



Caracterización de genes duplicados de treonil tRNA
sintetasa en la cianobacteria
filamentosa *Anabaena* sp. PCC 7120

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

Sevilla, 8 Marzo 2013

Director

Tutor

Dr. Ignacio Luque Romero
Científico Titular del CSIC

Dr. Manuel Hervas Morón
Catedrático
de Bioquímica y Biología Molecular

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ABREVIATURAS.....	8

1. Introducción	12
1.1 Aminoacil-tRNA sintetetas.....	13
1.1.1 Generalidades	13
1.1.2 Clasificación de las aminoacil tRNA sintetetas.....	15
1.1.3 Evolución de las aminoacil-tRNA sintetetas.....	19
1.1.3.1 Evolución temprana. El origen del código genético	19
1.1.3.2 Evolución reciente de las aaRSs	21
1.1.3.3 Genes de aaRS duplicados.....	23
1.1.4. Corrección de errores.....	27
1.1.5 Funciones de las aaRSs.....	29
1.1.5.1 Funciones de los aminoacil-tRNAs no relacionadas con la síntesis de proteínas	30
1.1.5.2 Funciones moonlight.....	32
1.1.5.2.1 Control de la transcripción	32
1.1.5.2.2 Maduración de intrones.....	33
1.1.5.2.3 Control de la traducción.....	33
1.1.5.2.4 Citoquinas.....	34
1.1.6 La treonil tRNA sintetasa	36
1.1.6.1 Composición de dominios y estructura	36
1.1.6.2. Evolución de los dominios N-terminales de la ThrRS	41
1.1.6.3 Reconocimiento de los tRNA ^{Thr}	43
1.1.6.3.1 Determinantes de identidad del tRNA ^{Thr}	43
1.1.6.3.2 La ThrRS de E. coli es una proteína multifunción (moonlighting)	44
1.2. Las Cianobacterias	46
1.2.1 Origen de las cianobacterias.....	46
1.2.2 La evolución de las cianobacterias.....	48
1.2.3 El árbol filogenético de las cianobacterias. Clasificación taxonómica de las especies cianobacterianas.	49
1.2.4 El genoma de las cianobacterias	51
1.2.5 Rasgos metabólicos característicos de las cianobacterias.....	52
1.2.6 La diferenciación celular	54
1.2.7 El reloj circadiano de las cianobacterias	55
1.2.8. aaRSs ancladas a membranas.	55
1.3 Biología de los metales.....	57
1.3.1 Generalidades	57
1.3.2 El zinc en biología.....	60
1.3.2.1 Mecanismos moleculares implicados en la homeostasis de zinc.....	61
1.3.2.2 Papel del zinc en las aaRSs	62
1.3.3 Reguladores relacionados con la homeostasis de metales.....	63
1.3.3.1 Generalidades.....	63
1.3.3.2 Familia FUR de reguladores dependientes de metales.....	64
1.3.3.3. Reguladores de la familia FUR en cianobacterias.....	65
1.3.3.4 Zur	66
1.4 Objetivos	69

2. Materiales y Métodos	70
2.1 Organismos y condiciones de cultivo	71
2.1.1 Cianobacterias	71
2.1.1.1 Estirpes de cianobacterias utilizadas	71
2.1.1.2 Medios y condiciones de cultivo	71
2.1.1.3 Método de recogida y lavado de células	72
2.1.2 Escherichia coli.....	73
2.1.2.1 Estirpes utilizadas.....	73
2.1.2.2 Medios y condiciones de cultivo	73
2.2 Métodos de manipulación y Análisis de DNA	74
2.2.1 Plásmidos utilizados	74
2.2.1.1 Plásmidos no generados en este trabajo	74
2.2.1.2 Plásmidos contruidos en este trabajo	75
2.2.2 Aislamiento de DNA.....	78
2.2.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico de E.coli	78
2.2.2.2 Aislamiento de DNA total de E. coli	79
2.2.2.3 Aislamiento de DNA total de Cianobacterias.....	79
2.2.3 Determinación de la concentración de DNA.....	80
2.2.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa.....	80
2.2.5 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	80
2.2.6 Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	81
2.2.7 Secuenciación del DNA.....	89
2.2.8 Tratamientos enzimáticos del DNA.....	90
2.2.8.1 Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.	90
2.2.8.2 Defosforilación del DNA	90
2.2.8.3 Relleno de extremos 3' recesivos	90
2.2.8.4 Ligación del DNA.....	91
2.2.8.5 Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA.....	91
2.3 Métodos de manipulación y análisis del RNA	92
2.3.1 Aislamiento de RNA de cianobacterias	92
2.3.2 Sobreexpresión en Escherichia coli y purificación de tRNAs ^{Thr} de Anabaena sp. PCC 7120.	93
2.3.3 Sobreexpresión y purificación de tRNAs.....	94
2.3.4 Determinación de la concentración de RNA	95
2.3.5 Electroforesis de RNA en geles de agarosa	95
2.3.6 Electroforesis de RNA en geles de acrilamida.....	95
2.3.7.1 Transferencia de RNA de geles de agarosa a filtros de nailon	96
2.3.7.2 Transferencia de RNA de geles de poliacrilamida a filtros de nailon	97
2.3.7.3 Hibridación de RNA con sondas radiactivas.....	97
2.3.8 Detección de la radiactividad	98
2.3.9 RT-PCR.....	98
2.3.10 5' - RACE.....	98
2.3.11 Ensayos de extensión del cebador (<i>primer extension</i>)	99
2.4 Métodos de purificación y análisis de proteínas	100
2.4.1 Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad por níquel.....	100
2.4.2 Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad por estreptavidina	102
2.4.3 Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida-SDS.....	102
2.4.4 Tinción de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida con azul de <i>Coomassie R-</i> <i>250</i>	103
2.4.6 Inmunnodetección de proteínas (<i>Western blot</i>)	104
2.4.8 Cromatografía de exclusión molecular	105
2.5 Análisis de interacción DNA-Proteína	105
2.5.1 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).....	105
2.6 Determinación de la concentración de clorofila	106

2.7 Procedimientos Genéticos	107
2.7.1 Transferencia de DNA a <i>E.coli</i> mediante transformación	107
2.7.2 Transferencia de DNA a <i>E. coli</i> mediante electroporación.....	107
2.7.3 Trasferencia de DNA a <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 mediante conjugación	107
2.8 Detección de luminescencia	109
2.9 Análisis informáticos de secuencias de DNA Y PROTEÍNAS.....	109
2.10 Elaboración de árboles filgenéticos	109
3. Resultados	110
3.1 Algunos genomas de cianobacterias contienen genes de treonil-tRNA sintetasa duplicados.....	111
3.2 Análisis de la funcionalidad de los genes <i>thrS1</i> y <i>thrS2</i>.	116
3.3 Inactivación de los genes <i>thrS1</i> y <i>thrS2</i> mediante mutagénesis insercional.	122
3.4. Análisis de la expresión de <i>thrS1</i> y <i>thrS2</i>	124
3.6 Análisis de la expresión de los genes circundantes a <i>thrS2</i>.....	126
3.7 Identificación de los límites del operón	130
3.8 Identificación y caracterización de promotores.....	132
3.9 Análisis de la regulación de los promotores del operón <i>all4725-all4721</i>	136
3.10 Análisis del papel de All4723 en la regulación del operón <i>all4725-all4721</i>.	138
3.11 Análisis del cofactor metálico de All4723	141
3.12 Caracterización de la secuencia de unión de ZUR	144
3.13 Caracterización funcional de los promotores del operón	150
3.15 La inserción de una cassette de resistencia a antibióticos suprime la inducción de los promotores de <i>all4722</i> y <i>all4721</i>.....	154
3.16 La inducción de <i>all4722</i> y <i>all4721</i> no depende de All4723	155
3.17 Los promotores de <i>all4722</i> y <i>all4721</i> adoptan el patrón de regulación de un promotor insertado aguas arriba	160
3.18 La actividad de los promotores P2 y P1 puede estar controlada por un represor.....	163
3.19 Análisis del funcionamiento del sistema ThrRS1-ThrRS2.....	165
3.20 Análisis de los perfiles de expresión de los tRNAs^{Thr} de <i>Anabaena</i> 7120.....	173
3.21 Análisis de la función del producto del gen <i>all4722</i>	173
3.22 Análisis de la expresión de los genes <i>cysS</i> y <i>alr1093</i>.....	175
4. Discusión.....	177
4.1 La duplicación de los genes <i>thrS</i>	178
4.2 Expresión diferencial de los genes <i>thrS</i>.....	186
4.3 El operón <i>all4725-all4721</i>	187
4.4 Elementos reguladores del operón <i>all4725-all4721</i>	193
4.5 Funcionamiento del sistema ThrRS1/ThrRS2	202
4.5.1 Estructura cuaternaria de las ThrRSs.....	202
4.5.2 El papel de ThrRS1 y ThrRS2 en la adaptación de <i>Anabaena</i> a las condiciones ambientales de disponibilidad de zinc	203
5. Conclusiones.....	207
6. Bibliografía	210

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Reacción de aminoacilación	14
Figura 1.2. Diferencias entre aaRS de las dos clases	17
Figura 1.3. Motivos conservados del dominio catalítico de las aaRSs de clase II	18
Figura 1.4. Corrección de errores en las aminoacil-tRNA sintetasas	28
Figura 1.5. Funciones de los aminoacil-tRNAs	31
Figura 1.6. Funciones <i>moonlight</i> de las aminoacil tRNA sintetasas	35
Figura 1.7. Estructura de un monómero de ThrRS de <i>E. coli</i>	36
Figura 1.8. Interacciones entre tRNAy ThrRS	37
Figura 1.9. Representación esquemática de la geometría de coordinación del átomo de zinc antes y después de la unión del aminoácido	39
Figura 1.10. Discriminación de la valina en el sitio activo	39
Figura 1.11. Interacción entre el tRNA ^{Thr} y el dominio de union al anticodon de ThrRS	40
Figura 1.12. Comparación de dominios entre ThrRSs de los tres grandes dominios de la vida	42
Figura 1.13. Comparación entre los tRNAs ^{Thr} de <i>T. termophilus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i>	43
Figura 1.14. Control traduccional de ThrRS	45
Figura 1.15. Exponentes de cada una de las cinco secciones de la clasificación morfológica de Rippka	50
Figura 1.16. Árbol filogenético de cianobacterias	51
Figura 1.17. Ciclo de los ácidos carboxílicos en <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7002	53
Figura 1.18. Estructura del represor Zur de <i>Streptomyces coelicor</i>	68
Figura 2.1. Esquema del procedimiento para amplificar las secuencias de DNA portadoras de los genes de los tRNAs ^{Thr} e introducir la secuencia CCA en el extremo 3'	93
Figura 3.1. Indels como elementos identificativos de ThrRS1 y ThrRS2	115
Figura 3.2. Ensayo de complementación	118
Figura 3.3. Ensayo de complementación	119
Figura 3.4. Comprobación de la expresión de los tRNA ^{Thr} en <i>E. coli</i> XL1Blue	121
Fig. 3.5. Ensayo de aminoacilación	121
Fig. 3.6. Estructura genómica de la estirpes con la inserción de la C.S3 en <i>thrS1</i> y <i>thrS2</i>	124
Figura 3.7. Inducción de la expresión de <i>thrS2</i> mediante adición de TPEN	126
Figura 3.8. Contexto génomico de <i>thrS2</i>	128
Figura 3.9. RT-PCR de <i>alr4380 alr5287</i> , genes homólogos respectivamente de <i>all4725</i> y <i>all4721</i>	128
Figura 3.10. Regulación transcripcional de los genes del agrupamiento <i>all4729 – all4721</i>	129
Figura 3.11. Determinación de los límites del operón por RT-PCR	131

Figura 3.12. Esquema explicativo de la técnica del 5'- RACE	134
Figura 3.13. Mapeo de promotores	135
Figura 3.14. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética con las tres proteínas miembros de la familia FUR	137
Figura 3.15. Ensayos de EMSA para analizar la unión de la proteína ZUR a los promotores de <i>all4725</i> , <i>all4723</i> , <i>all4722</i> y <i>all4721</i>	138
Figura 3.16. Comprobación de la estructura cromosómica del mutante MN38	140
Figura 3.17. Papel de All2473 como represor del operón <i>all4725-all4721</i>	140
Figura 3.18. Respuesta de <i>isiA</i> y <i>petE</i> al TPEN	142
Figura 3.19. La unión de All2473 al DNA es dependiente de zinc	143
Figura 3.20. Caracterización de la secuencia de unión de Zur mediante ensayos EMSA	148
Figura 3.21. Ensayos de EMSA para determinar la contribución relativa de las secuencias flanqueantes al sitio de unión de ZUR	148
Figura 3.22. Determinación de la K_d de Zur para los promotores de <i>all4723</i> y <i>all4721</i>	149
Figura 3.23. Los promotores P2 y P1 se inducen por deficiencia de cationes divalentes	152
Figura 3.24. Los 4 promotores del operón <i>all4725-all4721</i> se expresan constitutivamente en un mutante <i>zur</i>	153
Figura 3.25. Una inserción polar en <i>all4723</i> suprime la inducción de los promotores de <i>all4722</i> y de <i>all4721</i>	154
Figura 3.26. Comprobación de la estructura cromosómica del mutante MN42	157
Figura 3.27. La inducción de <i>all4722</i> y <i>all4721</i> no depende de All4723	158
Figura 3.28. Análisis de la regulación de los promotores P2 y P1 en los mutantes MN8 y MN42	159
Figura 3.29. Regulación de los promotores P2 y P1 en el mutante MN52	162
Figura 3.30. Análisis de la actividad de los promotores de <i>Anabaena</i> P2 y P1 en <i>E. coli</i>	164
Figura 3.31. Cromatografía de exclusión molecular	166
Figura 3.32. Copurificación de ThrRS1 y ThrRS2	171
Figura 3.33. Comprobación de la estructura genómica del mutante MN31	172
Figura 3.34. Copurificación de ThrRS1 y ThrRS2	172
Figura 3.35. Análisis de la expresión de los genes <i>trnT</i> en <i>Anabaena</i> y en MN38	173
Figura 3.36. Comprobación de la estructura cromosómica del mutante MN43	175
Figura 3.37. Análisis de la expresión de los genes <i>cysS</i> y <i>alr1093</i>	176
Figura 4.1. Árbol filogenético de cianobacterias	181
Figura 4.2. Estructura de ThrRS de <i>E. coli</i> acoplada con el tRNA ^{Thr}	182
Figura 4.3. Alineamiento de secuencias de ThrRS2 de cianobacterias	182
Figura 4.4. Comparación entre tRNAs ^{Thr} de cianobacterias y <i>E. coli</i>	184

Figura 4.5. Diferencias entre ThrRS1 y ThrS2 en el residuo implicado en el contacto con A73 del tRNA ^{Thr}	186
Figura 4.6. Comparación de sitios activos de porfobilinógeno sintasas de cianobacterias	189
Figura 4.7. Alineamiento de secuencias de las proteínas tipo COG0523 de <i>Anabaena</i> 7120	191
Figura 4.8. Conservación parcial del operón <i>all4725-all4721</i> en cianobacterias	193
Figura 4.9. Activación de Zur	195
Figura 4.10. Alineamiento de secuencias de proteínas Zur	195
Figura 4.11. Modelo de regulación de los promotores en el operón <i>all4725-all4721</i>	201
Figura 4.12. Conservación de los residuos de coordinación de zinc en ThrRS1 y ThrRS2	204
Figura 4.13. Características distintivas del tRNA ^{Thr} _{UGU2} de <i>Anabena</i> 7120	205
Figura 4.14. Modelo de funcionamiento del sistema ThrRS1/ThrRS2	206

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. División en clases y subclases de las aaRSs	18
Tabla 1.2. Clasificación morfológica de las especies bacterianas según Rippka 1979	50
Tabla 2.1. Estirpes mutantes derivadas de <i>Anabaena</i> sp PCC 7120 generadas en este trabajo	71
Tabla 2.2. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo	73
Tabla 2.3. Plásmidos no generados en este trabajo	74
Tabla 2.4. Plásmidos generados durante este trabajo	75
Tabla 2.5. Descripción de las DNA polimerasas utilizadas en este trabajo	81
Tabla 2.6. Descripción de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo	82
Tabla 3.1. Especies de cianobacterias cuyos genomas contienen mas de un gen <i>thrS</i>	112
Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados en el experimento de RT-PCR y tamaño esperado para cada amplicón	131

Abreviaturas

5'RACE	Rapid Amplification of 5' cDNA Ends
A	Absorbancia
aa	aminoácido
aaRS	Aminoacil-tRNA sintetasa
AMP	Adenosina Monofosfato
Ap	Ampicilina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	par de bases (base pair)
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
Cm	Cloramfenicol
ddNTPs	didesoxirribonucleósidos trifosfato (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DO	Densidad Optica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenatilotetraacético
EMSA	Ensayo de movilidad electroforética (<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>)
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HGT	Trasferencia horizontal de genes
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
K_d	Constante de disociación
kDA	Kilodalton

Km	Kanamicina
L-Thr	L-Treonina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
μE	microEinstein
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Nm	Neomicina
ORF	Pauta de lectura abierta (<i>Open Reading Frame</i>)
p/v	Reacción peso-volumen
PAGE	Electroforésis en geles de poliacrilamida
PCC	Colección de Cultivos Tipo del Instituto Pasteur (<i>Pasteur Culture Collection</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNK	Polinucleótido quinasa
Ppi	Pirofosfato
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón (<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sep	O-fosfoserina
Spec	Espectinomicina
Strep	Estreptomicina
TAP	Fosfatasa alcalina de tabaco
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TCA	Ácido Tricloroacético

TEMED	N, N, N', N'-tetra-metilendiamina
TES	Ácido N' tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
TES	Ácido N' tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico
TPEN	N, N, N', N'-tetra(piridimetil)etilendiamina
Tris	Tris-(hidroxilmetil)aminometano
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
tsp	Sitio de inicio de la transcripción
U	Unidad de Actividad Enzimática
v/v	Reacción volumen-volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
Zn	Zinc

Introducción

1. Introducción

Introducción

1.1 Aminoacil-tRNA sintetasas

1.1.1 Generalidades

Las aminoacil tRNA sintetasas (aaRSs) son las enzimas que catalizan la reacción de aminoacilación que consiste en la unión de un aminoácido al extremo 3' de un tRNA mediante un enlace éster. El producto de esta reacción es un aminoacil-tRNA, que sirve como sustrato en la síntesis proteica en el ribosoma. A lo largo de esta memoria de tesis se utilizará la terminología convencional para denominar abreviadamente cada aaRS, según la cual una aaRS específica para un aminoácido se denomina por el código de tres letras de éste seguido de las letras "RS", por ejemplo, "TyrRS" para la tirosil tRNA sintetasa.

Las aaRSs se descubrieron en la década de los 50 del siglo XX gracias al trabajo de Lipmann, Hoagland, Berg, Novelli y Zamenick entre otros, que tras constatar que un paso clave en la formación de las proteínas era la activación del aminoácido (formación de un compuesto de alta energía entre ATP y aminoácido) (Hoagland, 1955) comenzaron a investigar cuáles eran las enzimas que catalizaban esta reacción. Incubando extractos de *E. coli* o hígado de rata con ATP y aminoácidos marcados observaron que éstos se asimilaban a un compuesto ácido que identificaron como un RNA soluble (Berg & Offengand, 1958), (Hoagland et al, 1958). Este RNA se caracterizó en el laboratorio de Paul Zamenick y hoy se conoce como tRNA o RNA de transferencia (Hoagland et al, 1958), cuya existencia predijo sólo tres años antes Francis Crick en su hipótesis del adaptador (*the adaptor molecule*) (Crick, 1956). M. B. Hoagland y P. Zamenick observaron que la activación del aminoácido estaba catalizada por una enzima (una aminoacil tRNA sintetasa) que mediaba también la transferencia de éste al tRNA (Hoagland, 1958).

La reacción de aminoacilación ocurre en dos pasos (Figura 1.1). El primero consiste en la activación del aminoácido, en el que se libera pirofosfato (PP_i) y se forma un aminoacil-adenilato (aa-AMP) que permanece unido a la enzima. El enlace que se establece entre el grupo carboxilo del aminoácido y el fosfato α del ATP es un enlace de alta energía. En este paso, la mayoría de las aaRSs no requieren la intervención del tRNA, excepto la GluRS, GlnRS, ArgRS y la LysRS de clase I. En el segundo paso, el aminoácido del aa-AMP unido al centro catalítico de la aaRS, es transferido al nucleótido terminal del extremo 3' del tRNA que es siempre una adenina (A76), con la

Introducción

consiguiente liberación de AMP. El enlace éster se establece entre el grupo carboxilo del aminoácido y el grupo hidroxilo en posición 2' o 3' de la ribosa del nucleótido A76 (Söll & Schimmel, 1974), (Schimmel & Soll, 1979).

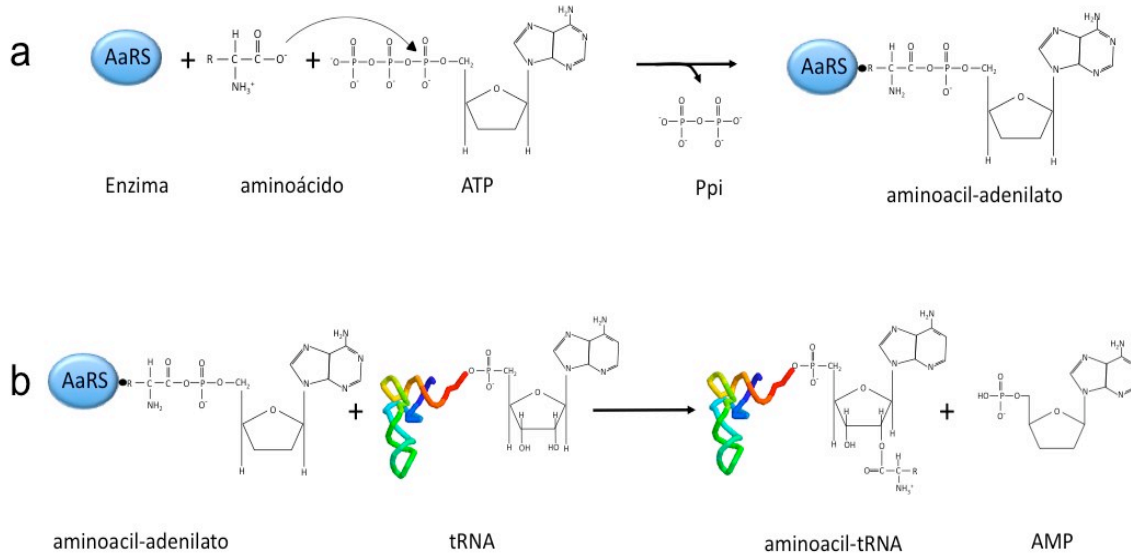


Figura 1.1. Reacción de aminoacilación (a) Activación del aminoácido. (b) Transferencia del aminoácido al tRNA

En la reacción de aminoacilación se combina en una misma molécula (el aminoacil-tRNA o aa-tRNA) un triplete de nucleótidos y el aminoácido que le corresponde según el código genético, lo que constituye un paso esencial en la traducción del mensaje genético de la célula. Estableciendo un símil con el desciframiento de un mensaje encriptado, se puede decir que las aaRSs son las enzimas que *conocen* la clave, esto es, las reglas de correspondencia entre tripletes de nucleótidos y aminoácidos, que es lo que conocemos como código genético. No es sorprendente por tanto que la historia evolutiva de las aminoacil-tRNA sintetasas esté estrictamente asociada con la evolución del código genético (Woese et al, 2000). Del mismo modo, puesto que la distribución del código genético en los seres vivos es universal (con pocas excepciones), la distribución y el funcionamiento de las aaRSs es asimismo universal con algunas excepciones.

