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (15):8612-4.

Martin W, Rujan T, Richly E et al. Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (19):12246-51.

Martinez-Argudo I, Contreras A. PII T-loop mutations affecting signal transduction to NtrB also abolish yeast two-hybrid interactions. *J Bacteriol* 2002a; 184 (13):3746-8.

Martinez-Argudo I, Martin-Nieto J, Salinas P et al. Two-hybrid analysis of domain interactions involving NtrB and NtrC two-component regulators. *Mol Microbiol* 2001; 40 (1):169-78.

Martinez-Argudo I, Salinas P, Maldonado R et al. Domain interactions on the ntr signal transduction pathway: two-hybrid analysis of mutant and truncated derivatives of histidine kinase NtrB. *J Bacteriol* 2002b; 184 (1):200-6.

McKay G, Shargool PD. Purification and characterization of N-acetylglutamate 5-phosphotransferase from pea (*Pisum sativum*) cotyledons. *Biochem J* 1981; 195 (1):71-81.

Moreira D, Le Guyader H, Philippe H. The origin of red algae and the evolution of chloroplasts. *Nature* 2000; 405 (6782):69-72.

Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ. Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J Biol Chem* 2001; 276 (41):38320-8.

Ninfa AJ, Atkinson MR. PII signal transduction proteins. *Trends Microbiol* 2000; 8 (4):172-9.

Ninfa AJ, Jiang P. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8 (2):168-73.

Ninfa AJ, Magasanik B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83 (16):5909-13.

Ohta N, Newton A. The core dimerization domains of histidine kinases contain recognition specificity for the cognate response regulator. *J Bacteriol* 2003; 185 (15):4424-31.

Oliveira IC, Coruzzi GM. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 1999; 121 (1):301-10.

Omata T. Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Cell Physiol* 1995; 36 (2):207-13.

Osanai T, Sato S, Tabata S et al. Identification of PamA as a PII-binding membrane protein important in nitrogen-related and sugar-catabolic gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Biol Chem* 2005; 280 (41):34684-90.

Palinska KA, Laloui W, Bedu S et al. The signal transducer P(II) and bicarbonate acquisition in *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, a marine cyanobacterium naturally deficient in nitrate and nitrite assimilation. *Microbiology* 2002; 148 (Pt 8):2405-12.

Paz-Yepes J, Flores E, Herrero A. Transcriptional effects of the signal transduction protein P(II) (*glnB* gene product) on NtcA-dependent genes in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *FEBS Lett* 2003; 543 (1-3):42-6.

Pellegrini M, Marcotte EM, Thompson MJ et al. Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (8):4285-8.

Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 1995; 59 (1):94-123.

Pollock DD, Taylor WR, Goldman N. Coevolving protein residues: maximum likelihood identification and relationship to structure. *J Mol Biol* 1999; 287 (1):187-98.

Raleigh EA, Wilson G. *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83 (23):9070-4.

Ramani AK, Marcotte EM. Exploiting the co-evolution of interacting proteins to discover interaction specificity. *J Mol Biol* 2003; 327 (1):273-84.

Ramon-Maiques S, Marina A, Gil-Ortiz F et al. Structure of acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis. *Structure (Camb)* 2002; 10 (3):329-42.

Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol* 1988; 167:3-27.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury J et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol* 1979; 111:1-61.

Robertson BR, Tezuka N, Watanabe MM. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51 (Pt 3):861-71.

Roder KH, Wolf SS, Schweizer M. Refinement of vectors for use in the yeast two-hybrid system. *Anal Biochem* 1996; 241 (2):260-2.

Ruppert U, Irmeler A, Kloft N et al. The novel protein phosphatase PphA from *Synechocystis* PCC 6803 controls dephosphorylation of the signalling protein PII. *Mol Microbiol* 2002; 44 (3):855-64.

Salinas P, Contreras A. Identification and analysis of *Escherichia coli* proteins that interact with the histidine kinase NtrB in a yeast two-hybrid system. *Mol Genet Genomics* 2003; 269 (4):574-81.

Schwarz R, Forchhammer K. Acclimation of unicellular cyanobacteria to macronutrient deficiency: emergence of a complex network of cellular responses. *Microbiology* 2005; 151 (Pt 8):2503-14.

Schwarz R, Grossman AR. A response regulator of cyanobacteria integrates diverse environmental signals and is critical for survival under extreme conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 (18):11008-13.

Shestakov S, Khyen N. Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Mol Gen Genet* 1970; 107:372-5.

Slocum RD. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. *Plant Physiol Biochem* 2005; 43 (8):729-45.

Smith CS, Morrice NA, Moorhead GB. Lack of evidence for phosphorylation of *Arabidopsis thaliana* PII: implications for plastid carbon and nitrogen signaling. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1699 (1-2):145-54.

Smith CS, Weljie AM, Moorhead GB. Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2003; 33 (2):353-60.

Sprinzak E, Margalit H. Correlated sequence-signatures as markers of protein-protein interaction. *J Mol Biol* 2001; 311 (4):681-92.

Stiller JW, Hall BD. The origin of red algae: implications for plastid evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (9):4520-5.

Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2000; 69:183-215.

Strosser J, Ludke A, Schaffer S et al. Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* 2004; 54 (1):132-47.

Sugiyama K, Hayakawa T, Kudo T et al. Interaction of N-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice. *Plant Cell Physiol* 2004; 45 (12):1768-78.



Tanigawa R, Shirokane M, Maeda Si S et al. Transcriptional activation of NtcA-dependent promoters of *Synechococcus* sp. PCC 7942 by 2-oxoglutarate in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 (7):4251-5.

Thomas G, Coutts G, Merrick M. The *glnKamtB* operon. A conserved gene pair in prokaryotes. *Trends Genet* 2000; 16 (1):11-4.

van Heeswijk WC, Hoving S, Molenaar D et al. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1996; 21 (1):133-46.

van Waasbergen LG, Dolganov N, Grossman AR. nbIS, a gene involved in controlling photosynthesis-related gene expression during high light and nutrient stress in *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *J Bacteriol* 2002; 184 (9):2481-90.

Vazquez-Bermudez MF, Herrero A, Flores E. 2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the *Synechococcus glnA* promoter. *FEBS Lett* 2002a; 512 (1-3):71-4.

Vazquez-Bermudez MF, Paz-Yepes J, Herrero A et al. The NtcA-activated *amt1* gene encodes a permease required for uptake of low concentrations of ammonium in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Microbiology* 2002b; 148 (Pt 3):861-9.

Vega-Palas MA, Flores E, Herrero A. NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol Microbiol* 1992; 6 (13):1853-9.

Vega-Palas MA, Madueno F, Herrero A et al. Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 1990; 172 (2):643-7.

Walhout AJ, Boulton SJ, Vidal M. Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast* 2000; 17 (2):88-94.

Wolk CP. Heterocyst formation. *Annu Rev Genet* 1996; 30:59-78.

Wolters MA, Bodnar ME, Strem MD et al. Deregulation of arginine biosynthesis in *Synechococcus* sp. PCC7942. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1991; 35:56-9.

Xiong J, Bauer CE. Complex evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 2002; 53:503-21.

Xu Y, Carr PD, Clancy P et al. The structures of the PII proteins from the cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942 and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59 (Pt 12):2183-90.

Xu Y, Carr PD, Huber T et al. The structure of the PII-ATP complex. *Eur J Biochem* 2001; 268 (7):2028-37.

Zhang CC. A gene encoding a protein related to eukaryotic protein kinases from the filamentous heterocystous cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (24):11840-4.