Puesto que las proteínas están compuestas por 20 L-aminoácidos, en general las células cuentan con una dotación de 20 aaRSs, una para cada aminoácido. No obstante, en muchos procariontes el conjunto de aaRSs es inferior a 20 debido a la ausencia de GlnRS, AsnRS y particularmente en arqueas, CysRS. Para la síntesis de los aminoacil-

Introducción

tRNAs correspondientes, estos organismos utilizan una ruta alternativa que se conoce como “vía indirecta”. Las arqueas y la mayor parte de las bacterias utilizan GluRSs y AspRSs de especificidad relajada, que tienen la capacidad de reconocer los tRNA^{Gln} y tRNA^{Asn} y cargarlos con Glu y Asp formando Glu-tRNA^{Gln} y Asp-tRNA^{Asn} respectivamente. A continuación, una amidotransferasa convierte Glu-tRNA^{Gln} y Asp-tRNA^{Asn} en Gln-tRNA^{Gln} y Asn-tRNA^{Asn}, respectivamente (Curnow et al, 1996), (Ibba & Soll, 2004), (Ibba et al, 2000). En algunas Arqueas la orto-fosfoseril-tRNA sintetasa (SepRS) carga el tRNA^{Cys} con ortofosfoserina que es posteriormente convertida en cisteína por la Sep-tRNA^{Cys}-tRNA sintetasa (SepCysS) (Sauerwald et al, 2005).

1.1.2 Clasificación de las aminoacil tRNA sintetisas

A pesar de que las aaRSs catalizan la misma reacción, no comparten un origen evolutivo común a todas ellas. Múltiples evidencias demuestran que existen dos grupos de aaRSs con orígenes evolutivos distintos, lo que ha llevado a clasificarlas en dos clases, cuyos miembros muestran diferencias en su secuencia, estructura y mecanismo catalítico con respecto a los miembros de la otra clase (Eriani et al, 1990); (Cusack et al, 1990), (Ibba & Soll, 2000). La suma de las 11 enzimas de la clase I y las 10 enzimas de la clase II supera el número de 20 aaRSs esperable según el número de L-aminoácidos de las proteínas. Ello se debe a la existencia de dos LysRS distintas, una de cada clase, lo que constituye un ejemplo claro de convergencia evolutiva (Ibba et al, 1997b). De ellas, la de distribución más extendida es la LysRS II (de la clase II), mientras que la LysRS I se encuentra sólo en algunos procariotas, generalmente arqueas (Terada et al, 2002).

Los miembros de cada clase comparten un origen evolutivo común que habría sido una proteína ancestral probablemente constituida por un sólo dominio catalítico y con una especificidad relajada. La evolución, a través de múltiples eventos de duplicación génica y divergencia de los genes resultantes habría ido generando enzimas con una mayor especificidad por aminoácidos y tRNAs. La mayor parte de este proceso habría tenido lugar en la etapa anterior al último ancestro común universal (LUCA, según sus siglas en inglés). Dada la distribución universal del código genético, se considera probable que el LUCA hubiera tenido un código genético completo o casi completo y habría contado con un juego casi completo de aaRSs. Estas enzimas son por tanto

Introducción

proteínas con un origen muy antiguo en la evolución (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001), (Fournier et al, 2011), (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2000).

Ambas clases muestran diferencias notables en cuanto a la estructura del dominio catalítico (Figura 1.2a y b). El de las enzimas de clase I se caracteriza por un plegamiento de tipo Rossmann de unión a nucleótidos compuesto por una alternancia de hojas β y hélices α y que contiene los motivos conservados HIGH y KMSKS. En cambio, las enzimas de clase II tienen un dominio catalítico formado por 7 hojas β flanqueadas por 3 hélices α y que contiene tres motivos de secuencia degenerados (Figuras 1.2a y 1.3) (Ibba & Soll, 2000). De éstos, el motivo 1 está implicado en la dimerización, mientras que los motivos 2 y 3 se encuentran cerca del sitio activo y participan en la unión del ATP, del aminoácido y en la unión del brazo aceptor del tRNA. Además de las diferencias estructurales del dominio catalítico, los miembros de las dos clases presentan otras idiosincrasias. Por ejemplo, difieren en la forma de interaccionar con el brazo aceptor del tRNA (Figura 1.2c). Las enzimas de clase I se aproximan al brazo aceptor por el surco menor del tRNA de forma que el lazo variable quede expuesto al solvente, mientras que las enzimas de clase II se unen al surco mayor del tRNA de forma que el lazo variable se enfrenta a la sintetasa (Sissler et al, 1997), (Arnez & Moras, 1997). Además, las aaRSs de clase I catalizan la formación del enlace éster entre el aminoácido y el grupo 2' OH de la ribosa de la adenosina terminal (A76) del tRNA, mientras que las enzimas de clase II unen el aminoácido al grupo 3'OH (Fig. 1.2d). Por último, las aaRSs de clase I son en su mayoría monoméricas, mientras que las de clase II son diméricas o tetraméricas (Ibba & Soll, 2000).

Introducción

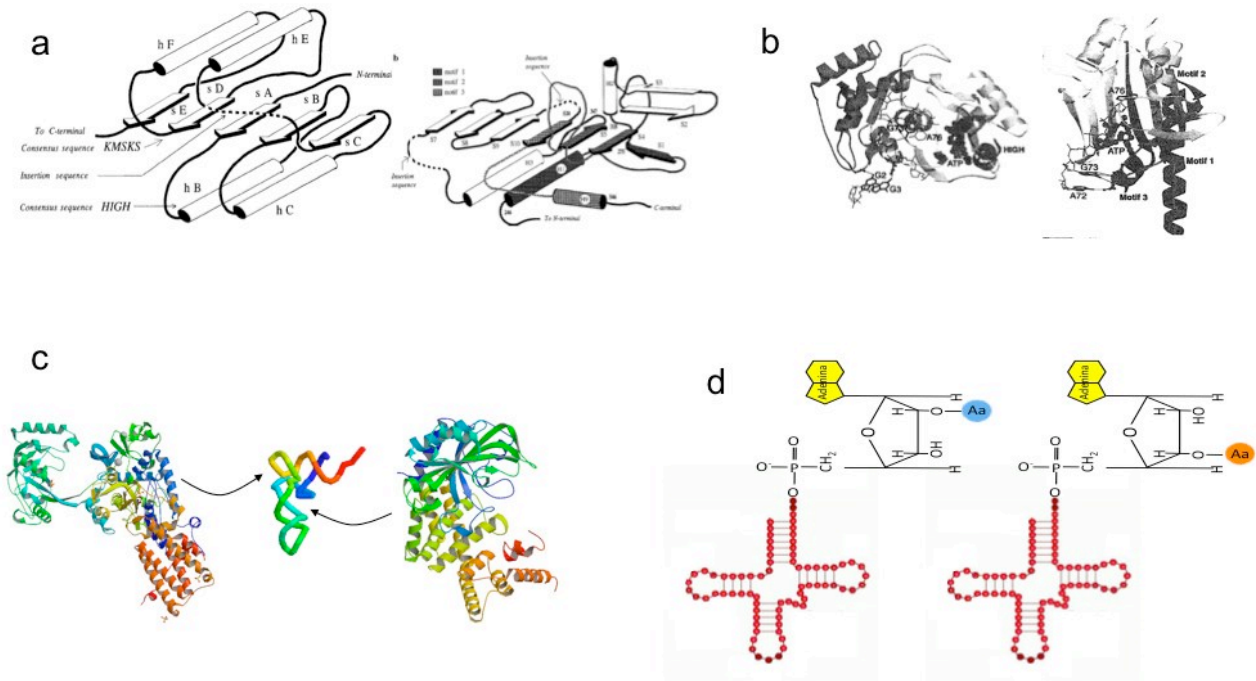


Figura 1.2. Diferencias entre aaRS de las dos clases (A) Representación esquemática de los dominios catalíticos de aaRS de clase I (izquierda) y clase II (derecha). Modificado de Delarue M y Moras D, 1993. (B) Estructura del dominio catalítico de una aaRS de clase I (GlnRS en la parte izquierda del panel) y de una aaRS de clase II (AspRS en la parte derecha del panel). Modificado a partir de Arnez J G y Moras D, 1997). (C) Diferencia en la forma de interaccionar con el tRNA entre las dos clases de aaRS. La aaRS de clase I (en la parte izquierda del panel se muestra una LeuRS con numero de acceso del PDB=1h3n) se aproximan por el surco menor del brazo aceptor del tRNA, mientras que las AaRS de clase II (en la parte derecha del panel se muestra una AlaRS con numero de acceso del PDB=1yfs) lo hacen por el surco mayor. (D) Diferencias entre las aaRS de las dos clases en la formación del enlace éster entre la ribosa de la adenosina terminal del tRNA y el aminoácido. Las aaRS de clase I unen el aminoácido al grupo hidroxilo del carbono 2', mientras que las de clase II lo unen al del carbono 3'

Análisis de secuencias de aaRSs de organismos pertenecientes a los tres grandes dominios de la vida (*Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*) indican que cada clase se subdivide en tres (Tabla 1), por lo que en total se distinguen 6 subclases: Ia, Ib, Ic, IIa, IIb y IIc. Las enzimas de cada subclase se habrían originado de un ancestro común que procede a su vez del progenitor de su clase. Se observa una correlación entre las sintetasas de una misma subclase y las características químicas de sus aminoácidos sustrato. Por ejemplo, los miembros de la subclase Ia reconocen aminoácidos hidrofóbicos como Met y Cys (que contienen azufre) y los alifáticos Leu, Ile y Val. Los miembros de la subclase Ib reconocen aminoácidos cargados como Lys, Glu y su derivado Gln. Las enzimas de clase Ic reconocen aminoácidos aromáticos como Tyr y Trp. Además existe una cierta simetría en el tipo de aminoácido reconocido por las aaRSs de las subclases equivalentes en cada clase. Así por ejemplo los miembros de la subclase IIb reconocen

Introducción

aminoácidos cargados como Lys, Asp y su derivado Asn, similares a los aminoácidos cargados reconocidos por las aaRSs de la subclase Ib. Más claro aún es el caso de las subclases Ic y IIc cuyos miembros reconocen aminoácidos aromáticos (Tyr y Trp para la subclase Ic, Phe para la IIc). (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001)).

Motivo1 : +gφxxφxλPφφ
 Motivo2 : +φφxφλxxfRxExn=4-12+φxxFxxf
 Motivo 3: λxφgφgφgeRφφφφφ

Figura 1.3. Motivos conservados del dominio catalítico de las aaRSs de clase II. φ simboliza cualquier aminoácido hidrofóbico, λ es un aminoácido pequeño, x es cualquier aminoácido y en mayúscula o minúscula aparecen respectivamente los residuos totalmente o parcialmente conservados

Tabla 1.1 División en clases y subclases de las aaRSs.

	<i>Clase I</i>	<i>Clase II</i>
<i>Subclase a</i>	Leu	Ser
	Ile	Thr
	Val	Ala
	Arg	Gly
	Cys	Pro
<i>Subclase b</i>	Met	His
	Glu	Asp
	Gln	Asn
<i>Subclase c</i>	Lys-I	Lys-II
	Tyr	Phe
	Trp	

Introducción

1.1.3 Evolución de las aminoacil-tRNA sintetasas

1.1.3.1 Evolución temprana. El origen del código genético

El primer intento teórico de explicar el origen del código genético fue la “*frozen accident theory*” de Crick según la cual el hecho de que todos los organismos compartan el mismo código no se debe a propiedades intrínsecas del mismo sino que es el resultado de procesos casuales que ocurrieron en LUCA (*Last Universal Common Ancestor*) y que se han mantenido durante la evolución debido a los efectos deletéreos de otros tipo de códigos (Crick, 1968). Hoy día esta teoría resulta insatisfactoria porque se sabe que en bacterias, arqueas y especialmente en los orgánulos de los eucariotas se utilizan variantes del código genético estándar (Yokobori et al, 2001), (Santos et al, 2004). Se ha especulado mucho sobre el origen y la evolución del código genético y existen muchas hipótesis a propósito. Actualmente son tres las más ampliamente aceptadas: (1) la hipótesis estereoquímica que afirma que el actual código genético es el producto de las afinidades físico-químicas entre los aminoácidos y los tripletes de nucleótidos (codón o anticodón), (2) la hipótesis adaptativa, según la cual el código genético se formó bajo presiones selectivas orientadas a minimizar los efectos adversos de mutaciones puntuales y errores de la traducción, y (3) la hipótesis de la co-evolución, que afirma que el código co-evolucionó con las rutas de biosíntesis de los aminoácidos. Estas hipótesis no son del todo incompatibles entre sí ni con la hipótesis del “*frozen accident*”. Koonin y Novozhilov proponen que la evolución del código genético podría explicarse mediante una combinación de la “*frozen accident theory*” y la teoría adaptativa, aunque no excluyen que la co-evolución con las rutas de biosíntesis de aminoácidos y las afinidades entre éstos y los tripletes de nucleótidos puedan haber jugado algún papel (Koonin & Novozhilov, 2009). Existen sin embargo corrientes de pensamiento que enfocan el problema de la evolución del código genético desde otros puntos de vista. Entre ellas hay algunas que atribuyen un importante papel a los tRNAs y las aminoacil-tRNA sintetasas. Wetzel por ejemplo puso de manifiesto que todos los codones XCX corresponden a aminoácidos que interactúan con aaRSs de clase II y que todos los codones XUX (excepto el de la fenilalanina) corresponden a aminoácidos que interaccionan con aaRSs de clase I, interpretando estas relaciones como evidencias de la co-evolución del código genético con las aaRSs (Wetzel, 1978). Sin embargo estas enzimas, que catalizan la aminoacilación de los tRNAs, no podían haber aparecido antes de la invención de la síntesis proteica, por lo que algunos investigadores piensan que

Introducción

podrían haber aparecido en una fase posterior de la evolución del código genético, cuando éste se encontraba en una forma parecida a la que presenta actualmente (Wetzel, 1995). Algunas hipótesis proponen que en el mundo de los RNAs anterior a las proteínas existían dos tipos de moléculas: los riboscripts, que tendrían una función informativa (equivalente a la del mRNA del mundo biológico contemporáneo) y las ribozimas, que tendrían un papel fundamentalmente catalítico. Una idea ampliamente aceptada es que en estadios iniciales de la evolución, la reacción de aminoacilación pudo estar catalizada por ribozimas que podían aminoacilar minihélices de RNA similares al dominio constituido por el brazo aceptor y el brazo T Ψ C del tRNA (Schimmel & Ribas de Pouplana, 1995) o bien por ribozimas con capacidad de auto-aminoacilación. Wetzel plantea la hipótesis de la existencia de moléculas de RNA híbridas llamadas RSA (Ribozyme-Synthetase-Adapter) que habrían estado constituidas por un dominio similar al brazo aceptor del tRNA y otro dominio capaz de unir el aminoácido, activarlo y luego transferirlo al dominio tipo tRNA (Wetzel, 1995). Se han descrito ribozimas con la capacidad de auto-aminoacilarse o trans-aminoacilar tRNAs y que además presentan actividad peptidil-transferasa (Illangasekare & Yarus, 1999), (Lee et al, 2000). Estos descubrimientos apoyan la hipótesis según la cual las primeras cadenas polipeptídicas se sintetizaron en el mundo de los RNAs como consecuencia de la agregación de aminoácidos unidos a ribozimas que favorecerían la formación de enlaces peptídicos entre ellos. Xiao y Yu proponen que las primeras proteínas sintetizadas de esta forma habrían estado implicadas en el mantenimiento de la integridad de la célula y en la protección de sus componentes, y que entre ellas probablemente hubiera proteínas de unión al RNA (Xiao & Yu, 2007). Es probable que inicialmente las aaRSs primitivas se ocupasen únicamente de la activación de los aminoácidos y sólo posteriormente, mediante la adquisición de nuevos dominios, empezaran a interactuar con extremos 3' de minihélices de RNA. Posteriormente, al aumentar la complejidad estructural de los tRNAs mediante la adición de la hélice del anticodón, las aaRSs habrían co-evolucionado mediante la adquisición de nuevos dominios aumentando su especificidad en la interacción con algunos tRNAs y disminuyendo las probabilidades de interacción con otros (Schimmel & Ribas de Pouplana, 1995). Algunos consideran probable que el código genético primordial estuviese compuesto por unos pocos aminoácidos que contactasen directamente con los tripletes de nucleótidos y que posteriormente lo hicieran de forma indirecta a través de las ribozimas. Knight y Landweber proponen que la expansión del código genético, es

Introducción

decir la adición de nuevos aminoácidos, independientemente de que estuviesen ya presentes en la célula o fueran neo-sintetizados, ocurrió sólo después de la aparición de las aaRSs. En un primer momento ello pudo ocurrir por la multiplicación de aaRSs debido a eventos de duplicación génica y a la adquisición de nuevos dominios, mientras que su fase final se atribuye a modificaciones químicas de las bases de los anticodones de los tRNAs (Knight & Landweber, 2000).

1.1.3.2 Evolución reciente de las aaRSs

Como se ha mencionado en el apartado anterior las aaRSs son unas de las proteínas más antiguas y están presentes en todos los organismos. La mayoría de las 20 aaRSs existentes estaba ya presente en LUCA, mucho antes de la separación entre procariotas y eucariotas (Nagel & Doolittle, 1991), (Wolf et al, 1999). Se entiende por “evolución reciente” de las aaRSs, la evolución que tuvo lugar posterior al LUCA. Numerosas evidencias indican que GlnRS, AsnRS y CysRS aparecieron en un momento posterior. Las primeras dos están ausentes en la mayoría de los procariotas, mientras que CysRS no está presente en algunas arqueas. Los organismos que no poseen GlnRS o AsnRS utilizan una ruta de aminoacilación indirecta, considerada más primitiva (Curnow et al, 1997), (Ibba et al, 1997a), lo que ha llevado a postular que las enzimas GlnRS y AsnRS surgieron en un estadio posterior al LUCA, y que en particular GlnRS habría tenido un origen eucariótico, de modo que las bacterias que como *E. coli*, hoy cuentan con una GlnRS, la habrían adquirido por transferencia horizontal.

Según algunos autores también las TyrRS y TrpRS de los eucariotas pudieron haber aparecido en un momento posterior a la separación entre procariotas y eucariotas debido a que son más parecidas entre ellas que a las TyrRS y TrpRS de procariotas (Ribas de Pouplana et al, 1996). Sin embargo un estudio filogenético posterior que incluía también secuencias de aaRSs de arqueas discrepa de esta visión y sugiere un origen monofilético tanto para la TyrRS como para la TrpRS (Brown et al, 1997).

Los miembros de cada clase de aaRS se originaron en una fase muy temprana de la evolución a partir de proteínas ancestrales probablemente constituidas por un sólo dominio del que deriva del dominio catalítico de las enzimas actuales (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2000). Múltiples eventos sucesivos de duplicación de los genes de ambas proteínas primordiales habrían ido generando nuevos genes que habrían

Introducción

divergido por mutación y por la adquisición de nuevos dominios que se habrían ido sumando al dominio catalítico (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2000). Muchos de estos dominios adquiridos están implicados en la interacción con el tRNA (Delarue & Moras, 1993). Todos estos cambios evolutivos habrían modelado el centro activo, que habría evolucionado de un estado de baja especificidad (capaz de reconocer varios aminoácidos) en las proteínas primordiales a la alta especificidad de las aaRSs actuales. Los nuevos dominios habrían aumentado asimismo la superficie de interacción con los tRNAs, aumentando la especificidad por un subconjunto de éstos (Woese et al, 2000), (O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003), (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2001). Las aaRSs actuales son por tanto proteínas modulares con una alta especificidad por sus sustratos (Delarue & Moras, 1993).

La filogenia de las moléculas que forman parte de la maquinaria traduccional refleja en general la evolución darwiniana de los organismos vivos, caracterizada por la herencia vertical de los genes. Los árboles filogenéticos realizados mediante alineamientos múltiples de secuencias de rRNAs, de proteínas ribosómicas o de factores de elongación nos proporcionan un cuadro evolutivo consistente con la denominada “filogenia canónica” (Woese et al, 1990), (Woese et al, 2000). Por ello existe un consenso general en la consideración de estos marcadores como adecuados para estudiar la evolución de las especies. Sin embargo, los análisis filogenéticos de las secuencias de aaRSs arrojan con frecuencia resultados en discrepancia con la filogenia canónica (Woese, 2000). Estas anomalías se deben a la elevada frecuencia de fenómenos que de algún modo interfieren con la herencia vertical de los genes en la historia evolutiva de las aaRSs. Por ejemplo, se han descrito numerosos fenómenos de transferencia horizontal (HGT) de los genes de prácticamente todas las aminoacil-tRNA sintetasas (Brown & Doolittle, 1999), (Doolittle & Handy, 1998), (Wolf et al, 1999), (Woese et al, 2000), (O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003), (Dohm et al, 2006), (Luque et al, 2008), (Fournier et al, 2011). Probablemente, el hecho de que las aaRSs no interaccionen directamente con los otros componentes de la maquinaria traduccional (excepto los tRNAs), que sean proteínas ubicuas indispensables para cualquier organismo y que puedan funcionar potencialmente en una gran variedad de ambientes celulares, las hacen candidatas ideales al intercambio por eventos de transferencia horizontal de genes. Otros fenómenos que interfieren con los análisis filogenéticos son los eventos de duplicación génica, y de pérdida o adquisición de dominios que son también frecuentes entre las

Introducción

aaRSs. Por estos motivos, no es raro que determinados *taxa* posean aaRSs cuya filogenia no corresponde a la de su grupo taxonómico. Woese y colaboradores demostraron por ejemplo que la IleRS de *Spirochetes*, *Chlamydia*, *Mycobacterium* y *Rickettsia* es de tipo arquea y no de tipo bacteriano o que la ValRS de los eucariotas es de tipo bacteriano y distinta a la de arqueas (Woese et al, 2000). Dohm *et al.*, proponen que la LeuRS de algunas arqueas como *Haloarcula marismortui* y *Halobacterium* es bacteriana, sugiriendo una transferencia génica de las bacterias a las arqueas (Dohm et al, 2006). También las aaRSs de las cianobacterias muestran evidencias de eventos de duplicación y transferencia horizontal. Luque *et al.*, proponen que algunas cianobacterias poseen dos subtipos de ThrRS y CysRS, ambas resultados de eventos de duplicación. Además postulan un origen parafilético para algunas aaRSs. Por ejemplo, proponen que algunas cianobacterias formadora de heterocistos poseen una HisRS de tipo eucariota, o que el género *Prochlorococcus* contiene un tipo de ThrRS adquirido de una γ -proteobacteria por transferencia horizontal (Luque et al, 2008), (Zhaxybayeva et al, 2006).

La adquisición de nuevos dominios también ha jugado un papel determinante en la evolución de las AaRS. Los dominios que a lo largo de la evolución se han adicionado al dominio catalítico están implicados fundamentalmente en tres funciones principales: la interacción con el tRNA, funciones de edición (corrección de errores; ver apartado 1.5) o en funciones alternativas distintas a la reacción de aminoacilación (funciones moonlighting; ver apartado 1.6.2) (Delarue & Moras, 1993), (Woese et al, 2000), (Guo et al, 2010b), (O'Donoghue & Luthey-Schulten, 2003) (Luque et al, 2008), (Olmedo-Verd et al, 2011).

1.1.3.3 Genes de aaRS duplicados

En los procariotas los genes se encuentran generalmente en copia única, si bien en algunos genomas se encuentran a veces genes duplicados que pueden ser producto de una duplicación génica o de la adquisición de un gen foráneo por transferencia horizontal. La conservación de ambos genes sugiere que la duplicación podría conferir algún tipo de ventaja selectiva al organismo, bien por el incremento de la dosis génica o porque la adquisición de algún tipo de diferencia funcional entre ambos genes aporta

Introducción

una mayor robustez al organismo en determinadas condiciones (Krakauer & Nowak, 1999). En el caso de las aaRSs, se han descrito algunos casos de genes duplicados, incluyendo algunos que se han estudiado en detalle y de los que se puede deducir el impacto de la duplicación en la fisiología del organismo. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* se han descrito dos genes, *thrS* y *thrZ*, que cifran posibles treonil-tRNA sintetasas y comparten un 50.5% de identidades. Los productos de ambos genes son aparentemente funcionales puesto que complementan un mutante condicional de *E. coli* y catalizan la reacción de aminoacilación del tRNA^{Thr} *in vitro* (Putzer et al, 1990). La expresión de *thrS* es constitutiva mientras la expresión de *thrZ* se detecta solo en un mutante *thrS* o en una estirpe auxótrofa de treonina, por lo que se deduce que el estímulo que induce la expresión de *thrZ* no es la ausencia de ThrRS sino el nivel de tRNA^{Thr} cargado (Putzer et al, 1992). Las secuencias líder del extremo 5' de los mRNAs de *thrS* y *thrZ* contienen respectivamente 1 y 3 terminadores de la transcripción. Ambos genes se regulan por un mecanismo de ribointerruptor (*riboswitch*) en el que el inductor es el tRNA^{Thr}, cuya presencia estimula la formación de una estructura denominada antiterminador. La presencia de dos dominios reguladores adicionales en la zona 5' de *thrZ* explica por qué en condiciones de cultivo estándar su expresión es indetectable (Putzer et al, 1992). Este tipo de regulación con dos genes permite a *Bacillus* modular la actividad treonil tRNA sintetasa de la célula según la disponibilidad de tRNA cargado, induciendo al máximo la expresión de ambos genes cuando la disponibilidad de tRNA cargado es mínima.

También se han descrito dos genes de aspartil tRNA sintetasas (AspRS) en *Thermus thermophilus* y en *Deinococcus radiodurans*. Las dos AspRS, denominadas AspRS1 y AspRS2, presentan divergencias funcionales: AspRS1 es una enzima discriminatoria (AspRS-D) que aspartila únicamente tRNA^{Asp} mientras que AspRS2 es una enzima no discriminatoria (AspRS-ND) que aspartila no sólo tRNA^{Asp} sino también tRNA^{Asn}, produciendo Asp-tRNA^{Asn} que es posteriormente convertido en Asn-tRNA^{Asn} por una transamidasa dependiente de tRNA. AspRS2 participa por tanto en la vía indirecta (ver apartado 1.1.1). En *T. thermophilus* AspRS1 y AspRS2 son respectivamente de tipo bacteriano y de tipo arquea, habiendo sido ésta última adquirida probablemente por transferencia horizontal (Becker & Kern, 1998), (Becker et al, 2000) La existencia de una AspRS-ND no sólo está asociada a la presencia de una ruta alternativa de aminoacilación sino que también está relacionada con la biosíntesis del aminoácido

Introducción

asparagina. *T. thermophilus* y *D. radiodurans* no poseen una asparagina sintetasa, de modo que la única vía de síntesis de este aminoácido es la vía indirecta de aminoacilación del tRNA^{Asn} por la que el aminoácido Asn se sintetiza sobre el soporte del tRNA (Curnow et al, 1998), (Min et al, 2002).

En el genoma de *Streptomyces coelicolor* se encuentran dos genes que cifran triptofanil tRNA sintetisas, denominados *trpS1* y *trpS2*. La expresión de éste último es constitutiva mientras que la de *trpS1* se induce por indolmicina, un análogo del L-triptófano que inhibe TrpRS2 (pero no TrpRS1). La expresión de *trpS1* también se induce por cualquier perturbación de la traducción, provocada por la presencia de inhibidores como la higromicina o la serina hidroxamato o en un mutante *trpS2* (Kitabatake et al, 2002) (Vecchione & Sello, 2008), por lo que parece que el estímulo que induce *trpS1* no es la ausencia de actividad de TrpRS2, sino un estímulo derivado de perturbaciones en la traducción. En este caso, las dos TrpRS muestran diferencias funcionales (diferente susceptibilidad a un inhibidor) y diferentes perfiles de expresión. *Deinococcus radiodurans* posee también dos triptofanil tRNA sintetisas funcionales, denominadas TrpRSI y TrpRSII, que comparten sólo el 29% de identidades. TrpRSII parece estar conectada con la respuesta a estrés puesto que su expresión se induce notablemente tras la exposición a radiación y además se ha observado que interacciona con una sintasa de óxido nítrico (NOS) que es una proteína implicada en funciones de defensa y señalización (Buddha et al, 2004).

E. coli posee dos lisil tRNA sintetisas, LysS y LysU que comparten un 85% de identidad de secuencia. Los genes que las cifran son *lysS* y *lysU*. La expresión *lysS* es constitutiva mientras que la de *lysU*, apenas detectable en condiciones de crecimiento estándar, se induce a 44° C (Clark & Neidhardt, 1990). Un mutante *lysS* no puede sobrevivir a bajas temperaturas por lo tanto *lysS* es indispensable a las bajas temperatura pero innecesario a altas temperaturas, condición en la cual se induce la expresión de *lysU* (Ito et al, 1993). LysU es menos sensible que LysS a la adición de cadaverina, un producto de la decarboxilación de la lisina que compite con ésta para la unión a la sintetasa. Se ha propuesto que en condiciones fisiológicas que favorecen la acumulación de cadaverina la presencia de LysU sea ventajosa para *E. coli* (Brevet et al, 1995). Este sistema compuesto por dos genes de lisil-tRNA sintetasa está conservado en otras enterobacterias como *S. flexneri*, *K. pneumoniae* y *E. aerogens* (Saluta & Hirshfield, 1995).

Introducción

El genoma de *Helicobacter pylori* cifra dos glutamil-tRNA sintetetasas, GluRS1 y GluRS2. Mutantes insercionales de cada una de las proteínas no son viables, lo que pone de manifiesto que ambas enzimas son esenciales y no redundantes. GluRS1 es una enzima discriminatoria (GluRS-D) que sólo aminoacila el único tRNA^{Glu} de *Helicobacter pylori*. GluRS2 es en cambio una enzima no discriminatoria (GluRS-ND) que tiene una escasa afinidad para el tRNA^{Glu} y cuyo principal papel es fabricar Glu-tRNA^{Gln} en la vía indirecta de aminoacilación del tRNA^{Gln} (Skouloubris et al, 2003). Se ha propuesto que GluRS2 sea una enzima que podría representar un estadio intermedio en la evolución hacia una GlnRS (Skouloubris et al, 2003).

También *Acidithiobacillus ferrooxidans* posee dos GluRS. GluRS1 puede aminoacilar tanto los tRNAs^{Glu} y un tRNA^{Gln}_{CUG}. GluRS2 aminoacila únicamente el tRNA^{Gln}_{UUG}. La preferencia de cada enzima por un tRNA u otro sugiere la co-evolución de estas enzimas con sus substratos de tRNA (Salazar et al, 2003).

En algunas cepas de *Streptococcus pneumoniae* se han descrito dos MetRS, cifradas por los genes *metS1* y *metS2*. MetS2 confiere resistencia a una serie de inhibidores sintéticos de MetS (Jarvest et al, 2002). MetS2 es filogenéticamente distante de MetS1 y ha sido probablemente adquirida por transferencia horizontal en respuesta a presiones selectivas como la presencia de antibióticos naturales que inactivan MetS1 (Gentry et al, 2003).

Streptomyces ATCC 700974 contiene dos seril-tRNA sintetetasas, SerRS1 y SerRS2, cifradas respectivamente por los genes *serS1* y *serS2*. SerRS1 presenta un elevado grado de homología con la SerRS de otras especies de *Streptomyces*, mientras que SerRS2 es significativamente divergente de SerRS1 aunque ambas proteínas son funcionales. El gen *serS2* se encuentra en un agrupamiento génico que participa en la síntesis del antibiótico albonmicina que es un inhibidor de la seril-tRNA sintetasa de bacterias. SerRS2 es insensible a la albonmicina y confiere resistencia a ésta cuando se expresa en *E. coli* (Zeng et al, 2009).

También se han descrito eucariotas que contienen aaRSs redundantes. *Sacharomyces cerevisiae* contiene dos GlyRSs citoplásmicas una de las cuales funciona como enzima de mantenimiento (*housekeeping*) mientras que la otra es una enzima inducible que funciona en condiciones de estrés térmico u oxidativo (Chen et al, 2012). *Homo sapiens*

Introducción

tiene dos ThrRS citoplásmicas de diferente longitud que aún no han sido caracterizadas en profundidad (Zhou et al, 2013).

Como se observa, aunque la presencia de genes duplicados de aaRSs no es un fenómeno general, cuando ocurre suele ir asociado a diferencias funcionales entre las enzimas que parecen acrecentar la capacidad adaptativa de la célula, proporcionándole rutas metabólicas alternativas, resistencia a algunos inhibidores o a temperaturas elevadas.

1.1.4. Corrección de errores

El desciframiento del mensaje genético en la célula exige que cada uno de los pasos que intervienen en él se realice con una elevada precisión, de modo que la secuencia de las proteínas sea fiel a la secuencia cifrada en sus correspondientes genes. Se ha estimado que una célula puede tolerar un máximo de un error por cada 10^4 aminoácidos incorporados sin que ello afecte sustancialmente a su supervivencia (Loftfield & Vanderjagt, 1972), (Ling et al, 2009). Por ello, es necesario que la frecuencia de errores acumulada en todos los pasos de la expresión génica se mantenga por debajo de este umbral. En ello es fundamental el papel de las aaRSs, que tienen que asegurar la correcta correspondencia entre un tRNA y el aminoácido cifrado en su anticodón. El reconocimiento de los tRNAs por parte de las aaRSs se realiza con un alto grado de precisión gracias al elevado número de interacciones y a la amplia superficie de contacto entre ambas moléculas. En cambio, los aminoácidos sólo pueden distinguirse entre ellos por su tamaño y por algunas propiedades fisicoquímicas como la carga o la hidrofobicidad. Además, las aaRSs deben discriminar su aminoácido sustrato de otros intermediarios celulares de naturaleza química parecida como los D-aminoácidos, los precursores de la síntesis de aminoácidos o los productos intermedios de su degradación. El sitio activo de cada aaRS ha sido modelado en la evolución de modo que en todos los casos el aminoácido sustrato es reconocido con mayor afinidad que cualquier otra molécula. No obstante, algunas aaRSs pueden reconocer por error aminoácidos distintos a su sustrato, que pueden llegar a ser activados en el sitio catalítico e incluso transferidos al brazo aceptor del tRNA, produciendo un tRNA cargado con un aminoácido que no corresponde a su anticodón (Ling et al, 2009). La incorporación de estos tRNAs incorrectamente acilados a la síntesis proteica en el ribosoma introduciría un aminoácido erróneo en la cadena peptídica naciente. Para evitar que la producción de tRNAs incorrectamente acilados supere el umbral de

Introducción

tolerancia celular, la evolución ha seleccionado algunas aaRSs con la capacidad de editar o corregir errores (Figura 1.4). La capacidad de edición aparece en aaRSs de clase I y de clase II. El mecanismo molecular subyacente a la corrección de errores no es único y en algunos casos es bastante controvertido. Existen casos en los que el error se corrige en el sitio activo, antes de que el aminoácido activado se transfiera al tRNA, a lo que se llama “edición *pre-transfer*”, que consiste en la hidrólisis del aminoacil-adenilato, liberando el aminoácido y AMP. Cuando la corrección ocurre tras la transferencia del aminoácido al extremo 3' del tRNA se llama “edición *post-transfer*” (Ling et al, 2009).

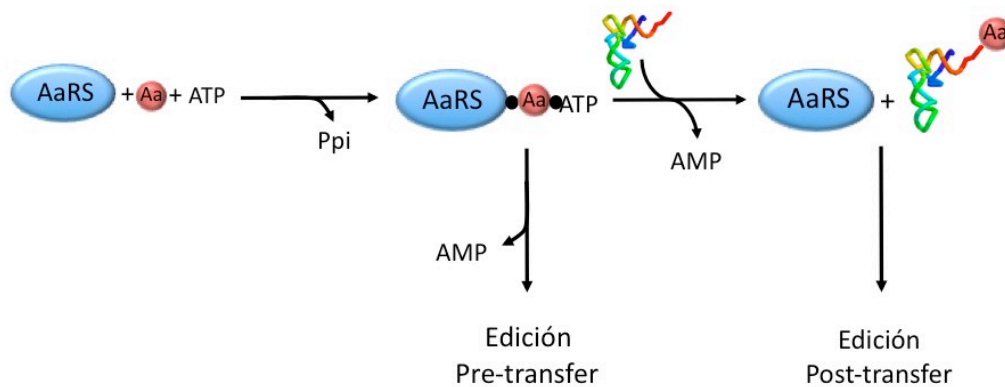


Figura 1.4. Corrección de errores en las aminoacil-tRNA sintetasas.

Algunas aaRSs realizan ambos tipos de edición. La velocidad a la que ocurre la transferencia del aminoácido al tRNA durante la catálisis determina en qué proporción los errores se corrigen por edición *pre-transfer* o *post-transfer*, esto es, si la tasa de transferencia al tRNA es rápida, los errores se corregirán en su mayor parte mediante edición *post-transfer* (Minajigi & Francklyn, 2010), (Dulic et al, 2010). La edición *pre-transfer* parece ocurrir en el sitio catalítico (Boniecki et al, 2008), (Dulic et al, 2010), mientras que la edición *post-transfer* generalmente ocurre en un sitio distinto al sitio activo denominado *sitio de edición*, que se encuentra en un dominio distinto al dominio catalítico conocido como *dominio de edición*. La distancia entre el sitio catalítico y el sitio de edición puede llegar a ser de 35-40 Å (Silvian et al, 1999), (Dock-Bregeon et al, 2004). Lo que implica que el brazo aceptor del tRNA debe translocarse desde el sitio catalítico hasta el sitio de edición, un fenómeno que se denomina *translocación unimolecular de sustrato*, similar al que utilizan las DNA polimerasas para la corrección de errores en la replicación (Francklyn, 2008), (Palencia et al, 2012), (Dock-Bregeon et al, 2004). En algunos casos, la edición de errores la realizan *en trans* proteínas independientes que generalmente son homólogas a los dominios de edición (Ahel et al,

Introducción

2003), (An & Musier-Forsyth, 2004), (Dwivedi et al, 2005), (Korencic et al, 2004). Las aaRSs de clase II tienen la capacidad de rescatar tRNAs tras su liberación y corregir errores mediante edición *post-transfer* (Roy et al, 2005). En el caso de la edición *post-transfer*, el sitio de edición debe ser capaz de discriminar entre el extremo aceptor acilado con un aminoácido erróneo, que no corresponde al tRNA, del extremo acilado con el aminoácido correcto. En algunos casos el mecanismo de discriminación se basa en las dimensiones de los aminoácidos (Mursinna & Martinis, 2002), (Wong et al, 2002), (Palencia et al, 2012), (Dock-Bregeon et al, 2004). Por ejemplo, el sitio de edición de la IleRS permite la entrada de la valina, mientras que la isoleucina, de mayor tamaño, no encaja en este sitio (Nureki et al, 1998). Alternativamente, la discriminación de los sustratos de edición puede realizarse mediante interacciones específicas. Por ejemplo, la PheRS carga el tRNA^{Phe} con tirosina con una cierta frecuencia. El sitio de edición de PheRS contiene residuos ácidos que forman puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de L-Tyr, lo que discrimina el aminoácido correcto, L-Phe, que carece del grupo OH. La sustitución de estos residuos ácidos por Ile o Ala permite el reconocimiento de L-Phe en el sitio de edición y determina la hidrólisis de Phe-tRNA^{Phe} (Sasaki et al, 2006).

Además de la corrección de errores realizada por las AaRS, existen otros mecanismos de control que garantizan la fidelidad de la traducción (Reynolds et al, 2010), (Zaher & Green, 2009b), (Zaher & Green, 2009a). Se ha descrito por ejemplo que el factor de elongación EF-Tu de procariontes une débilmente tRNAs descargados y tRNAs incorrectamente acilados como Asp-tRNA^{Asn} y Glu-tRNA^{Gln}, que ocurren naturalmente en aquellos organismos que carecen de GlnRS y AsnRS, y aa-tRNAs que son sustratos de otros factores de traducción como Sec-tRNA^{Sec} y fMet-tRNA^{fMet} (Becker & Kern, 1998), (Brock et al, 1998), (Rudinger et al, 1996), (Stanzel et al, 1994).

1.1.5 Funciones de las aaRSs

El papel principal de las aaRS deriva de su actividad catalítica, su función es sintetizar aminoacil-tRNAs para suministrar sustratos a la síntesis de proteínas en el ribosoma. Podemos encuadrar por tanto la función de las aaRSs en la parcela del metabolismo dedicada a la traducción del mensaje genético y la síntesis de proteínas. No obstante, la función de las aaRSs puede ser más amplia debido a que por un lado los aminoacil-

Introducción

tRNAs participan en funciones no relacionadas con la síntesis proteica (apartado 1.1.5.1) y a que algunas aaRSs pueden realizar funciones alternativas para las que no se requiere de su actividad catalítica (apartado 1.1.5.2). A éstas últimas se les llama funciones *moonlight* y a las aaRSs que las llevan a cabo se les conoce igualmente como proteínas *moonlight* o de función múltiple.

1.1.5.1 Funciones de los aminoacil-tRNAs no relacionadas con la síntesis de proteínas

Algunos aminoacil-tRNAs participan en funciones no relacionadas con la traducción como la biosíntesis de aminoácidos o de tetrapirroles, la modificación de fosfolípidos de la membrana plasmática de bacterias, la transferencia de L-aminoácidos a la pared celular bacteriana, el marcaje de proteínas para su degradación o la síntesis no ribosómica de péptidos (Fig. 1.5). En todos estos procesos, el aminoacil-tRNA actúa como donador del aminoácido, que se encuentra unido al tRNA por un enlace de alta energía.

En los tres dominios de la vida encontramos aaRSs que participan en la denominada la síntesis indirecta de determinados aminoácidos. (Curnow et al, 1996), (Ibba et al, 1997a). En algunos procariontes, la única vía de síntesis de asparragina es la vía indirecta, en la que el aminoácido se sintetiza sobre el soporte del tRNA, cuyo primer paso lo cataliza la AspRS (Min et al, 2002), (Luque et al, 2008).

En las arqueas metanogénicas la cisteína se sintetiza sobre el tRNA^{Cys} mediante la formación de un compuesto intermedio, el O-fosfoseril-tRNA^{Cys} (Sep-tRNA^{Cys}) catalizada por una aaRS no canónica, SepRS. La O-fosfoserina (Sep) es posteriormente transformada en cisteína gracias a la acción de una sintetasa de Cys-tRNA^{Cys} dependiente de Sep-tRNA^{Cys} (SepCysS), en presencia de un donador de un grupo sulfuro (Sauerwald et al, 2005).

De forma similar, la síntesis de seleniocisteína (Sec) ocurre exclusivamente de forma tRNA-dependiente. En arqueas y eucariotas este proceso implica la síntesis de Ser-tRNA^{Sec} por una SerRS. La transformación de la serina cargada en seleniocisteína ocurre por la acción sucesiva de una quinasa de serina/treonina (PSTK) que la transforma en Sep, y una seleniocisteína sintasa dependiente de Sep-tRNA^{Sec} (SepSecS) (Yuan et al, 2006). Las bacterias en cambio, poseen una seleniocisteína sintasa que convierte directamente Ser-tRNA^{Sec} en Sec-tRNA^{Sec} (Forchhammer et al, 1991).

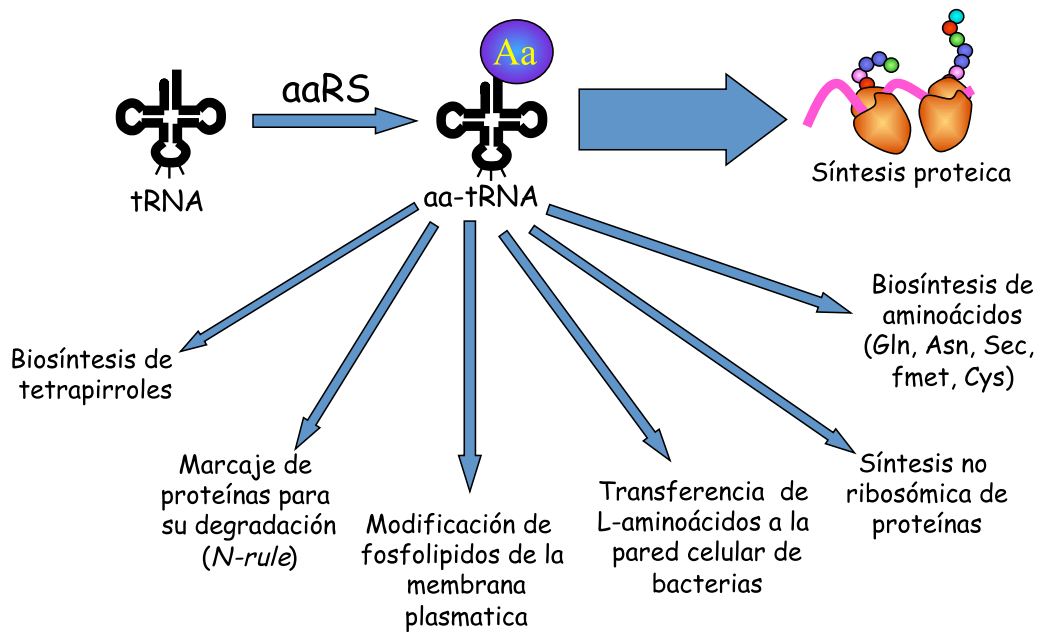


Figura 1.5 Funciones de los aminoacil-tRNAs.

Los aminoacil-tRNAs están además implicados en procesos relacionados con la síntesis de la pared celular de bacterias como donadores de L-aminoácidos para la formación de los puentes peptídicos que unen las unidades de ácido N-acetilmurámico en la síntesis de las capas de peptidoglicano de la pared (Barreteau et al, 2008); (Fonvielle et al, 2009). Por otro lado, los aminoacil-tRNAs proporcionan los aminoácidos (L-Lys) que la aminoacil-fosfatidil glicerol sintasa (aa-PGs) une a las moléculas de fosfatidil-glicerol de membrana para neutralizar sus cargas negativas y disminuir su permeabilidad a moléculas cargadas como los péptidos antibacterianos o los antibióticos catiónicos (Roy & Ibba, 2008), (Klein et al, 2009). En plantas, algas y algunas bacterias, la síntesis de tetrapirroles (hemo, clorofila, bilinas o vitamina B₁₂) comienza con la formación de Glu-tRNA^{Glu} catalizada por la GluRS. Posteriormente una reductasa de Glu-tRNA^{Glu} (GluTR) reduce el glutamato a glutamato 1-semialdehído (GSA) que es convertido en ácido δ-amino levulínico (ALA) mediante transamidación catalizada por la GSA amino mutasa (Schon et al, 1986). Otra de las funciones no canónicas de los aminoacil-tRNAs es su participación en la síntesis no ribosómica de proteínas (NRPS). En algunos microorganismos están implicados en la ruta de biosíntesis de ciclodipéptidos (CDP) que son metabolitos secundarios con actividades biológicas muy diversas, que pueden

Introducción

funcionar como agentes antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, etc. (Belin et al, 2012). La síntesis de ciclodipéptidos la catalizan ciclodipéptidos sintasa (CDPS) que secuestran los aa-tRNAs y los utilizan para formar los enlaces peptídicos de los CDPs (Belin et al, 2012).

Además de su implicación en múltiples procesos biosintéticos, los aminoacil-tRNAs participan también en el marcaje de proteínas para su degradación que es lo que se conoce como “ruta de la regla N” o “*N-end rule pathway*”. En esta ruta, el primer paso consiste en la transferencia de un aminoácido desde un aminoacil-tRNA al extremo N terminal de una proteína, lo que la convierte en sustrato para la degradación mediada por poliubiquitinación en eucariotas o por proteasas Clp en procariotas (Tasaki et al, 2012), (Sriram et al, 2011), (Mogk et al, 2007).

1.1.5.2 Funciones moonlight

Las funciones *moonlight* alternativas de las aaRSs son muy diversas y abarcan el control de la transcripción y de la traducción, la maduración de intrones, el control del ciclo celular y la transducción de señales (Lee et al, 2004), (Park et al, 2005). En figura 1.6 se presenta un resumen esquemático de estas funciones.

1.1.5.2.1 Control de la transcripción

Las aaRSs pueden controlar directamente o indirectamente la expresión génica en procariotas y en eucariotas. Por ejemplo en *E. coli* la AlaRS se une a una secuencia palindrómica que flanquea el sitio de inicio de la transcripción de su propio gen reprimiendo su expresión. La capacidad de unión al DNA de la enzima se ve favorecida por el aumento de la concentración de alanina (Putney et al, 1981). En los mastocitos, la LysRS está implicada en la ruta de señalización de MAPK, que se desencadena en respuesta a la producción de inmunoglobulina E (IgE) (Furuno et al, 2001). La LysRS se encuentra normalmente en el citoplasma asociada al complejo multisintetasa (MSC) formado por 9 aaRSs y tres proteínas accesorias. La fosforilación de la serina 207 de LysRS por MAPK en respuesta a IgE determina su liberación de MSC y un aumento de la producción de diadenosin-tetrafosfato (Ap_4A), una molécula de tipo alarmona cuya concentración aumenta tras la exposición a varios tipos de estrés (Varshavsky, 1983). Después de su liberación del MSC, LysRS se transloca al núcleo donde se une al factor

Introducción

de transcripción MITF y actúa como co-activador de la transcripción de los genes regulados por MITF (Yannay-Cohen et al, 2009).

1.1.5.2.2 Maduración de intrones

Las aminoacil-tRNA sintetetas de clase I TyrRS y LeuRS participan en la maduración de intrones en la mitocondria de hongos mediante la interacción con estructuras tipo tRNA que están conservadas en los intrones de clase I (Mohr et al, 2001). En *Neurospora crassa* la TyrRS mitocondrial (mt-TyrRS) codificada por el gen nuclear *cyt-18* funciona como factor de procesamiento de intrones de tipo I como los del rRNA mitocondrial o los de los 6 genes de la ATP sintasa (Lambowitz & Perlman, 1990). La actividad de procesamiento de mt-TyrRS de *Neurospora crassa* depende de una pequeña inserción N terminal que no tiene homólogos en bacterias ni en las otras mt-TyrRS de levaduras (Cherniack et al, 1990), (Paukstelis et al, 2005). Esta inserción proporciona una nueva superficie de interacción con el mRNA, diferente a la que interactúa con el tRNA (Paukstelis et al, 2008). También la leucil tRNA sintetasa mitocondrial (mt-LeuRS) de *Saccharomyces douglasii* participa en la maduración de pre-mRNAs (Herbert et al, 1988). Se ha descrito que mt-LeuRS une los intrones *cob-14* y *cox1-14α* simultáneamente a una madurasa cifrada por el mismo *cob-1* para facilitar la activación del proceso de maduración (Rho & Martinis, 2000). Al contrario que la mt-TyrRS de *Neurospora*, la mt-LeuRS no necesita ningún dominio adicional para interactuar con los mRNA y se ha propuesto que su actividad de maduración de intrones está asociada al dominio CP1, que es necesario también para la corrección de errores (Rho et al, 2002).

1.1.5.2.3 Control de la traducción

Entre las funciones *moonlighting* de las aaRSs está el control de la traducción. La treonil tRNA sintetasa (ThrRS) de *E. coli* controla su propia expresión inhibiendo la traducción de su mRNA. Cuando la concentración de tRNA^{Thr} libre es baja, ThrRS se une a la zona líder (5'-UTR) de su propio mRNA que adopta una estructura que mimetiza el lazo del anticodón del tRNA^{Thr}, impidiendo la unión de la subunidad 30S del ribosoma y la traducción del mRNA. La unión del tRNA^{Thr} a la ThrRS impide la unión de ésta al operador (Torres-Larios et al, 2002), (Romby & Springer, 2003). Esta función de la ThrRS de *E. coli* se describe con más detalle en el apartado 1.1.6.3.2.

Introducción

La glutamil-prolil tRNA sintetasa (Glu-ProRS) de metazoos es una única cadena polipeptídica que reúne dos aaRSs distintas: la GluRS y la ProRS. Los dominios de ambas enzimas se encuentran unidos por un número variable de dominios hélice-giro-hélice de unos 50 aminoácidos, llamados dominios WHEP. Estos dominios además de estar presentes en Glu-ProRS, están conservados también en otras aaRSs eucarióticas como TrpRS, HisRS, GlyRS y MetRS (Cahuzac et al, 2000), (Guo et al, 2010b). La eliminación de los dominios WHEP no afecta a la capacidad de aminoacilación de estas enzimas, lo que sugiere su implicación en funciones no canónicas (Cahuzac et al, 2000). La Glu-ProRS de humanos pertenece al complejo multiproteico de inhibición de la traducción GAIT que se activa en respuesta a interferón γ (Ray & Fox, 2007). El complejo silencia la expresión génica uniéndose, mediante los dominios WHEP de Glu-ProRS, a los denominados “elementos GAIT” de la región 3’ UTR de los mRNAs diana (Arif et al, 2009). Recientemente se ha descrito que también la LeuRS está implicada en la regulación de la traducción en eucariotas mediante la interacción con el complejo TORC1 (*Target of Rapamycin Complex 1*) (Han et al, 2012), (Bonfils et al, 2012). TORC1 promueve el crecimiento celular regulando la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas y la absorción de nutrientes en respuesta a varios estímulos como factores de crecimiento y aminoácidos (Kim & Guan, 2011) y además regula negativamente la autofagia (Bhaskar & Hay, 2007). Parece que tanto en levaduras como en humanos LeuRS funciona como un sensor de la concentración de leucina y otros aminoácidos y transmite esta señal al complejo TORC1, aunque los mecanismos de acción difieren ligeramente entre estos organismos (Han et al, 2012), (Bonfils et al, 2012).

1.1.5.2.4 Citoquinas

En células humanas, en condiciones de apoptosis, la TyrRS humana es secretada al exterior celular donde una proteasa extracelular la digiere en dos fragmentos: un fragmento C terminal, exclusivo de las enzimas de mamíferos, y otro fragmento N terminal que contiene el sitio activo y que se denomina mini-TyrRS (Wakasugi & Schimmel, 1999). El fragmento C terminal presenta un 51% de identidad de secuencia con la proteína EMAP-II (*endothelial monocyte-activating polypeptide-II*) que funciona como una citoquina pro-inflamatoria (Kao et al, 1992). Se ha comprobado que el fragmento C terminal de TyrRS humana induce respuestas similares a las que provoca

Introducción

EMAP-II (Wakasugi & Schimmel, 1999). Además se ha demostrado que mini-TyrRS induce la vascularización de los tejidos o angiogénesis (Wakasugi et al, 2002a). Por el contrario, una versión truncada de la TrpRS de mamíferos, llamada mini-TrpRS, regula negativamente la angiogénesis (Wakasugi et al, 2002b). Mini-TrpRS actúa extracelularmente y se produce por maduración alternativa de su mRNA (*alternative splicing*) en humanos o por digestión por una proteasa extracelular en bovinos en respuesta a $\text{INF-}\gamma$, y carece de la mayor parte del dominio N terminal. Se ha comprobado que inhibe la angiogénesis inducida por VEGF (*vascular endothelial growth factor*) en embriones de pollo y en ratones (Wakasugi et al, 2002b), (Otani et al, 2002) y que esta actividad es debida a una inserción de 8 aminoácidos presente en el dominio de unión al anticodón (Kise et al, 2004).

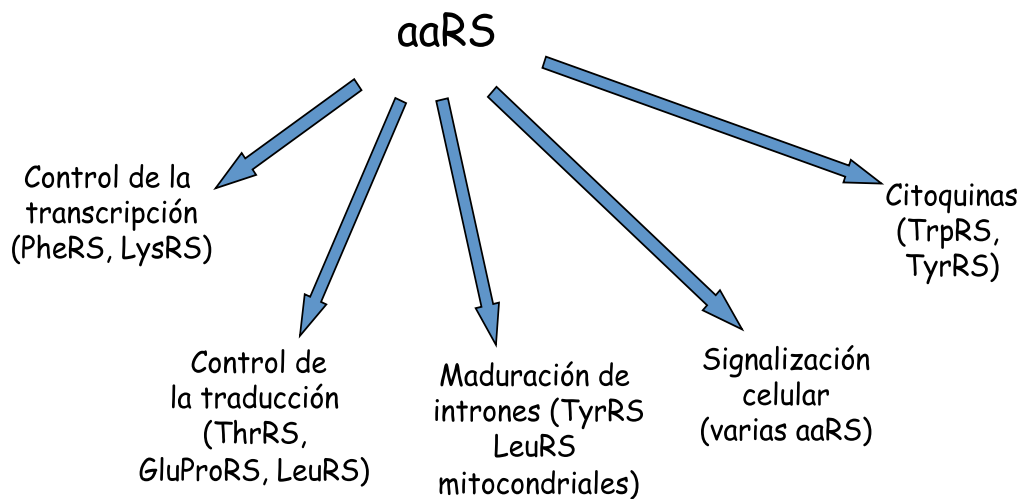


Figura 1.6 Funciones *moonlight* de las aminoacil.tRNA sintetetas.

Introducción

1.1.6 La treonil tRNA sintetasa

1.1.6.1 Composición de dominios y estructura

La treonil tRNA sintetasa (ThrRS) es una aminoacil-tRNA sintetasa de clase II que pertenece a la subclase IIa. Hasta la fecha se han resuelto las estructuras cristalinas de ThrRSs (aislada o acomplejada con diferentes substratos) de dos bacterias, *E. coli* y *Staphylococcus aureus* y una arquea, *Aeropyrum pernix* (Sankaranarayanan et al, 1999), (Torres-Larios et al, 2003), (Shimizu et al, 2009), así como la estructura de la ThrRS mitocondrial de *Sacharomyces cerevisiae* (Ling et al, 2012). La ThrRS es un homodímero (Hennecke et al, 1977), (Zheltonosova et al, 1994), (Sankaranarayanan et al, 1999), (Ling et al, 2012). En el caso de la ThrRS de *E. coli*, la superficie de dimerización representa el 6.2% de la superficie total de cada monómero y se encuentra en el dominio catalítico de cada subunidad (Sankaranarayanan et al, 1999). La estructura de cada subunidad está compuesta por un dominio N terminal, que se divide en los subdominios N1 y N2, una hélice conectora, un dominio catalítico que acomoda el sitio activo y un dominio C terminal responsable de la unión al anticodón del tRNA (Figura 1.7).

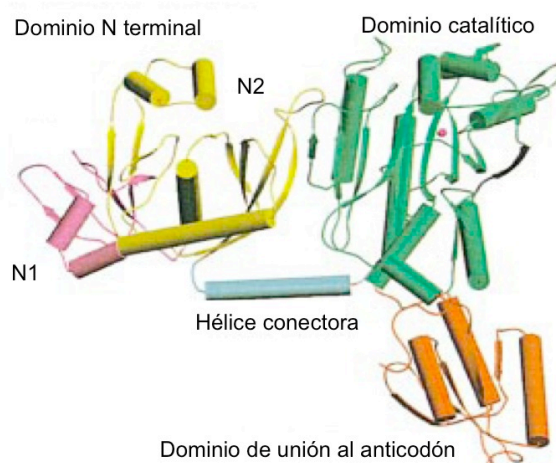


Figura 1.7 Estructura de un monómero de ThrRS de *E. coli* (adaptado de Sankaranarayanan et al., 1999).

A diferencia de lo que ocurre con otras aaRSs diméricas como la AspRS, donde cada subunidad interacciona con su tRNA, en el complejo ThrRS-(tRNA^{Thr})₂ tienen lugar

Introducción

numerosas interacciones cruzadas. (Fig. 1.8A) La zona de interacción del tRNA representa el 20.1% de su superficie, de la que el 16.5% contacta con una subunidad de ThrRS y el resto con la otra. Esto probablemente contribuye a que la afinidad de la ThrRS por sus tRNAs ($\sim 10^{-8}$ M) sea muy elevada en comparación a la de otras aaRSs (Romby et al, 1996). Las interacciones cruzadas son inespecíficas de la secuencia del tRNA.

Otro aspecto peculiar del reconocimiento del tRNA^{Thr} por parte de la ThrRS es que se establecen contactos por ambos lados del brazo aceptor (Fig. 1.8B). El dominio catalítico interactúa con el surco mayor del brazo aceptor del tRNA como corresponde a una aaRS de clase II, pero también el dominio N2 contacta el surco menor del brazo aceptor, por lo que éste queda atrapado en una pinza formada por el dominio catalítico y el dominio N2 (Sankaranarayanan et al, 1999), lo que resulta de gran importancia para la translocación del extremo aceptor que tiene lugar durante la edición (ver abajo). La importancia del dominio N2 en el reconocimiento del tRNA se refleja en que aunque un mutante Δ N1-N2 sea capaz de complementar un mutante condicional de *E. coli*, su K_m para el tRNA^{Thr} aumenta 40 veces y su constante catalítica decrece 20 veces respecto a la proteína silvestre (Sankaranarayanan et al, 1999), (Caillet et al, 2003). El dominio catalítico, está formado por una lámina de hojas β antiparalelas rodeada de α hélices y contiene los tres motivos característicos de las aaRSs de clase II y el sitio activo, responsable del reconocimiento de la treonina y el ATP, de la síntesis del intermediario treonil-AMP, de la transferencia del aminoácido activado al brazo aceptor del tRNA^{Thr}, y de la discriminación del aminoácido isostérico valina.

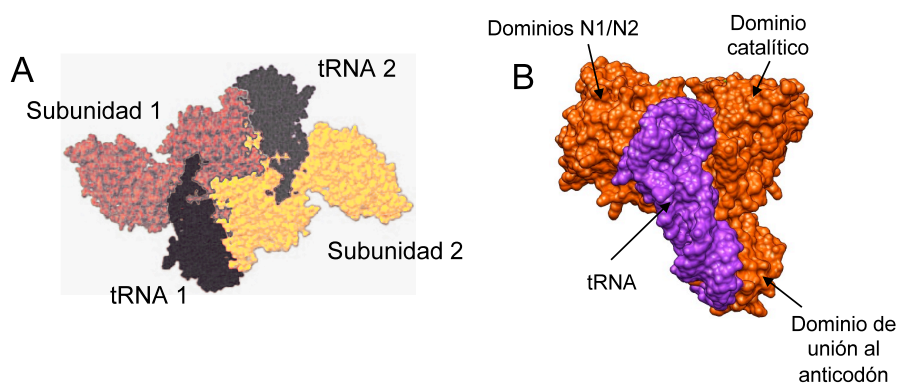


Figura 1.8 Interacciones entre tRNAy ThrRS

Introducción

El sitio activo de ThrRS contiene un átomo de zinc que juega un papel fundamental en su función. Mutantes de ThrRS alterados en la coordinación del zinc no pueden complementar una estirpe mutante condicional de *E. coli* defectiva en ThrRS (Sankaranarayanan et al, 1999). La presencia de un átomo de zinc en el monómero de ThrRS fue descrita por primera vez por Nureki y col. que demostraron que la eliminación del zinc causaba una severa disminución de la actividad de aminoacilación *in vitro* (Nureki et al, 1993). La resolución posterior de la estructura cristalina de la ThrRS de *Escherichia coli* puso de manifiesto que el átomo de zinc se encuentra en el centro activo de la proteína (Sankaranarayanan et al, 1999). En ausencia de treonina, el zinc se encuentra en un estado de coordinación tetraédrica coordinado con los residuos C334, H385 del motivo 2 y H511 del motivo 3 y con una molécula de H₂O (Figura 1.9). Cuando la treonina entra en el sitio activo desplaza la molécula de H₂O y sus grupos α -amino y β -hidroxilo establecen enlaces de coordinación con el metal, lo que determina un cambio en la geometría de coordinación, que pasa de ser tetraédrica a pentaédrica (piramidal de base cuadrada) (Figura 1.9) (Sankaranarayanan et al, 2000). El zinc juega por tanto un papel esencial en el reconocimiento del sustrato y permite además la discriminación del aminoácido isostérico L-Val, cuyo grupo metilo de la cadena lateral no puede coordinar el metal (Figura 1.10) (Sankaranarayanan et al, 2000), (Musier-Forsyth & Beuning, 2000). En cambio la L-Ser, gracias a su tamaño, menor que el de L-Thr y al grupo hidroxilo de su cadena lateral, puede acceder al sitio activo de la ThrRS, coordinándose al cofactor metálico de forma similar a la L-Thr. Aunque la ThrRS establece enlaces específicos con la L-Thr que hacen que su afinidad por este aminoácido sea la más alta (Sankaranarayanan et al, 1999), (Sankaranarayanan et al, 2000), puede activar L-Ser y producir Ser-tRNA^{Thr} con una cierta frecuencia. La ThrRS dispone de mecanismos de edición pre- y post-transfer. La contribución relativa de cada uno depende de la velocidad de transferencia del aminoácido al extremo aceptor del tRNA, que en el caso de esta enzima es relativamente rápido, lo que da un papel preponderante a la edición post-transfer (Minajigi & Francklyn, 2010). La edición post-transfer se ejecuta en un sitio de edición localizado en el dominio N2. La distancia entre el sitio de edición y el sitio activo es de 39 Å (Dock-Bregeon et al, 2000), (Dock-Bregeon et al, 2004). Una vez acilado, el tRNA permanece unido a la enzima mientras el extremo aceptor se libera del sitio activo y rota hacia el sitio de edición, cuya estrecha geometría no admite la entrada del extremo del tRNA cargado con Thr, pero sí del que esté cargado con Ser (de menor tamaño al tener un grupo metilo menos en la cadena

Introducción

lateral) cuyo enlace éste se hidroliza. Por tanto, en el caso de la ThrRS, el sitio de edición discrimina el aminoácido adecuado (Thr) del no adecuado (Ser) por un mecanismo de exclusión estérica (Dock-Bregeon et al, 2000), (Dock-Bregeon et al, 2004).

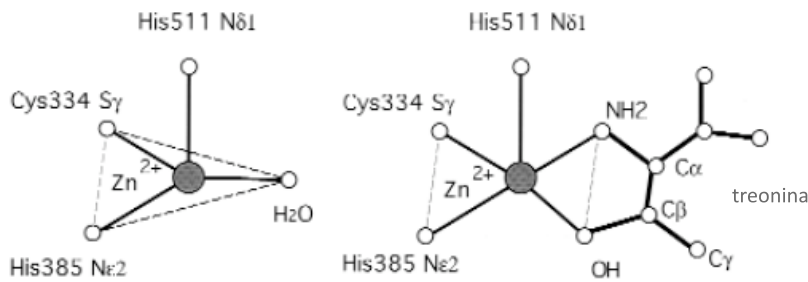


Figura 1.9 Representación esquemática de la geometría de coordinación del átomo de zinc antes y después de la unión del aminoácido. Modificado a partir de Sankaranarayanan et al., 2000.

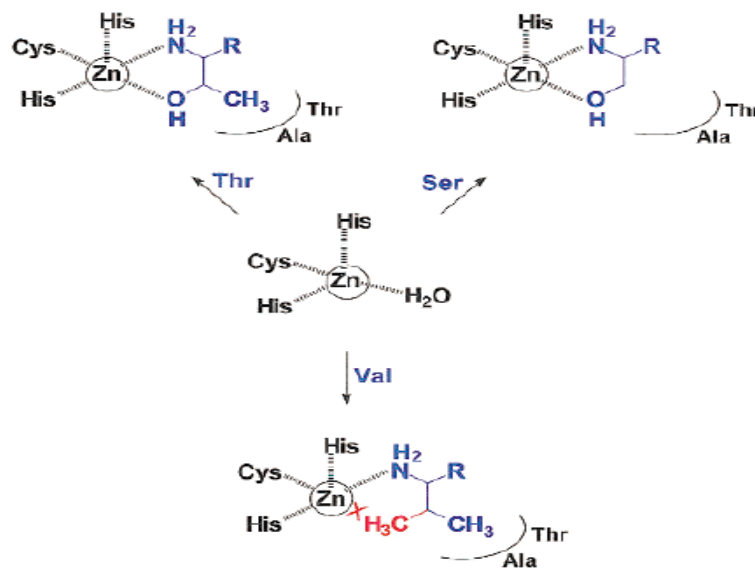


Figura 1.10 Discriminación de la valina en el sitio activo. El átomo de zinc interacciona con los grupos NH_2 y OH de treonina y serina pero no con el grupo CH_3 de la valina. Modificado a partir de Musier-Forsyth K y Beuning P J, 200

La pérdida del cofactor metálico afecta drásticamente a la actividad catalítica, pero no a la actividad reguladora de la traducción de la ThrRS de *E. coli*. Así, la sobreexpresión

Introducción

de genes *thrS* mutados en los residuos de coordinación del zinc produce un fenotipo letal dominante en una estirpe silvestre de *E. coli*, es decir, inhibe el crecimiento incluso en presencia de copias silvestres de *thrS*. Este efecto se debe a que las copias mutantes de ThrRS, inactivas desde el punto de vista catalítico, mantienen casi intacta su capacidad represora de la traducción de su propio mRNA, de manera que impiden la síntesis de copias de ThrRS funcionales (Caillet et al, 2007).

El dominio C terminal de ThrRS contacta con el surco mayor del brazo del anticodón interaccionando con las bases que ocupan la 2^a y 3^a posición, respectivamente G35 y G36 que han sido identificadas como determinantes de identidad del tRNA^{Thr} (Hasegawa et al, 1992), (Nameki et al, 1996). En el complejo, estas bases se encuentran sobre una plataforma hidrofóbica formada por residuos altamente conservados. La primera base del anticodón también interacciona con el dominio C terminal formando puentes de hidrógeno con N575. Sin embargo, esto no contribuye a la eficiencia de la aminoacilación puesto que los parámetros catalíticos de los tres isoaceptores del tRNA^{Thr} de *E. coli* (C, U o G en posición 34) son casi idénticos. Los mutantes N575A pueden complementar un mutante condicional de *thrS* y se ven sólo levemente afectados en su K_m (Caillet et al, 2003). En la posición 37 del lazo del anticodón se encuentra la base mt⁶A, una adenina modificada por un residuo de treonina que interacciona con las R583 y R589 de la enzima (Figura 1.11).

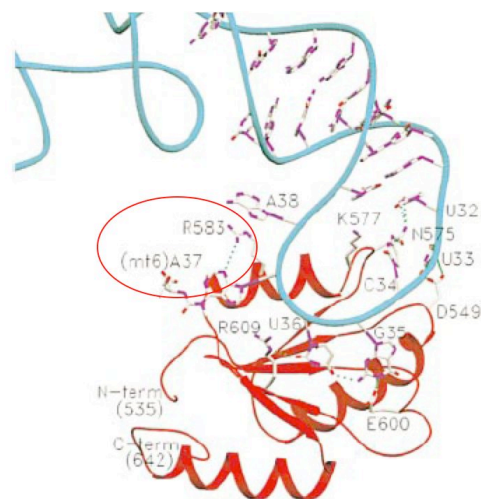


Figura 1.11 Interacción entre el tRNA^{Thr} y el dominio de unión al anticodón de ThrRS. La base modificada (mt6)A37 del tRNA^{Thr} interacciona con los residuos R583 y R589 (no visible en la figura) del dominio C terminal de unión al anticodón. Modificado de Sankaranarayanan et al., 1999.

Introducción

1.1.6.2. Evolución de los dominios N-terminales de la ThrRS

El dominio catalítico y el dominio C-terminal de unión al anticodón están conservados en las ThrRSs de bacterias arqueas y eucariotas. En cambio, al comparar ThrRSs de distintos organismos, se observan variaciones en los dominios que se encuentran en posición N-terminal al dominio catalítico. En bacterias estos son los dominios N1 y N2; el primero de función desconocida y el segundo implicado en la edición de errores. El dominio de edición N2 es homólogo al dominio C-terminal de AlaRS, con el que comparte un 16% de identidad de secuencia, que también desempeña funciones de edición (Sankaranarayanan et al, 1999), (Beebe et al, 2003). En las cianobacterias, que son los organismos que se han utilizado como modelo en este trabajo, el dominio N1 es de menor longitud que en *E. coli* (14-28 aminoácidos frente a los 62 del dominio N1 de *E. coli*). Una excepción es el género *Prochlorococcus*, cuya ThrRS tiene un dominio N1 de longitud similar al de *E. coli*, lo que es consistente con la hipótesis de que la ThrRS de este género se adquirió por transferencia horizontal desde una γ -proteobacteria (Luque et al, 2008), (Zhaxybayeva et al, 2006). Los dominios N1 y N2 están conservados en bacterias y eucariotas pero están ausentes en arqueas. En éstas encontramos dos situaciones posibles: arqueas en las que la ThrRS contiene un dominio N-terminal no homólogo a los de bacterias y eucariotas que también realiza funciones de edición de Ser-tRNA^{Thr} (Beeve 2004; Korencic 2004) y arqueas del phylum *Crenarchaea*, en las que la ThrRS carece de este dominio que existe como una proteína independiente cifrada por un gen distinto y que realiza la labor de edición en *trans* (Korencic et al, 2004), (Shimizu et al, 2009), (Hussain et al, 2006). Esta proteína/dominio de arqueas tiene una estructura altamente similar a las D-aminoacil tRNA desacilasas, unas enzimas que desacilan tRNAs cargados erróneamente con D-aminoácidos, aunque comparte con ellas pocas identidades de secuencia (Dwivedi et al, 2005). El hecho de que enzimas ortólogas hayan reclutado en la evolución dos dominios distintos para realizar una misma función es un claro ejemplo de convergencia evolutiva.

En eucariotas existen dominios N-terminales adicionales. En la ThrRS citoplásmica existe un dominio adicional (en color marrón en la Figura 1.12) que precede al dominio N1 y que es importante para la actividad catalítica de la enzima. Su delección provoca un

Introducción

aumento de la K_m por el tRNA y una disminución de la constante catalítica (Zhou et al, 2013). En el citoplasma de eucariotas superiores existe una segunda ThrRS de mayor longitud debido a la presencia de otro dominio extra (en color turquesa en la Figura 1.12) en posición N-terminal. Esta proteína se llama ThrRS-L y es producto de un gen distinto al que cifra la otra ThrRS citoplásmica (Zhou et al, 2013). Un aspecto muy interesante del dominio extra de la ThrRS-L, cuya función es por el momento desconocida, es que muestra similitud de secuencia con un dominio extra N-terminal de la ArgRS humana implicado en la interacción con la LeuRS (Zhou et al, 2013).

La ThrRS mitocondrial carece de dominios en posición N-terminal al dominio catalítico por lo que no tiene actividad de edición post-transfer. En este caso, el control de la especificidad en la aminoacilación se lleva a cabo exclusivamente por edición pre-transfer (Ling et al, 2012).

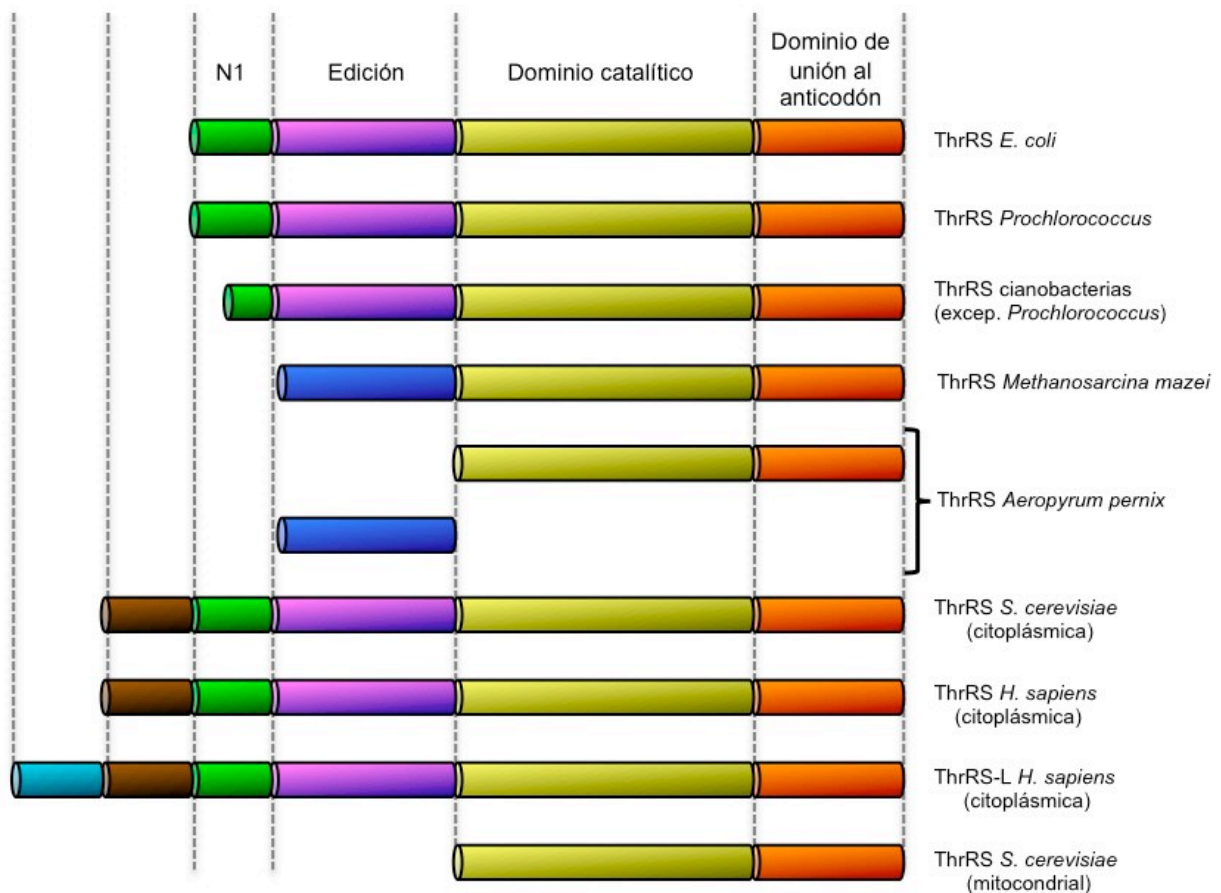


Figura 1.12. Comparación de dominios entre ThrRSs de los tres grandes dominios de la vida. Para mas detalles ver apartado 1.1.6.2

Introducción

1.1.6.3 Reconocimiento de los tRNA^{Thr}

1.1.6.3.1 Determinantes de identidad del tRNA^{Thr}

Los determinantes de identidad del tRNA^{Thr} han sido estudiados en *E. coli*, *Thermus thermophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estos elementos se localizan en las dos regiones distales del tRNA: el anticodón y el brazo aceptor. En el anticodón las bases esenciales para el reconocimiento por ThrRS son G35 y U36, conservadas en los tRNA de *E. coli*, *T. thermophilus* y *S. cerevisiae* (Fig. 1.13). En el brazo aceptor, el primer par de bases (G1 – C72) es un determinante de identidad común a las tres especies (Fig.1.13). En *E. coli* el par de bases C2 – G71 es un determinante de identidad y mutaciones en él afectan negativamente la capacidad de treonilación (Hasegawa et al, 1992). C2 – G71 está conservado también en *Saccharomyces cerevisiae* y *T. thermophilus* donde no es fundamental para el reconocimiento entre tRNA y enzima. En *S. cerevisiae* y *T. thermophilus* las bases discriminatorias, A73 y U73 respectivamente, actúan como determinantes de identidad (Nameki, 1995), (Nameki et al, 1996), mientras que en *E. coli* A73 no es un determinante de identidad ya que mutaciones en esta base no impiden una correcta aminoacilación (Hasegawa et al, 1992). Esto es consistente con la observación que la ThrRS de *T. thermophilus* no puede aminoacilar el tRNA de *E. coli*, mientras que la ThrRS de *E. coli* puede aminoacilar el tRNA de *T. thermophilus* (Zheltonosova et al, 1994).

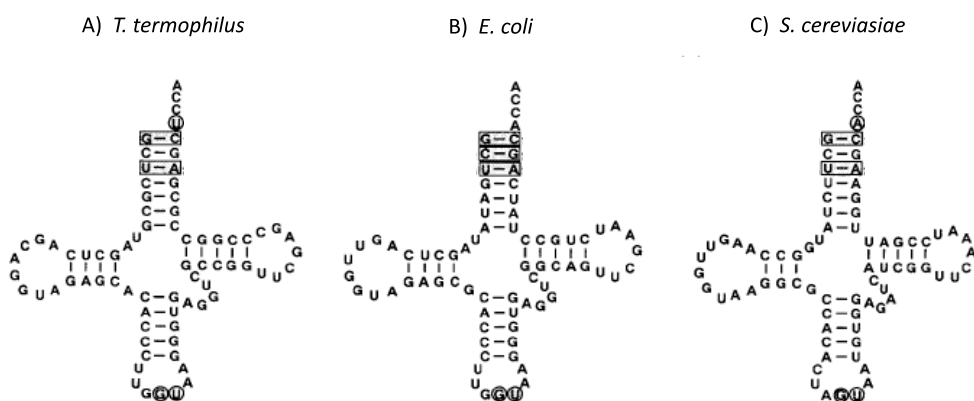


Figura 1.13 Comparación entre los tRNAs^{Thr} de *T. thermophilus*, *E. coli* y *S. cerevisiae*. Los determinantes de identidad están señalados con círculos (nucleótidos), o rectángulos (par de nucleótidos). Modificado a partir de Nameki N et al., 1996.

Introducción

Además de los determinantes de identidad existen anti-determinantes en el tRNA que dificultan su reconocimiento por una aaRSs que no le corresponde. La sustitución de las bases U3-A70 que ocupan la tercera posición en el brazo aceptor en los tRNA^{Thr} de *T. thermophilus*, *S. cerevisiae* y de *E. coli* por el par G3-U70 disminuye notablemente su afinidad por ThrRS. El par de bases G3-U70 resulta ser el determinante de identidad principal del tRNA^{Ala} en *E. coli* y eucariotas (Hou & Schimmel, 1988), (Hou & Schimmel, 1989). En los tRNA^{Thr} el par de bases U3-A70 podría actuar como anti-determinante de identidad para evitar que ThrRS confunda un tRNA^{Ala} con uno tRNA^{Thr} (Nameki, 1995).

1.1.6.3.2 La ThrRS de *E. coli* es una proteína multifunción (moonlighting)

En *E. coli* ThrRS además de desempeñar su tarea canónica de síntesis de Thr-tRNA^{Thr}, controla la expresión de su propio gen (*thrS*) a nivel de traducción (Fig. 1.14A) (Springer et al, 1985). Cuando la concentración de tRNA^{Thr} libre es baja, ThrRS se une a la región 5' UTR de su mRNA compitiendo con la subunidad 30S del ribosoma (Fig 1.14B) (Moine et al, 1990). La región líder del mRNA del gen *thrS* contiene un elemento regulador llamado operador en el que se distinguen 4 dominios: el dominio 1, de cadena sencilla, que contiene la secuencia Shine-Dalgarno de unión al ribosoma, el dominio 3, también de cadena sencilla, que une los dominios 2 y 4 de cadena doble que forman un lazo apical cuya estructura recuerda la del brazo del anticodón del tRNA^{Thr}. ThrRS se une a los dominios 2 y 4 mientras que el ribosoma se une a los dominios 1 y 3. La ThrRS reconoce el operador mediante interacciones específicas entre el dominio C terminal de la enzima y el lazo apical del mRNA, de una forma que recuerda lo que ocurre durante el reconocimiento del anticodón del tRNA^{Thr} (Torres-Larios et al, 2002), (Caillet et al, 2003), (Romby et al, 1996). El patrón de reconocimiento del lazo del mRNA es análogo al del anticodón de los tRNAs^{Thr} isoceptores para los cuales los cambios en la primera base del anticodón no afectan negativamente la aminoacilación contrariamente a los cambios en la segunda o tercera base, que son determinantes de identidad del tRNA^{Thr} (Hasegawa et al, 1992). Además, la sustitución del triplete CGU del lazo del mRNA por el triplete CAU, que es el anticodón del tRNA^{Met}, hace que la MetRS adquiera el control de la traducción del gen *thrS* (Romby et al, 1996). Se ha comprobado que ThrRS utiliza los mismos residuos para reconocer el anticodón del tRNA y el operador de su mRNA ya que mutaciones en los residuos implicados en el

Introducción

reconocimiento del anticodón del tRNA tienen un efecto análogo tanto en la aminoacilación como en el control traduccional (Caillet et al, 2003). A diferencia del tRNA^{Thr}, el operador no posee un brazo aceptor. Mutaciones en los residuos que interaccionan con el brazo aceptor no tienen ningún efecto sobre el control de la traducción (Caillet et al, 2003). El operador contiene un lazo interno que falta en el tRNA^{Thr} y que parece ser un elemento importante para el reconocimiento porque aumenta la superficie de interacción con ThrRS (Brunel et al, 1992).

El mecanismo por el que ThrRS reprime la traducción de su mRNA consiste en el impedimento estérico de la unión del ribosoma, en lo que juega un papel clave el dominio N terminal de la enzima (Caillet et al, 2003). Por tanto, la regulación de la traducción se realiza mediante la acción combinada de dos dominios: el dominio C terminal que reconoce el operador, que mimetiza el lazo del anticodón del tRNA^{Thr}, y el dominio N terminal que impide la unión del ribosoma. El dominio 2 del operador se encuentra altamente conservado en la región 5' del gen *thrS* de algunas bacterias Gram-negativas, lo que sugiere que este mecanismo de control podría ser común en estos organismos. Del dominio 4 se conservan principalmente las bases del lazo apical y esto concuerda con el papel secundario de éste (Brunel et al, 1992), (Torres-Larios et al, 2002).

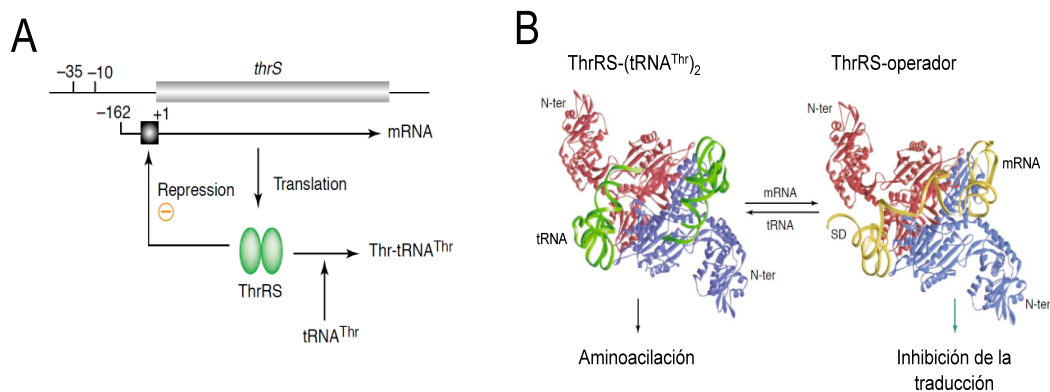


Figura 1.14 Control traduccional de ThrRS. (A) En presencia de baja concentraciones de tRNA^{Thr} libre, ThrRS se une a la región 5-UTR de su mRNA reprimiendo su traducción (modificado de Romby P y Springer M, 2003). (B) Competición entre tRNA^{Thr} y operador para la unión a ThrRS (modificado de Romby P y SpringerM, 2003).

Introducción

En este trabajo se ha utilizado una cianobacteria como organismo modelo para la caracterización de treonil tRNA sintetasas duplicadas, por lo que a continuación se expondrá brevemente algunos aspectos de la biología de estos organismos.

1.2. Las Cianobacterias

Las cianobacterias constituyen un grupo monofilético de bacterias Gram-negativas cuyo carácter diferencial es su capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica. Las cianobacterias actuales ocupan todos los hábitats iluminados del planeta incluyendo la tundra polar, las zonas tropicales y subtropicales, fuentes termales de elevada temperatura, las costras microbianas de ambientes desérticos y la capa fótica de las aguas continentales y oceánicas hasta una profundidad de 100-200 metros ((Whitton & Potts, 2002). Su gran abundancia, especialmente en el océano hace de estos organismos unos de los principales productores primarios del planeta, contribuyendo de forma significativa a los ciclos biogeoquímicos del oxígeno, el carbono y el nitrógeno (Capone et al, 1997), (Goericke & Welshmeyer, 1993), (Liu et al, 1997), (Partensky et al, 1999). Es ampliamente aceptado que cianobacterias ancestrales inventaron el proceso de la fotosíntesis oxigénica en el periodo Precámbrico y que fueron los principales artífices del enriquecimiento en oxígeno de la atmósfera terrestre y de la transformación de ésta, desde su composición primitiva rica en metano a la actual rica en oxígeno (Kasting & Siefert, 2002). Este fenómeno influyó de forma determinante en la evolución de las formas de vida que en el periodo Proterozoico tuvieron que adaptarse a un ambiente fundamentalmente aerobio (Whitton & Potts, 2002). Se puede decir por tanto que la actividad biológica de las cianobacterias ha sido y es determinante para la configuración actual de la biodiversidad en nuestro planeta.

Las secciones siguientes describen brevemente el origen, la evolución y algunos rasgos característicos de las cianobacterias.

1.2.1 Origen de las cianobacterias

Se estima que la vida está presente en el planeta Tierra desde hace unos $3,5 \times 10^9$ años. El phylum de las cianobacterias parece haber divergido de forma temprana dentro del super-reino *Bacteria*, pero la datación precisa del momento en el que ocurre la divergencia es un tema controvertido. Puesto que el rasgo más característico de estos

Introducción

organismos es su capacidad para realizar la fotosíntesis oxigénica, parece lógico asociar el origen del *phylum* con la aparición de dicho carácter. Múltiples evidencias geológicas indican que la presión parcial de oxígeno en la atmósfera aumentó de forma significativa hace unos $2,3 \times 10^9$ años (Bekker et al, 2004), lo que se atribuye a la actividad biológica de cianobacterias ancestrales. Los esfuerzos para la estimación del origen de las cianobacterias se han basado en cálculos evolutivos (reloj molecular), en el registro fósil o en una combinación de ambos (Tomitani et al, 2006), (Blank & Sanchez-Baracaldo, 2010). Knoll considera probable que el origen de las cianobacterias se encuentre en el periodo comprendido entre 3 y $2,7 \times 10^9$ años (Knoll, 2008), lo que está de acuerdo con estimaciones de reloj molecular recientes (Schirmer et al, 2013).

El proceso de la fotosíntesis oxigénica requiere la actuación en serie de dos fotosistemas distintos denominados PSI y PSII. En la naturaleza existen bacterias fotosintéticas anoxigénicas con un sólo fotosistema que puede ser parecido al PSI o al PSII de cianobacterias. La falta de coherencia filogenética entre las bacterias fotosintéticas ha llevado a la aceptación general de que los genes que cifran los fotosistemas se han transmitido por transferencia horizontal entre distintas líneas bacterianas a lo largo de la evolución (Raymond et al, 2002), (Allen & Martin, 2007). Durante algún tiempo se ha considerado como hipótesis más parsimoniosa que las bacterias fotosintéticas anoxigénicas hubiesen precedido en la evolución a las cianobacterias, que habrían surgido posteriormente, al confluir los genes de ambos fotosistemas en una misma célula, probablemente por algún fenómeno de transferencia horizontal (Dismukes et al, 2001), (Xiong et al, 2000), (Xiong, 2006). Mulikidjanian, sin embargo, ha propuesto una hipótesis radicalmente distinta basada en la comparación de genomas completos, sugiriendo que las cianobacterias derivarían de una *procianobacteria* ancestral que realizaría fotosíntesis anoxigénica utilizando alternativamente un fotosistema u otro. En algún momento de la evolución se habría empezado a utilizar ambos fotosistemas en serie usando el agua como fuente de electrones. El resto de bacterias fotosintéticas se habría originado al adquirir los genes de uno de los dos fotosistemas desde una *procianobacteria* mediante transferencia horizontal (Mulikidjanian et al, 2006).

A pesar del origen común de todas las cianobacterias, la prolongada divergencia evolutiva de las especies en la larguísima historia del *phylum* ha dado lugar a una

Introducción

amplia diversidad que se refleja en el tamaño y composición del genoma, la morfología, el metabolismo y el modo de vida.

1.2.2 La evolución de las cianobacterias

La amplísima variabilidad de las cianobacterias es apreciable en la dotación de genes de los genomas. Estudios independientes en los que se compara la composición génica de varios genomas (cuyo número varía entre 13 y 16 según el estudio) han llegado a la conclusión de que el número de genes que comparten todos los genomas analizados oscila entre 600 y 900 (Shi & Falkowski, 2008), (Mulkiđjanian et al, 2006), (Beck et al, 2012). Este grupo de genes se denomina *core* e incluye los genes esenciales y aquellos que determinan caracteres específicos cianobacterianos (fotosíntesis, ciclo de Calvin-Benson). El resto de los genes de cada genoma se distribuye en dos grupos: los genes que son compartidos por varios genomas y los genes exclusivos de cada genoma. En el caso de los genomas de tamaño reducido, el *core* constituye una porción significativa (40% en el caso de *Prochlorococcus marinus* MED4), mientras que en el caso de *Nostoc punctiforme* se reduce al 9 %. Dicho de otro modo, el 90% de los genes del genoma de *N. punctiforme* no tiene ortólogos en el genoma de *P. marinus* MED4, lo que ilustra la amplísima variabilidad genética del *phylum Cyanobacteria*. Otro indicador de la variabilidad es el *pangenoma* cianobacteriano, esto es, la suma de los genes de todos los genomas de cianobacterias, cuyo tamaño se desconoce actualmente pero que con seguridad supera los 2×10^4 genes (Beck et al, 2012).

Del análisis filogenético de secuencias de proteínas se ha llegado a la conclusión de que muy pocos genes se ajustan al patrón de herencia vertical (el del RNA ribosómico 16S) (Shi & Falkowski, 2008), (Zhaxybayeva et al, 2006), de lo que se ha deducido que fenómenos como la transferencia horizontal o la duplicación génica pueden haber jugado un papel importantísimo en la evolución de los genomas cianobacterianos (Shi & Falkowski, 2008), (Zhaxybayeva et al, 2006), (Luque et al, 2008). Una consecuencia importante de lo anterior es que en muchos casos la divergencia entre especies que se infiere de la comparación de secuencias del rRNA 16S o de secuencias de genes homólogos no refleja la divergencia del genoma de dichas especies. Por ejemplo, mientras que dos estirpes de *Microcystis aeruginosa* muestran una identidad de sus rRNA 16S del 99,7% y una identidad promedio entre genes ortólogos de un 94%, el genoma de una de ellas (*M. aeruginosa* sp. PCC 7806) alberga 838 genes específicos

Introducción

(de un total de 5292) y el de la otra (*M. aeruginosa* NIES-843) 1760 genes específicos (de un total de 6363) (Frangeul et al, 2008).

1.2.3 El árbol filogenético de las cianobacterias. Clasificación taxonómica de las especies cianobacterianas.

Recientemente se han realizado numerosos esfuerzos para dilucidar las relaciones filogenéticas de las especies de cianobacterias actuales. En estos análisis se utilizan acercamientos variados que implican la comparación de secuencias (Swingley et al, 2008), (Luque et al, 2008), (Tomitani et al, 2006), (Blank & Sanchez-Baracaldo, 2010), el análisis de *quartets* (Zhaxybayeva et al, 2006) o el análisis de *indels* (inserciones o deleciones) (Gupta, 2009).

Rippka publicó en 1979 una primera clasificación de las cianobacterias basada fundamentalmente en caracteres morfológicos y del plano de división celular, que dividía las especies en 5 clases (Tabla 1.2 y Fig. 1.15). Actualmente se sabe que de las clases propuestas por Rippka, sólo la clase II (con algunas excepciones) y conjuntamente las clases IV y V forman grupos filogenéticamente coherentes. El análisis de secuencias del rRNA 16S y la secuenciación de genomas cianobacterianos ha permitido el análisis de la filogenia de las especies con herramientas moleculares. Actualmente se dispone de la secuencia de más de 100 genomas de cianobacterias (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>). Sin embargo, la distribución de las especies en los árboles filogenéticos es aún controvertida (Shih et al, 2013), (Dagan et al, 2013), (Schirromeister et al, 2011), (Schirromeister et al, 2013) y no se ha llegado a un mínimo consenso en la comunidad científica para la clasificación de las especies en grandes grupos taxonómicos. Recientemente, Schirromeister et al. han publicado un análisis filogenético de las especies cianobacterianas sumamente exhaustivo en el que se muestra que la mayor parte de las cianobacterias se agrupan en tres grupos filogenéticos que han denominado E1, E2 y AC (Figura 1.16) (Schirromeister et al, 2013).

Introducción

Tabla 1.2. Clasificación morfológica de las especies bacterianas según Rippka 1979

CLASE	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
I	cianobacterias unicelulares que se reproducen por fisión binaria o gemación	<i>Synechococcus</i> , <i>Gloeobacter</i>
II	cianobacterias unicelulares que se reproducen por fisión múltiple	<i>Crocospaera</i> , <i>Agmenellum</i>
III	cianobacterias filamentosas no formadoras de heterocistos que se dividen en un único plano	<i>Spirulina</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Lyngbya</i>
IV	cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos que se dividen en un único plano	<i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Tolypothrix</i>
V	cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos que se dividen en más de un plano	<i>Fischerella</i> , <i>Scytonema</i>

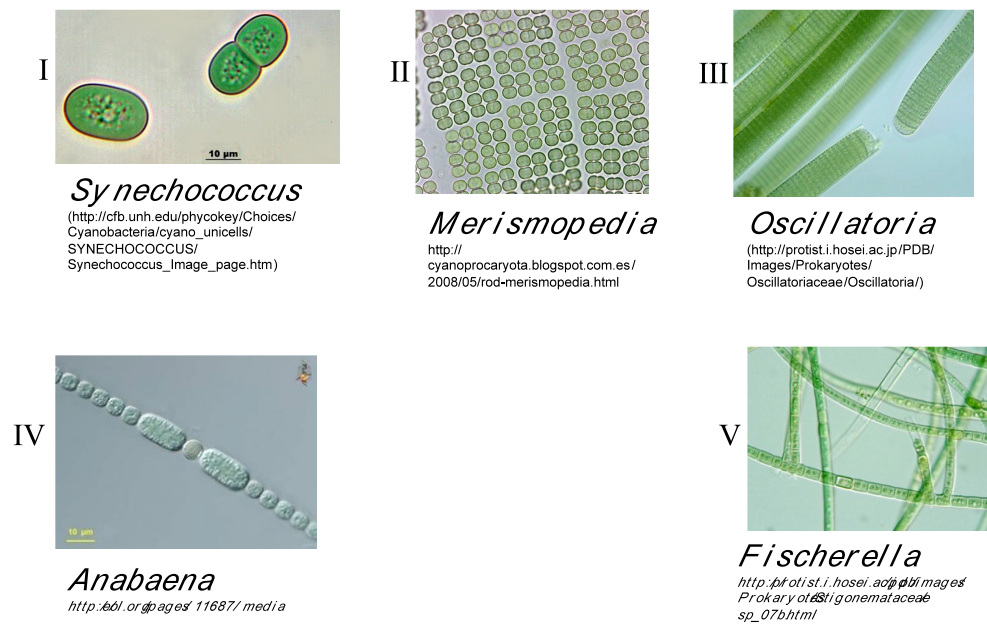


Figura 1.15 Exponentes de cada una de las cinco secciones de la clasificación morfológica de Rippka.

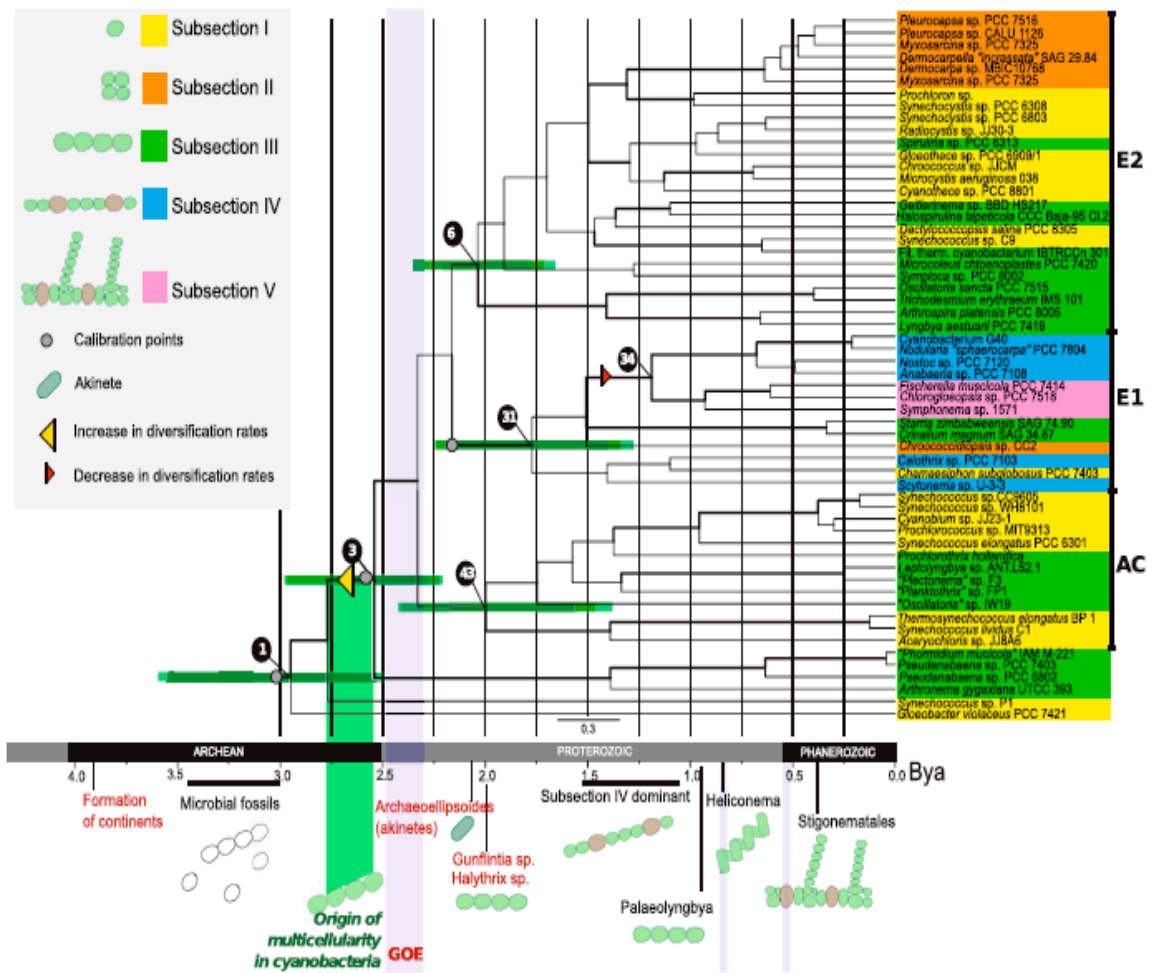


Fig. 1.16 Arbol filogenético de cianobacterias. Cada sección de la clasificación de Rippka se representa con un color diferente. En la parte inferior de la figura se muestra una escala de tiempo indicando el momento aproximado de la aparición de los principales caracteres morfológicos. Figura original de Schirmer B et al., 2013

1.2.4 El genoma de las cianobacterias

La diferencia del tamaño del genoma de diferentes especies de cianobacterias es enorme y oscila entre 1,44 y 12 Mpb (que cifran 1241 y 12.356 proteínas, respectivamente), si bien, el genoma de 1,44 Mpb mencionado corresponde a un simbiote obligado que carece de varias rutas metabólicas esenciales, la cianobacteria UCYN-A (Thompson et al, 2012), (Tripp et al, 2010), (Dagan et al, 2013). Probablemente el genoma mínimo que permite un estilo de vida libre tiene un tamaño similar al de *Prochlorococcus marinus* MED4, de 1,66 Mpb (1716 genes) (Rocap et al, 2003). En general, se observa una correlación entre el tamaño del genoma y el estilo de vida, de modo que los organismos de genoma más reducido habitan los ambientes más estables.

La organización del genoma es asimismo muy variada. En algunas especies como *Gloeobacter violaceus* o los *Prochlorococcus* y *Synechococcus* marinos, el único

Introducción

soporte físico del genoma es un cromosoma circular (Nakamura et al, 2003), (Rocap et al, 2003), (Dufresne et al, 2003), (Palenik et al, 2003). En otros casos, el genoma se distribuye en un cromosoma circular y varios plásmidos de menor tamaño que pueden portar genes con funciones esenciales (Hess, 2011). El número de copias del cromosoma es también muy variable, de modo que hay especies monoploides, oligoploides o altamente poliploides, llegando a portar más de 100 copias del cromosoma por célula (Griese et al, 2011).

1.2.5 Rasgos metabólicos característicos de las cianobacterias

La característica más relevante de las cianobacterias es su capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica, por lo que se clasifican como organismos foto-lito-autótrofos, es decir que utilizan la energía lumínica para obtener poder reductor mediante la hidrólisis de compuestos inorgánicos (H_2O) y reducir el carbono inorgánico (CO_2) en compuestos orgánicos. Durante muchos años se consideraron bacterias autótrofas obligadas, sin embargo, Rippka demostró a principio de los años setenta que algunas estirpes eran foto-órgano-heterótrofas o quimio-organo-heterótrofas facultativas, siendo capaces en este último caso de utilizar compuestos orgánicos como fuentes de energía, de poder reductor y de carbono (Rippka, 1972). Posteriormente se describieron otras especies de cianobacterias que facultativamente presentaban un tipo de crecimiento no foto-lito-autótrofo (Haury & Spiller, 1981), (Summers et al, 1995), (Anderson & McIntosh, 1991), (Ungerer et al, 2008), (Stebegg et al, 2012). Estos ejemplos ponen de manifiesto la diversidad y elasticidad metabólica de las cianobacterias. Dicho de otro modo, aunque todas las cianobacterias son foto-lito-autótrofas (fotosintéticas oxigénicas) algunas especies pueden reorganizar parcelas fundamentales de su metabolismo para crecer a expensas de fuentes alternativas de energía, carbono y poder reductor.

Introducción

Otra característica metabólica de las cianobacterias es su peculiar ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Desde 1967, ha sido ampliamente aceptada la noción de que el ciclo de los ácidos tricarboxílicos de las cianobacterias es incompleto por la ausencia de la enzima 2-oxoglutarato deshidrogenasa (2-OGDH) (Smith et al, 1967). Recientemente el grupo de D. A. Bryant demostró que las enzimas 2-oxoglutarato descarboxilasa (2-OGDC) y succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) existen en *Synechococcus* PCC 7002 y están conservadas en muchas cianobacterias. La acción sucesiva de estas enzimas genera succinato a partir de 2-oxoglutarato cerrando el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 1. 17) (Zhang & Bryant, 2011) (Steinhauser et al, 2012).

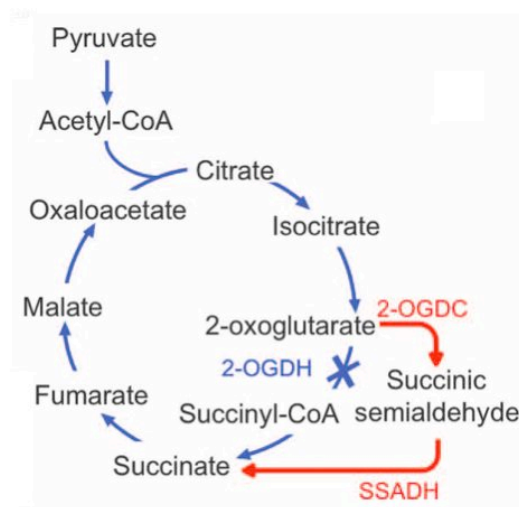


Figura 1.17. Ciclo de los ácidos carboxílicos en *Synechococcus* sp. PCC 7002. Se muestra con una x azul la enzima ausente (2-OGDH) y en rojo las dos enzimas que convierten el 2-oxoglutarato en succinato (2-OGDC y SSADH). Modificado a partir de Zhang S y Bryant D A, 2011

Algunas cianobacterias pueden fijar el nitrógeno atmosférico, una cualidad restringida a un pequeño número de especies bacterianas. La enzima fundamental de este proceso es la nitrogenasa, un complejo enzimático altamente sensible al oxígeno, que cataliza la fijación reductiva del N_2 en amonio (Seefeldt et al, 2009). Las cianobacterias fijadoras de N_2 separan la fotosíntesis oxigénica de la fijación de N_2 bien temporalmente, realizando la fotosíntesis durante las horas de luz y la fijación de N_2 en oscuridad o espacialmente, confinando cada proceso en células especializadas (ver apartado “La diferenciación celular”).

Introducción

1.2.6 La diferenciación celular

Las cianobacterias de las secciones IV y V de la clasificación de Rippka diferencian células especializadas en la fijación de N_2 que se denominan heterocistos. Estas células no producen oxígeno por fotosíntesis ya que no expresan los genes del PSII y además están equipadas con una espesa pared celular que impide la difusión del O_2 . Ello, unido a una alta actividad respiratoria permite la creación de un ambiente microaeróbico ideal para la actividad de la nitrogenasa (Flores & Herrero, 2010). El proceso de diferenciación se ha estudiado fundamentalmente en los géneros *Nostoc* y *Anabaena*. La deficiencia de fuentes de nitrógeno combinado dispara una cascada de reguladores que influyen positiva o negativamente en la diferenciación de las células del filamento, de modo que tras un periodo de unas 16-20 h el filamento está constituido por heterocistos distribuidos de forma semirregular entre cada 10-15 células (Flores & Herrero, 2010), (Muro-Pastor & Hess, 2012), (Herrero et al, 2004). Algunas especies diferencian células especializadas en la fijación de N_2 distintas a los heterocistos. Éste es el caso de *Trichodesmium erythraeum*, una cianobacteria filamentosa de la sección III de la clasificación de Rippka que se encuentra entre las especies de cianobacterias planctónicas que más contribuyen a la fijación de N_2 en los océanos (Carpenter & Capone, 2008). *Trichodesmium* fija el N_2 exclusivamente durante el día simultaneando este proceso con la fotosíntesis oxigénica (Capone et al, 1997). Para evitar la inactivación de la nitrogenasa, en la parte central de los filamentos de *Trichodesmium* se diferencian unas células denominadas diazocitos que expresan los genes para la fijación del nitrógeno. Estas células apenas se distinguen morfológicamente de las células vegetativas y, a diferencia de los heterocistos no presentan una pared celular engrosada, pero aparentemente su localización en el centro del tricoma les permite aprovechar un ambiente microaeróbico que es favorable a la fijación de N_2 (Bergman et al, 2012).

Otros tipos de células diferenciadas son los hormogonios y los acinetos. Los hormogonios son pequeños filamentos móviles compuestos de células de tamaño reducido que permiten la dispersión del organismo mientras que los acinetos son células durmientes cuya función es de resistir a condiciones ambientales adversas (Meeks & Elhai, 2002).

Introducción

1.2.7 El reloj circadiano de las cianobacterias

Las cianobacterias son los organismos más simples de la evolución que presentan un ritmo circadiano. Los mecanismos moleculares subyacentes a las oscilaciones circadianas de las cianobacterias se han estudiado fundamentalmente en *Synechococcus elongatus* PCC 7942. En este organismo se ha descrito un pequeño operón *kaiABC* que cifra tres proteínas “reloj” esenciales KaiA, KaiB y KaiC (kai quiere decir ciclo en japonés) (Ishiura et al, 1998). KaiC posee actividad autoquinasa y autofosforilasa (Nishiwaki et al, 2000) y se ha observado que su nivel de fosforilación sigue un ciclo con un periodo de 24 horas (Iwasaki et al, 2002). KaiA induce la fosforilación de KaiC (Iwasaki et al, 2002) mientras que KaiB inhibe la actividad de KaiA induciendo la defosforilación de KaiC (Kitayama et al, 2003). Recientemente se han identificado los sitios de fosforilación de KaiC (Nishiwaki et al, 2004) y se ha demostrado que las tres proteínas forman un complejo durante las fases de fosforilación y defosforilación (Nakajima et al, 2005), (Kageyama et al, 2006). Las interacciones entre KaiA, KaiB y KaiC determinan la alternancia entre los estados de fosforilación y defosforilación de KaiC, que es la responsable del mantenimiento del ritmo circadiano en *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Nishiwaki et al, 2007). La oscilación del reloj afecta al estado de compactación del cromosoma (Smith & Williams, 2006), lo que determina variaciones rítmicas en el patrón de expresión génica (Ito et al, 2009).

1.2.8. aaRSs ancladas a membranas.

Las cianobacterias son los únicos organismos en los que se ha descrito aaRSs ancladas a membrana. En general, estas proteínas se encuentran de forma soluble en el citoplasma, la matriz mitocondrial o el estroma cloroplastídico, y en algunos casos se pueden encontrar formando complejos entre sí y con otras proteínas (Hausmann & Ibba, 2008). En algunas especies de cianobacteria se ha observado que algunas aaRSs de clase I, como GluRS, IleRS, LeuRS, ValRS y CysRS cuentan con un dominio adicional que se ha denominado CAAD (Luque et al, 2008). Se ha demostrado que este dominio dirige la localización de estas aaRSs a la membrana tilacoidal (Olmedo-Verd et al, 2011), lo que otorga a este dominio un papel estructural. Además se ha descartado que dicho dominio participe en la catálisis. No es fácil deducir por qué se ha seleccionado la localización de estas proteínas en la membrana pero se ha demostrado que un mutante de *Anabaena*

Introducción

sp PCC 7120 cuya ValRS carece del dominio CAAD y se localiza en la fracción soluble muestra un defecto en el crecimiento en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Olmedo-Verd et al, 2011). Investigaciones recientes de nuestro grupo han identificado proteínas que interaccionan con la ValRS de *Anabaena* en la membrana tilacoidal (Santamaría- Gómez, resultados sin publicar).

Introducción

En este trabajo se ha caracterizado el funcionamiento de un sistema compuesto por dos treonil tRNA sintetasas en respuesta a la disponibilidad de zinc, por lo que a continuación se expondrán algunos aspectos de la biología de los metales.

1.3 Biología de los metales

1.3.1 Generalidades

Mientras que los elementos llamados macronutrientes como carbono, H, N, O, P y S son esenciales para todas las células, las necesidades de micronutrientes, entre los que se incluyen los metales, varían entre los organismos. Entre los metales, Zn y Mg se consideran indispensables para todas las formas de vida (Merchant & Helmann, 2012). También el hierro está ampliamente difundido en los seres vivos aunque existen microorganismos que pueden vivir sin él (Posey & Gherardini, 2000). El requerimiento de los demás metales no es universal y varía entre arqueas, bacterias y eucariotas. En algunos casos esto puede reflejar la adaptación a condiciones de vida extremas como en la arquea *Ferroplasma acidiphillum* que vive en ambientes muy ácidos (pH 1.7) que favorecen la biodisponibilidad de hierro y cuyas metaloproteínas contienen en su mayoría hierro (Ferrer et al, 2007). En general, la distribución de los metales en los tres grandes dominios de la vida se ha visto influenciada por los grandes cambios geoquímicos que han ocurrido en la historia de la Tierra, sobre todo aquellos producidos después de la aparición de la fotosíntesis oxigénica. En los océanos primordiales la vida evolucionó en condiciones anóxicas y reductoras en las que Fe, Mn, Ni y Co se encontraban biodisponibles a elevadas concentraciones. El gran evento de oxigenación atmosférica que siguió a la invención de la fotosíntesis oxigénica redujo en gran medida la biodisponibilidad de Fe, Mn, Ni y Co y aumentó la de Zn, Cu y Mo. Estos cambios en la biodisponibilidad de los metales se reflejan en la historia evolutiva de los organismos. En arqueas y bacterias las metaloproteínas que utilizan Fe y Ni son más abundantes que en eucariotas, mientras que en éstos las metaloproteínas de zinc representan alrededor del 9% de todo el proteoma, frente al 5% o 6% en procariontes. Esta abundancia de metaloproteínas de zinc en eucariotas parece ser debida sobre todo a la utilización extensiva de dominios estructurales como los dedos de zinc (Andreini et al, 2009). La escasa biodisponibilidad de algunos metales ha favorecido la selección de

Introducción

organismos que cuentan con sistemas para optimizar la utilización de metales limitantes. Por ejemplo los microorganismos y las plantas liberan respectivamente sideróforos al exterior celular y reductasas en la superficie de las raíces para maximizar la obtención de hierro del medio ambiente mediante la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} (Robinson et al, 1999), (Palmer & Guerinot, 2009).

Dentro de la célula, las concentraciones de metales libres son mínimas (generalmente inferiores a 10^{-12} M). La mayor parte de éstos se encuentra unido a las proteínas que conforman el metaloproteoma y sólo una mínima parte queda disponible para su incorporación en proteínas de nueva síntesis (Robinson & Winge, 2010). La estabilidad relativa de los complejos formados por cationes metálicos divalentes con la materia orgánica se describe en la serie de Irving-Williams ($\text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$) (Irving & Williams, 1948), según la cual, Cu y Zn forman los complejos más estables mientras que Mg y Ca son las especies menos competitivas. De acuerdo con esto, en un caso ideal en el que las proteínas dispusieran de un exceso de metales libres en el citoplasma, sólo existirían metaloproteínas de cobre y zinc. Para evitar esto se han seleccionado en la evolución una serie de mecanismos que permiten a las metaloproteínas unirse al metal correcto y que sólo recientemente se han empezado a conocer (Waldron & Robinson, 2009). En primer lugar, las células mantienen activamente concentraciones muy bajas de cationes metálicos libres en el citoplasma, de manera que son las proteínas las que compiten por los metales y no al contrario. Las concentraciones citoplasmáticas vienen dictadas por el equilibrio entre la acción de los sistemas de importación y los de exportación. En bacterias existen varios tipos de transportadores. En la membrana externa de las bacterias Gram-negativas se encuentran porinas, que permiten la libre difusión de pequeños iones, y transportadores dependientes de TonB que utilizan energía para transportar moléculas demasiado grandes para pasar a través de las porinas (sideróforos) (Noinaj et al, 2010). En la membrana plasmática se encuentran transportadores de tipo ABC (ATP Binding Cassette), ATPasas de tipo P_i , transportadores de tipo CDF (Cation Diffusion Facilitator) y RND (Resistance and Nodulation) se encargan de eliminar del interior celular el exceso de metales, NiCoT (transportadores de Ni y Co), CorA (implicada en la resistencia a Cobalto), NRAMP (natural resistance associated with a macrophage protein) y transportadores de la familia ZIP (Waldron & Robinson, 2009). La expresión de los transportadores de metales se regula por factores de transcripción

Introducción

específicamente sensibles a cada metal (ver apartado apartado 1.3.3) que activan o reprimen la transcripción de los genes bajo su control según las necesidades de la célula. Estos mismos reguladores controlan el metabolismo para minimizar la demanda de metales escasos o aprovechar aquellos más abundantes (Waldron et al, 2009), (Giedroc & Arunkumar, 2007).

Las metalotioneínas, que son proteínas ricas en cisteína e histidina, también contribuyen a mantener concentraciones mínimas de iones libres en el citoplasma. Estas proteínas secuestran los metales en exceso evitando que los situados en la parte alta de la serie de Irving-Williams ocupen los sitios de coordinación de proteínas que corresponden a metales menos competitivos. En eucariotas, la metalotioneínas son ubicuas y unen diferentes metales, mientras que en procariotas parecen estar implicadas con la resistencia a zinc (Blindauer et al, 2002).

La especificidad entre metal y proteína se consigue también mediante la interacción con proteínas accesorias, las metalochaperonas. Estas proteínas capturan un determinado metal y lo insertan, a expensas de energía (normalmente GTP) en las proteínas que usan dicho metal como cofactor. Se han descrito metalochaperonas de níquel como HypA e HypB de *E. coli* que participan en la maduración de las hidrogenasa (Leach & Zamble, 2007) o UreE de *Helicobacter pylori* que proporciona el metal a la ureasa (Maier et al, 2007). También existen metalochaperonas de cobre como CopZ de *Enterococcus hirae* y *Bacillus subtilis* que cede el metal al regulador transcripcional CopY o lo transporta a un exportador de tipo P_i-ATPasa situado en la membrana plasmática (Cobine et al, 1999), (Radford et al, 2003). En *Synechocystis* PCC 6803 un homólogo de CopZ, Atx1, suministra cobre a la plastocianina del lumen tilacoidal (Tottey et al, 2002). Algunas metalochaperonas capturan el metal adecuado interaccionando con el transportador de dicho metal, de modo que son las interacciones proteína-proteína las que determinan la especificidad por el metal (Harrison et al, 2000).

Otro mecanismo que contribuye a asegurar la unión de una proteína al metal adecuado se basa en el confinamiento del plegamiento de las proteínas en un determinado compartimento celular, de modo que se evita su plegamiento en un compartimento en el que abunden otros metales más competitivos. Es éste el caso de MncA y CucA que son proteínas abundantes en el periplasma de *Synechocystis* sp. PCC 6803. MncA y CucA tienen una estructura similar (β -barrel) y utilizan los mismos residuos para unir

Introducción

respectivamente Mn y Cu, que ocupan extremos opuestos en la serie de Irving-Williams. *In vitro* ambas proteínas unen Cu con mucha mayor afinidad que Mn, sin embargo en la célula cada una adquiere el metal apropiado. CucA es sustrato del sistema Sec de exportación de proteínas, de modo que se exporta de forma desplegada a través de la membrana plasmática y se pliega en el periplasma que es donde incorpora Cu. McnA por su parte es sustrato de Tat (*twin arginine translocase*) que exporta las proteínas ya plegadas al periplasma. Por tanto, McnA se pliega en el citoplasma lo que le permite de adquirir Mn ya que en este compartimento la concentración de los metales más competitivos (Cu y Zn) se mantiene muy baja. Una vez plegada McnA, el átomo de Mn queda atrapado en un bolsillo cerrado con una tasa muy baja de liberación. De esta forma, McnA y CucA pueden coexistir en el periplasma (Tottey et al, 2008).

En algunas proteínas, la ocupación del sitio de coordinación por un metal distinto es improductiva, esto es, no desencadena los mismos fenómenos que la unión del metal adecuado. Por ejemplo, el represor transcripcional NmtR de *Mycobacterium tuberculosis* percibe el exceso de níquel y cobalto, aunque *in vitro* une zinc con mayor afinidad. La unión de este último metal es sin embargo improductiva porque no provoca el cambio conformacional necesario que favorece la disociación del represor del DNA (Cavet et al, 2002), (Pennella et al, 2003).

1.3.2 El zinc en biología

El zinc es un elemento esencial para la vida presente en todos los organismos y su deficiencia puede provocar alteraciones metabólicas importantes. En plantas, ésta es una de las deficiencias de minerales más comunes (Assuncao et al, 2010) y es una de las deficiencias que frecuentemente limitan al fitoplancton en extensas zonas de océano (Blindauer, 2008). En humanos se estima que alrededor del 10% de todas la proteínas contienen zinc, que desempeña funciones importantes en el sistema nervioso, reproductivo e inmune y tiene un papel central en el desarrollo y el crecimiento. Muchas enfermedades, incluyendo algunas degenerativas, la diabetes y el cáncer tienen relación con perturbaciones de los mecanismos homeostáticos del Zn, siendo la deficiencia de este metal una de las mayores amenazas para la salud humana y una de las mayores causas de la mortalidad infantil cada año (King, 2011).

Introducción

En la célula, el zinc desempeña múltiples funciones. Por ejemplo contribuye a estabilizar la estructura de los ácidos nucleicos, es un cofactor esencial para muchas enzimas en las que bien ejerce funciones catalíticas o participa como elemento estructural (Fuwa et al, 1960), (Merchant & Helmann, 2012). Los aminoácidos con los que se coordina el zinc más comúnmente son H, E, D y C. En las proteínas, el zinc aparece generalmente en un estado de tetracoordinación, uniéndose a cuatro residuos de la proteína, en el caso de los sitios estructurales, o a tres, en el caso de los sitios catalíticos, en los que el cuarto enlace de coordinación lo proporciona una molécula de agua (Auld, 2001). La primera metaloenzima de zinc descrita fue la anhidrasa carbónica de eritrocitos (Keilin & Mann, 1940). Actualmente se conocen más de 300 enzimas de las seis clases (hidrolasas, oxidoreductasas, isomerasas, ligasas, liasas y transferasas) que utilizan zinc en su centro activo (Grattan & Freake, 2012). El grupo más abundante de éstas está constituido por hidrolasas, ampliamente distribuidas en procariotas y eucariotas y con funciones muy diversas (Coleman, 1998). Muchas enzimas esenciales contienen zinc, entre las que se encuentran las RNA polimerasas y algunas aminoacil-tRNA sintetasas.

1.3.2.1 Mecanismos moleculares implicados en la homeostasis de zinc

A pesar de ser un micronutriente esencial universal, concentraciones elevadas de zinc pueden ser tóxicas para la célula. La homeostasis de cualquier metal se basa en mecanismos orientados a corregir las desviaciones de la concentración del metal respecto a las necesidades celulares. Cuando la concentración de zinc es muy alta se activan respuestas de resistencia y detoxificación que implican la extrusión y/o el secuestro del metal en exceso. En *Synechocystis* sp. PCC 6803 se han encontrado un divergon constituido por dos genes, *ziaA* y *ziaR*, que está implicado en la respuesta al exceso de zinc. *ziaA* cifra para un exportador de zinc de tipo Cpx ATPasa, mientras que *ziaR* cifra un represor de la transcripción dependiente de zinc perteneciente a la familia ArsR que reprime la transcripción de *ziaA* en presencia de concentraciones bajas de zinc. Cuando la concentración de zinc aumenta ZiaR se disocia del promotor de *ziaA* permitiendo su transcripción (Thelwell et al, 1998). Un mecanismo muy parecido implicado en la resistencia a Zn^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} se ha encontrado en *Anabaena* sp. PCC 7120. Esta cianobacteria contiene el operon *aztR/aztA* donde *aztA* cifra para una bomba de extrusión de cationes divalentes de tipo CPx-ATPasa y *aztR* cifra para un regulador

Introducción

de la familia SmtB dependiente de Zn^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} . La expresión de *aztA* es regulada por AztR en respuesta a variaciones de la concentración de Zn^{2+} , Pb^{2+} y Cd^{2+} (Liu et al, 2005).

Las respuestas celulares a la deficiencia de zinc están bien caracterizada en procariotas y en levaduras (Maciag et al, 2007), (Li et al, 2009), (De Nicola et al, 2007), (Schroder et al, 2010). En general consiste en la activación transcripcional de genes que en condiciones de suficiencia del metal están reprimidos por un regulador cuya unión al DNA requiere zinc. Ello generalmente va dirigido a aumentar la concentración intracitoplásmica del metal mediante la inducción de sistemas de importación y la liberación del zinc de los sitios de almacenamiento. En *S. cerevisiae* por ejemplo, en respuesta a deficiencia de zinc, se activa la síntesis de Zrtp3 que exporta zinc de las vacuolas (Eide, 2009). Tanto en procariotas como en levaduras se ha descrito que algunas proteínas ribosómicas que poseen zinc estructural funcionan como almacén de zinc. Cuando este metal escasea, estas proteínas pueden ser sustituidas con proteínas homólogas que no contienen zinc, liberando de esta forma el metal (Panina et al, 2003), (Gabriel & Helmann, 2009). Las células pueden además adaptar su metabolismo para minimizar el requerimiento de zinc sustituyendo enzimas dependientes de zinc por enzimas alternativas que utilizan un cofactor distinto (Jaffe, 2004), (Sankaran et al, 2009), (Eide, 2009).

1.3.2.2 Papel del zinc en las aaRSs

Se ha descrito la presencia de zinc en la estructura de varias aaRSs. En algunas, el zinc juega un papel estructural y está coordinado por cuatro residuos de la proteína. Por ejemplo, la IleRS de bacterias y mitocondrias contiene un dominio C terminal en el que el zinc tiene un papel estructural y se coordina a cuatro residuos de cisteína (Nakama et al, 2001), (Silvian et al, 1999). Por su parte, la LeuRS de bacterias posee un dominio adicional flexible denominado ZN1 en el que se encuentra un átomo de zinc (Tukalo et al, 2005). Este dominio está implicado en los cambios conformacionales que la enzima sufre durante el proceso de corrección de errores para permitir la translocación del extremo aceptor del tRNA^{Leu} del sitio catalítico al sitio de edición (Palencia et al, 2012). Se ha descrito la existencia de un átomo de zinc en la estructura de la GluRS de *E. coli* (Liu et al, 1995), (Banerjee et al, 2004) que no se ha observado en la estructura de otras GluRSs procarióticas (Schulze et al, 2006). Las MetRSs de distintos organismos se han

Introducción

clasificado en cuatro grupos según su contenido en zinc estructural en el dominio CPI que varía entre cero y dos átomos del metal por cadena polipeptídica (Mechulam et al, 1999). La ProRS de arqueas, eucariotas y algunas bacterias como *Thermus thermophilus* contiene un átomo de zinc estructural en un dominio C-terminal ausente en la enzima de bacterias (Yaremchuk et al, 2000).

Otras aaRSs, como CysRS y ThrRS, contienen un átomo de zinc en el sitio activo. En cada una de ellas, el metal se une a tres residuos de la proteína y a una molécula de H₂O. En CysRS, el zinc se une a dos residuos de Cys, uno de His y uno de Glu mientras que en ThrRS se une a dos residuos de His y uno de Cys. En ambas enzimas el átomo de zinc participa en el reconocimiento del aminoácido correcto y discrimina los incorrectos (serina y alanina para CysRS y valina para ThrRS) (Sankaranarayanan et al, 1999), (Sankaranarayanan et al, 2000), (Zhang et al, 2003). Las arqueas metanogénicas poseen una SerRS, distinta a la de bacterias y eucariotas, que contiene en el sitio activo un átomo de zinc implicado en el reconocimiento de la serina. El zinc tiene una geometría de coordinación tetraédrica, uniéndose a dos residuos de Cys, a uno de Glu y a una molécula de H₂O (Bilokapic et al, 2006). Aunque en estas tres aaRSs el zinc se encuentra en el sitio activo y tiene una función esencial en el reconocimiento del sustrato, su papel no es estrictamente catalítico pues no interviene en la química de la reacción.

La AlaRS contiene un átomo de zinc en el sitio de edición del dominio C-terminal coordinado por tres residuos de la proteína y una molécula de agua. Aunque esta situación recuerda a la del sitio activo de la ThrRS, la actividad de edición de la AlaRS sólo se ve afectada levemente cuando el metal se elimina mediante tratamientos con quelantes (Sokabe et al, 2009).

1.3.3 Reguladores relacionados con la homeostasis de metales

1.3.3.1 Generalidades

Los reguladores dependientes de metales (o sensores de metales) son proteínas capaces de detectar la presencia un catión metálico a una concentración igual o mayor de un determinado umbral y regular la expresión de genes diana. Para ello cuentan con sitios de coordinación del metal que les permiten reconocer el ligando adecuado mediante la

Introducción

adopción de geometrías específicas de coordinación. La presencia del metal correcto provoca cambios estructurales que favorecen la unión o la disociación de la proteína del DNA (Giedroc & Arunkumar, 2007). En procariotas existen varias familias de reguladores citoplasmáticos dependientes de metales que detectan la presencia de 6 metales de transición: Fe, Zn, Cu, Ni, Mn y Co (Waldron & Robinson, 2009). Además existen reguladores sensibles a los metales pesados, como los de la familia MerR, que detectan Hg y Pb y algunos de la familia ArsR-SmtB que pueden detectar As y Cd. Tres de estas familias de reguladores están constituidas por un único miembro. También existen múltiples sistemas de dos componentes implicados en el control de la homeostasis de metales (Waldron & Robinson, 2009). Las proteínas de las familias ArsR-SmtB, MerR, CsoR y CopY y TetR están implicados en la resistencia a metales y regulan la expresión de genes de detoxificación, almacenamiento y exporte. En general, la unión del ligando a estas proteínas suprime su capacidad de unirse al DNA con la consecuente desrepresión de los genes que están bajo su control. Los miembros de las familias Fur, DtxR, MarR y NikR, por el contrario reprimen generalmente la expresión de los importadores de metales en respuesta a concentraciones demasiado altas de estos (Waldron & Robinson, 2009), (Kloosterman et al, 2007), (Braz et al, 2010), (Reyes-Caballero et al, 2010), (Llull et al, 2011), (Hantke, 2001), (Brown et al, 2003), (Osman & Cavet, 2010), (San Francisco et al, 1990), (Huckle et al, 1993). En bacterias, no son sólo proteínas citoplasmáticas las que detectan metales. *Synechocytis* sp. PCC 6803 por ejemplo posee un sistema de dos componentes, CopRS, que detecta cobre en el periplasma y en el lumen tilacoidal y participa en la resistencia a este metal (Giner-Lamia et al, 2012). La detección del metal puede implicar también elementos no proteicos. En *B. subtilis* por ejemplo se ha descrito un mecanismo de detección de Mg que implica la unión de este metal a un riboswitch situado en el mRNA que cifra el transportador de magnesio MgtE (Dann et al, 2007).

1.3.3.2 Familia Fur de reguladores dependientes de metales

La familia Fur, que debe su nombre a la proteína Fur (*Ferric uptake regulador*), está compuesta por reguladores de la transcripción ampliamente distribuidos en las bacterias. Pese a mostrar una elevada similitud estructural y de secuencia, sus miembros se han especializado en la respuesta específica a diferentes metales de transición como Fe, Zn, Ni y Mn (Fur, Zur, Nur y Mur, respectivamente) o a otros estímulos como los grupos

Introducción

hemo (Irr) o el estrés oxidativo (PerR) (Lee & Helmann, 2007). La unión del ligando determina el tránsito de una conformación inactiva a una conformación activa capaz de unirse al DNA (Lee & Helmann, 2007). En *E. coli*, Fur regula la homeostasis de hierro principalmente reprimiendo la expresión de los genes implicados en el transporte y almacenamiento de este metal. En algunos casos puede estimular la expresión de un gen, bien actuando como activador, o de forma indirecta mediante la represión de un RNA antisentido (Masse & Gottesman, 2002). Cuando se encuentra en una conformación activa, Fur se une específicamente a secuencias palindrómicas de DNA denominadas cajas Fur, cuya longitud mínima es de 15 bp (7-1-7) (Baichoo & Helmann, 2002). La unión de Fur a estas secuencias interfiere el acceso de la RNA polimerasa a los promotores reprimiendo su transcripción.

1.3.3.3. Reguladores de la familia FUR en cianobacterias

Como en otros sistemas, también en cianobacterias Fur es un regulador implicado en la homeostasis de hierro aunque se ha propuesto que en *Anabaena* sp. PCC 7120 Fur (FurA) puede funcionar también como regulador global de la transcripción, implicado en la regulación de genes relacionados con fotosíntesis, integridad del filamento, morfología celular y síntesis de tetrapirroles (Hernandez et al, 2002; Hernandez et al, 2006a). Además se ha planteado la posibilidad de que FurA pueda actuar también como sensor de grupo hemo al igual que PerR en otras bacterias (Lostao et al, 2010). FurA es codificado por el gen esencial *all1691* (*furA*) cuya expresión es constitutiva y aumenta levemente en presencia de Fe^{2+} (Hernandez et al, 2006b). La expresión de FurA se regula a nivel transcripcional mediante la autorepresión de su propio mRNA y también a nivel post-transcripcional por un RNA antisense (α -*furA* RNA) que abarca también el gen *alr1690*, contiguo a *furA* (Hernandez et al, 2006), (Barnett et al, 2012). La regulación por RNA antisense está conservada también en las cianobacterias unicelulares *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 (Sevilla et al, 2011). Las secuencias de unión de Fur en *Anabaena* no muestran un alto grado de conservación y guardan poca similitud (Barnett et al, 2012) con las secuencias descritas en otras bacterias (Hernandez et al, 2006a) y se ha propuesto además que la elección de los sitios de unión de FurA sea dictada por determinadas estructuras del DNA más que por secuencias definidas (Gonzalez et al, 2011). A diferencia de otras proteínas Fur caracterizadas, FurA de *Anabaena* PCC 7119 no contiene un metal estructural y no

Introducción

necesita metales divalentes para unirse al DNA *in vitro* (Hernandez et al, 2002). Sin embargo parece que la presencia de Mn^{2+} y DTT facilita la formación de complejos entre FurA y el DNA (Hernandez et al, 2006a). En ausencia de agentes reductores, FurA tiene tendencia a formar oligómeros mediante la formación de puentes disulfuros, lo cual afecta negativamente a su capacidad de unirse al DNA (Lostao et al, 2010) El genoma de *Anabaena* 7120 contiene además de *furA* otros dos genes homólogos, denominados *furB* y *furC*. La expresión de los tres genes *fur*, en particular la de *furB* y *furC*, se activa en condiciones de estrés oxidativo, en las que se ha propuesto que FurB se une inespecíficamente al DNA funcionando como protección de los daños potenciales de los radicales libres (Lopez-Gomollon et al, 2009).

1.3.3.4 Zur

Zur responde a las variaciones de la disponibilidad de zinc en el citoplasma de bacterias y regula una gran variedad de genes, entre los que se incluyen los genes implicados en la absorción del zinc. Al igual que Fur, Zur se une como dímero a secuencias de DNA palindrómicas llamadas cajas Zur situadas en las regiones promotoras de los genes regulados (Lee & Helmann, 2007). Generalmente los palíndromos están formados por dos secuencias invertidas separadas por un nucleótido, excepto en *Neisseria meningitidis*, en la que se ha descrito una secuencia de tipo 6-N₃-6 (Pawlik et al, 2012). La longitud de la secuencia de unión puede variar ligeramente dependiendo del organismo. En *Mycobacterium tuberculosis* y *Corynebacterium glutamicum* es de 21 bp (10-1-10) (Maciag et al, 2007), (Schroder et al, 2010), en *Bacillus subtilis* y *Yersinia pestis* es de 19 bp (9-1-9) (Gabriel et al, 2008), (Li et al, 2009) mientras que en *Streptomyces coelicolor* es de 15 bp (7-1-7) (Shin et al, 2011). Generalmente Zur funciona como represor de la transcripción porque sus secuencias diana solapan parcial o totalmente con las secuencias promotoras, de modo que la unión de Zur bloquea el acceso de la RNA polimerasa (Lee & Helmann, 2007). Sin embargo se ha descrito que en *Xanthomonas campestris* y *Neisseria meningitidis* Zur puede funcionar como activador de la transcripción (Huang et al, 2008), (Pawlik et al, 2012). Cada monómero de Zur está constituido por un dominio N terminal de unión al DNA y un dominio C terminal implicado en la dimerización, unidos por un lazo que funciona de bisagra. La unión de zinc al sitio de detección del metal induce una reorientación relativa de los dos dominios de manera que en el dímero, los dominios N terminales de cada monómero

Introducción

adoptan una orientación óptima para la unión al DNA (Lucarelli et al, 2007), (Shin et al, 2011), (Ma et al, 2011). De las tres estructuras de Zur publicadas hasta la fecha (las de las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicor* y *Bacillus subtilis*) (Lucarelli et al, 2007), (Shin et al, 2011), (Ma et al, 2011) resulta evidente que Zur contiene dos sitios de unión al metal y se ha postulado la existencia de un tercero (Fig. 1.18). El sitio 1 es un sitio estructural compuesto por 4 cisteínas que está conservado entre los tres organismos. El sitio 2 parece ser el responsable de la detección del metal y de la posterior activación de Zur como represor. La función del tercer átomo de zinc es objeto de debate. Shin y colaboradores proponen que mientras el sitio 2 funciona como el interruptor que activa o desactiva la unión de Zur al DNA, el sitio 3 modularía la actividad de Zur, facilitando su unión a los promotores menos sensibles (Shin et al, 2011). Lucarelli y colaboradores, aunque advierten que la unión de zinc al sitio 3 podría ser un artefacto de la cristalización, no descartan que éste pueda ser un posible sitio estructural o regulatorio (Lucarelli et al, 2007). Ma y colaboradores no observan unión de zinc al sitio 3 pero afirman que los residuos que lo componen son esenciales para la estabilidad del dímero. Además observan que Zur puede encontrarse en tres formas: un dímero inactivo con los dos átomos de Zn estructurales ($Zur_2:Zn_2$), un dímero asimétrico parcialmente activo ($Zur_2:Zn_3$), y un dímero completamente activo ($Zur_2:Zn_4$). Aunque este modelo es totalmente distinto al propuesto por Shin y colaboradores, coincide con aquél en que la unión secuencial de zinc implica que Zur no funciona simplemente de una manera “ON/OFF”, sino que puede responder gradualmente a una vasta gama de concentraciones de zinc (Ma et al, 2011). Zur se descubrió simultáneamente en *E. coli* y *B. subtilis* (Patzner & Hantke, 1998), (Gaballa & Helmann, 1998) donde reprime la expresión del transportador de zinc ZnuABC y su homólogo en *Bacillus* (Patzner & Hantke, 2000), (Gaballa et al, 2002). Análisis posteriores han descrito los regulones Zur de diferentes bacterias, lo que ha permitido comprender el papel de Zur en la regulación de la homeostasis del zinc. En general, Zur se ocupa de mantener baja la concentración citoplasmática de zinc reprimiendo la expresión de los importadores de este metal, principalmente los de tipo ABC situados en la membrana plasmática. En *Neisseria meningitidis* se ha descrito que Zur regula también la expresión de sistemas de transporte situados en la membrana externa, como los receptores dependientes de la proteína TonB (Pawlik et al, 2012). Zur también regula otros procesos metabólicos: reduciendo las necesidades de zinc de la célula mediante la sustitución de enzimas dependientes de zinc por isoformas independientes

Introducción

de zinc y liberando el metal de sitios de almacenamiento como las proteínas ribosómicas que contienen el motivo de unión de zinc CXXC. En *B. subtilis*, por ejemplo Zur reprime el operón *ycaA* que cifra un parálogo (YciA) independiente de zinc de la proteína FolE y una posible metalochaperona (YciC). En condiciones de deficiencia de zinc YciA se desreprime y sustituye FolE en la biosíntesis de folato (Gaballa et al, 2002). En varias bacterias como *B. subtilis*, *Yersinia pestis* y *Mycobacterium tuberculosis*, Zur reprime la expresión de proteínas ribosómicas alternativas. En condiciones de limitación de zinc se desreprime la expresión de estas proteínas que sustituyen en el ribosoma a sus homólogas portadoras de zinc, lo que libera el metal contenido en ellas para su utilización en otros procesos (Akanuma et al, 2006), (Gabriel & Helmann, 2009), (Li et al, 2009), (Maciag et al, 2007).

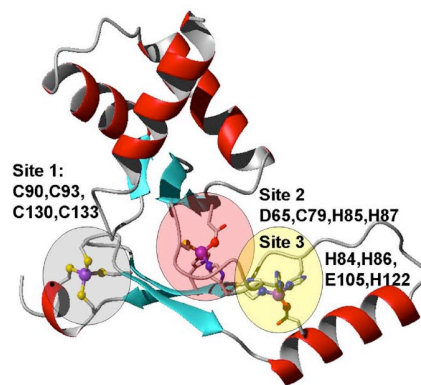


Figura 1.18 Estructura del represor Zur de *Streptomyces coelicor* (Shin et al, 2011). Numero de acceso PDB=3MWM). Adaptado de (Barnett et al, 2012).

Introducción

1.4 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis ha sido aportar datos que ayuden a comprender la conservación de genes *thrS* duplicados en genomas de cianobacterias durante miles de millones de años de evolución. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la funcionalidad de ambos genes
2. Estudiar la regulación de *thrS1* y *thrS2*
3. Analizar la estructura cuaternaria de estas proteínas
4. Integrar esta información y deducir el funcionamiento del sistema formado por los productos de *thrS1* y *thrS2*

Algunos de los resultados que se presentan en esta tesis ha sido publicados en los artículos que se citan a continuación:

Napolitano, M., Rubio, M.A., Santamaría-Gómez, J., Olmedo-Verd, E., Robinson, N.J., Luque, I. (2012) Characterization of the response to zinc-deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 *J. Bacteriol.* 194: 2426–2436. (doi:10.1128/JB.00090-12)

Ver también comentarios publicados sobre este artículo:

Dietrich H. Nies (2012) Zinc-starvation response in a cyanobacterium revealed. *J. Bacteriol.* 194: 2407–2412.

Journal Highlights. Microbe 2012 Vol 7 No 6 Pg 278

Napolitano, M., Rubio, M.A., Camargo, S., Luque, I. (2013) Regulation of internal promoters in a zinc-responsive operon is influenced by transcription from upstream promoters. *J Bacteriol.* 195: 1285-1293. (doi: 10.1128/JB.01488

2. Materiales y Métodos

2.1 Organismos y condiciones de cultivo

2.1.1 Cianobacterias

2.1.1.1 Estirpes de cianobacterias utilizadas

El organismo objeto de estudio de este trabajo ha sido la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120 (también conocida como *Nostoc* 7120), perteneciente a la Sección IV de la clasificación taxonómica de R. Rippka (Rippka et al, 1979).

Durante el desarrollo de esta tesis se han generado estirpes mutantes derivadas de *Anabaena* sp. PCC 7120, que se describen en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Estirpes mutantes derivadas de *Anabaena* sp PCC 7120 generadas en este trabajo.

<i>Estirpe</i>	<i>Características relevantes</i>	<i>Resistencia a antibióticos</i>
MN 8	Cassette C.S3 integrada en el gen <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>)	Strep., Spec.
MN 31	Strep-tag fusionada al extremo 5' del gen <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>)	Ninguna
MN 38	Delección de la ORF <i>all2473</i> (<i>furB</i>) sustituido por la inserción de la cassette C.S3	Strep. Spec.
MN 42	Delección de la ORF <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>)	Ninguna
MN 43	Delección de la ORF <i>all4722</i>	Ninguna
MN 52	Promotor Nir fusionado al extremo 5' del gen <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>)	Ninguna

2.1.1.2 Medios y condiciones de cultivo

Las cianobacterias se cultivaban en condiciones axénicas en medio BG11 (Rippka et al, 1979). Este medio está compuesto por Na₂CO₃ 0,2 mM, MgSO₄ 0,3 mM, CaCl₂ 0,24 mM, K₂HPO₄ 0,2 mM, ácido cítrico 28,5 μM, citrato férrico amónico (17% Fe) 6 mg · l⁻¹, Na₂-EDTA 2,4 μM, H₃BO₃ 46 μM, MnCl₂ 9,1 μM, Na₂MoO₄ 1,6 μM, ZnSO₄ 0,8 μM, CuSO₄ 0,3 μM y CoCl₂ 0,2 μM. El medio se preparaba a partir de un concentrado 100x que carecía de K₂HPO₄ y de fuente de nitrógeno. Como fuente de nitrógeno se usaba NaNO₃ a concentración final 17.5 mM o NH₄Cl a concentración final 7.5 mM. NH₄Cl se tamponaba con TES-NaOH (pH7.5). K₂HPO₄ y NaNO₃ se añadían antes de esterilizar el medio, mientras que las disoluciones de NH₄Cl y TES se esterilizaban por filtración y se añadían al medio ya esterilizado. Los cultivos se incubaban en una

Materiales y Métodos

cámara termostatzada a 30°C en matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad (conteniendo 50 ml de medio) o 50 ml (conteniendo 25 ml de medio), con agitación continua (100 rpm) e iluminación en su parte superior con luz blanca ($75 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$). Cuando se gaseaban, los cultivos se incubaban en botellas de 900 ml (conteniendo hasta 700 ml de medio), o bien en tubos de 100 ml (conteniendo hasta 80 ml) o en tubos de 70 ml (conteniendo hasta 40 ml de medio). El gaseo consistía en burbujear los cultivos con una mezcla de aire y CO₂ (1% v/v), y requería la adición al medio de NaHCO₃ a concentración final 10 mM. Cuando se requerían antibióticos en el medio de cultivo, estos se añadían a una concentración final de: Strep 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Spec 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Nm 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Para los cultivos sólidos en cajas de Petri, al medio se añadía Bacto-Agar (*Laboratorios Difco*) al 1% (p/v), esterilizado en autoclave por separado de los nutrientes y mezclados con los mismos antes del vertido en las cajas. Los cultivos en cajas de Petri se incubaban a 30°C con iluminación superior con luz blanca ($25\text{-}50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las concentraciones de los antibióticos utilizadas en medio sólido eran: Strep 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Spec 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Nm 40–80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.1.1.3 Método de recogida y lavado de células

Las cianobacterias se recogían mediante centrifugación a temperatura ambiente en una centrifuga *Beckman Coulter* modelo *Avanti J-25*, utilizando el rotor JLA 16.250 a 5.000 x g durante 5 minutos, o en una centrifuga *Eppendorf* modelo *5804R* a 4.500 x g durante 5 minutos si se trataba de volúmenes pequeños (hasta 50 ml) o mediante un sistema de filtración por vacío a través de filtros *Millipore HA* de 0.45 μm de diámetro de poro, en caso de grandes volúmenes.

En el caso de aislamiento de RNA, las células se recogían por filtración, se lavaban en el mismo filtro con T₅₀E₁₀₀ (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM), se resuspendían en el mismo tampón, se transferían después a tubos de microcentrifuga y se centrifugaban 1–2 minutos a 16.000 x g. Por último se descartaba el sobrenadante y el pellet se congelaba en N₂ líquido.

Materiales y Métodos

2.1.2 Esherichia coli

2.1.2.1 Estirpes utilizadas

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo, junto con sus características genotípicas relevantes se muestran en la tabla 2.2

Tabla 2.2 Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Referencia
DH5 α	F ⁻ <i>supE44 hsdR17</i> ($r_k^-m_k^+$) <i>recA1 girA96</i> (Nal ^r) <i>endA1 thi-1 relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) (ϕ 80 <i>lacZAM15</i>) U169	(Hanahan, 1983)
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 girA46 thi relA1 lac</i>	(Bullock et al, 1987)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal</i> [dcm][lon] <i>hsdS_B</i> ($r_B^-m_B^-$, una <i>E. coli</i> B) con DE3 (profago λ portador del gen de la RNA polimerasa T7)	(Studier et al, 1990):
IBPC6881(pSGUB4)	<i>thi-1 argE3 DlacX74 mtl-1 xyl-5 tsx-29? rpsL, argG6 his-thrS-SX::Kan [srl-300::Tn10]- recA56 pSGUB4</i>	(Sankaranarayanan et al, 1999)
HB101	F ⁻ <i>hsdS20</i> ($r_B^-m_B^-$) <i>leu supE44 ara14 galk2 lacY1 proA2 rpsL20 xy-5mtl-1 recA13 mcrB</i>	(Boyer & Roulland-Dussoix, 1969)
ED8654	<i>lac-3 o lacY1 supE44 supF58 hsdR514</i> ($r_k^-m_k^-$) <i>recA56 mcrA1 metB1 lacY galk2 galT22 trp55</i>	(Murray et al, 1977)

2.1.2.2 Medios y condiciones de cultivo

Las estirpes de *E. coli* se cultivaban en medio rico LB (Luria-Bertani) que se compone de NaCl 10 g·l⁻¹, bactotripton 10 g·l⁻¹ y extracto de levadura 5 g·l⁻¹ (Sambrook & Russell, 2001). Para la preparación de medio sólido se añadía agar a una concentración del 1.5% (p/v). El medio se esterilizaba en autoclave. En los experimentos de sobreexpresión de proteínas, las estirpes XL1-Blue y BL21(DE3) se cultivaban en medio LB suplementado con 2% de glucosa para minimizar la expresión basal de los genes que se quería sobreexpresar. Para los cultivos a pequeña escala en medio líquido se utilizaban tubos de 10 ml de capacidad con 3 ml de medio, o tubos de 30 ml de capacidad con 10 ml de medio. Para cultivos más grandes se utilizaban matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad (conteniendo 50 ml de medio) o de 1L de capacidad (conteniendo 250 ml de medio). Los cultivos se incubaban en agitadores orbitales (200 rpm) a 30 ó 37 °C. Los cultivos en medio sólido se realizaban en cajas de Petri y se incubaban a 30 ó 37°C. Cuando era necesario, los cultivos se suplementaban con antibióticos a las concentraciones finales siguientes: Ap 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Km 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Cm 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Strep 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y Spec 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Materiales y Métodos

2.1.1.3 Método de recogida y lavado de células

Para la recogida de volúmenes inferiores o iguales a 1.5 ml se centrifugaban las suspensiones celulares en una microcentrífuga *Eppendorf 5415D* a 16.000 x g durante 0.5 min. Para volúmenes de 1.5 a 50 ml las células se recogían por centrifugación en una centrífuga *Eppendorf 5804R* a 5.000 x g durante 5 min, y para volúmenes superiores a 50 ml se utilizaba la centrífuga *Beckman Coulter Avanti J-25* con el rotor JLA 16.250 (8.000 x g 5–10 min) o el rotor JA 25.50 (40.000 x g, 30 min).

2.2 Métodos de manipulación y Análisis de DNA

2.2.1 Plásmidos utilizados

2.2.1.1 Plásmidos no generados en este trabajo

Los plásmidos utilizados pero no generados en este trabajo, junto con una breve descripción se muestran en la tabla 2.3.

Tabla 2.3 Plásmidos no generados en este trabajo.

Plásmido	Resistencia a antibióticos	Descripción	Referencia
pBluescript SK+	Ap	Vector para la clonación de fragmentos de DNA mediante complementación alfa	Stratagene
pCi6	Ap	Fragmento de DNA que contiene las cajas -10 y -35 del promotor de <i>all4721</i> , clonado en pBS377-1(BamHI/XhoI).	(Napolitano et al, 2013)
pET28b	Km	Vector de expresión que contiene un promotor dependiente de la RNA polimerasa del fago T7. Contiene un secuencia que cifra 6 histidinas contiguas que se puede fusionar a una secuencia de interés	Novagen
pMBL-T	Ap	Vector para la clonación de fragmentos de DNA generados mediante PCR	Dominion
pPROEX-HTb	Ap	Vector de expresión que contiene el promotor <i>trc</i> inducible por IPTG	Invitrogen
pRL171	Ap	Vector de selección positiva con sitios de clonación simétricos	(Elhai & Wolk, 1988a)
pRL278	Km	Vector movilizable por conjugación. Contiene el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> que se puede contraseleccionar en presencia de sacarosa. Este plásmido no se replica en <i>Anabaena</i> y se utiliza fundamentalmente para la introducción de fragmentos de DNA a <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 por	(Black et al, 1993)

Materiales y Métodos

		conjugación y selección de exconjugantes que hayan incorporado en el genoma un fragmento de interés por doble recombinación, de modo que la región del vector que contiene el gen contraseleccionable <i>sacB</i> se escinde y se pierde.	
pRL443	Ap Tc	Plásmido conjugativo de amplio espectro, derivado de RP4, capaz de movilizar plásmidos derivados de ColE1.	(Elhai & Wolk, 1988a)
pRL453		Vector para la selección positiva con sitios de clonación simétricos.	(Elhai & Wolk, 1988a)
pRL623	Cm	Vector derivado de ColK, portador de los genes <i>mob</i> y los genes de las metilasas de sitios <i>AvaI</i> , <i>AvaII</i> y <i>AvaIII</i> .	(Elhai et al, 1997)
pSB377_1	Ap	Plásmido que contiene los genes testigo <i>luxCDABE</i> de <i>Photorhabdus luminescens</i> sin promotor.	(Winson et al, 1998a)
pSpark	Ap	Vector de clonación de fragmentos de PCR	Canvax
pSGUB4	Cm	Vector de expresión que contiene el gen <i>thrS</i> de <i>Escherichia coli</i> bajo el promotor <i>trc</i> inducible por IPTG, y el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> .	(Sankaranarayanan et al, 1999)
pTrc99A	Ap	Vector de expresión que contiene el promotor <i>trc</i> inducible por IPTG	(Kahn et al, 1979)

2.2.1.2 Plásmidos construidos en este trabajo

Para la realización de este trabajo se construyeron varios plásmidos que se describen en la tabla 2.4.

Tabla 2.4 Plásmidos generados durante este trabajo.

Plásmido	Resistencia a antibióticos	Descripción
pCMN1	Km	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 1.8 Kb, que incluye el gen <i>thrS2</i> (<i>all4723</i>) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado entre los sitios NdeI y XhoI del vector pET28b (Novagen). Este plásmido expresa ThrRS2 con una cola N-terminal de hexahistidina.
pCMN2	Km	Plásmido que contiene un fragmento de 1.8 Kb, que incluye el gen <i>thrS1</i> (<i>alr0335</i>) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado entre los sitios NdeI y XhoI del vector pET28b (Novagen). Este plásmido expresa ThrRS1 con una cola N-terminal de hexahistidina.
pCMN4	Km, Str, Spec	Plásmido derivado de pCMN1 en el que se ha clonado en el sitio Hind III la cassette de resistencia a antibióticos C.S3, escindida del vector pRL453 mediante digestión con HindIII, C.S3 tiene la misma orientación a la de <i>thrS2</i> .

Materiales y Métodos

pCMN6	Km, Str, Spec	Plásmido derivado de pCMN1 en el que se ha clonado en el sitio EcoRI, la cassette de resistencia a antibióticos C.S3, escindida del vector pRL453 mediante digestión con EcoRI. C.S3 tiene orientación opuesta a la de <i>thrS1</i> .
pCMN8	Km, Str, Spec	Plásmido que contiene un fragmento de DNA Bgl II/XhoI que contiene el gen <i>thrS2</i> (all4723) de <i>Anabaena</i> 7120 interrumpido por la cassette de resistencia a antibióticos C.S3, escindido de pCMN4 y clonado en el vector pRL278 digerido con BamHI y XhoI.
pCMN10	Km, Str, Spec	Plásmido que contiene un fragmento de DNA Bgl II/XhoI que contiene el gen <i>thrS1</i> (<i>alr0335</i>) de <i>Anabaena</i> 7120 interrumpido por la cassette de resistencia a antibióticos C.S3, escindido de pCMN6 y clonado en el vector pRL278 digerido con BamHI y XhoI.
pCMN11	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA BamHI/HindIII que contiene el gen <i>trnT</i> -CGU (tRNA ^{Thr} _{CGT}) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el vector pPROEX digerido con BamHI y Hind III.
pCMN12	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA BamHI/HindIII que contiene el gen <i>trnT</i> -GGU (tRNA ^{Thr} _{GGT}) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el vector pPROEX digerido con BamHI y Hind III
pCMN13	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA BamHI/HindIII que contiene el gen <i>trnT</i> -UGU (tRNA ^{Thr} _{TGT}) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el vector pPROEX digerido con BamHI y Hind III
pCMN14	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA BamHI/HindIII que contiene el gen <i>trnT</i> -UGU2 (tRNA ^{Thr} _{TGT2}) de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en el vector pPROEX digerido con BamHI y Hind III
pCMN15	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA NcoI/XhoI que contiene el gen <i>thrs1</i> de <i>Anabaena</i> 7120 escindido del plásmido pCMN2 y clonado en el vector pTrc99A digerido con NcoI/SalI.
pCMN16	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA NcoI/XhoI que contiene el gen <i>thrs2</i> de <i>Anabaena</i> 7120 escindido del plásmido pCMN1 y clonado en el vector pTrc99A digerido con NcoI/SalI.
pCMN17	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA EcoRI/SalI que contiene el gen <i>thrS</i> de <i>E. coli</i> , amplificado por PCR a partir del DNA genómico y clonado en el vector pTrc99A digerido con EcoRI/SalI.
pCMN18	Ap	Gen <i>trnT</i> -CGU de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en pCMN15 digerido con PstI. El gen <i>trnT</i> -CGU se encuentra detrás y en la misma orientación que el gen <i>thrS1</i> .
pCMN19	Ap	Gen <i>trnT</i> -CGU de <i>Anabaena</i> 7120 clonado en pCMN16 digerido con PstI. El gen <i>trnT</i> -CGU y en la misma orientación que el gen <i>thrS2</i> y comparte con este la misma orientación
pCMN20	Km	Plásmido derivado de pCMN1 en el que se ha sustituido la secuencia que cifra una cola de histidinas por una secuencia que cifra una cola StrepTag II. Este plásmido expresa ThrRS2 fusionada con una secuencia StrepTag II en el extremo N-terminal.
pCMN21	Km	Plásmido derivado de pCMN2 en el que se ha sustituido la secuencia que cifra una cola de histidinas por una secuencia que cifra una cola StrepTag II. Esta plásmido expresa ThrRS1 fusionada con una secuencia StrepTag II en el extremo N-terminal.
pCMN28b	Km	Plásmido derivado de pET28b en el que se ha sustituido la secuencia que cifra una cola de histidinas por una secuencia que cifra una cola StrepTag II. Dicha secuencia se encuentre entre los sitios NdeI y NcoI.
pCMN22	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 1261 bp comprendido entre las ORF <i>all4726</i> y <i>all4725</i> de <i>Anabaena</i> 7120, amplificado por

Materiales y Métodos

		PCR y clonado en pMBL-T (EcoRV).
pCMN23	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 655 bp comprendido entre las ORF <i>all4725</i> y <i>all4724</i> de <i>Anabaena</i> 7120, amplificado por PCR y clonado en pMBL-T (EcoRV).
pCMN24	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 693 bp comprendido entre las ORF <i>all4724</i> y <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>) de <i>Anabaena</i> 7120, amplificado por PCR y clonado en pMBL-T (EcoRV).
pCMN25	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 978 bp comprendido entre las ORF <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>) y <i>all4722</i> de <i>Anabaena</i> 7120, amplificado por PCR y clonado en pMBL-T (EcoRV).
pCMN26	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 994 bp comprendido entre las ORF <i>all4722</i> y <i>all4721</i> de <i>Anabaena</i> 7120, amplificado por PCR y clonado en pMBL-T (EcoRV).
pCMN29	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de 1592 bp que abarca la región C-terminal de <i>all4724</i> y la región N-terminal de <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>) de <i>Anabaena</i> 7120, clonado en pBluescript SK+ (BamHI/XhoI).
pCMN30	Km	Plásmido que contiene un fragmento de PCR (BglII/AvrII) de 2.1 Kb correspondiente a la secuencia de <i>his-thrS2</i> , clonado en pCMN21 (BglII-XbaI).
pCMN31	Km	Plásmido que contiene un fragmento de DNA de aproximadamente 1.5 Kb clonado en pRL278 (XhoI-BamHI). Dicho fragmento está constituido por la región C-terminal de <i>all4724</i> (~773 bp), la región intergenica comprendida entre <i>all4724</i> y <i>all4723</i> (~113 bp), la secuencia codificante la StrepTag II (66 bp) y la región N-terminal de <i>all4723</i> (~540 bp).
pCMN32	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de PCR de 3.5 kb que contiene la parte C-terminal de <i>all4724</i> , <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>) y la porción N terminal de <i>all4722</i> , clonado en pBluescript SK+ (BamHI/XhoI).
pCMN33	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de PCR de 2.5 kb ,que contiene la parte C-terminal de <i>all4723</i> , <i>all 4722</i> y la porción N terminal de <i>all4721</i> , clonado en pBluescript SK+ (BamHI/XhoI).
pCMN34	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de PCR de 1.8 kb que contiene la región C-terminal de <i>alr2472</i> , <i>all2473</i> (<i>furB</i>), <i>alr2474</i> y la región N-terminal de <i>alr2475</i> , clonado en pBluescript SK+ (XhoI/BamHI).
pCMN36	Ap Strep Spec	Plásmido obtenido a partir de pCMN34 después de haber eliminado la ORF <i>all2473</i> y haber clonado en su lugar la cassette C.S3. Esta comparte la misma orientación de <i>all2473</i> .
pCMN38	Km Strep Spec	Plásmido que contiene un fragmento de restricción (XhoI/SacI) escindido de pCMN36 y clonado en pRL278 (XhoI/SacI) .
pCMN39	Km Strep Spec	Plásmido obtenido clonando en pRL278 (XhoI-SacI) un fragmento de restricción (XhoI –SacI) procedente del pCMN37.
pCMN40	Ap	Plásmido obtenido a partir del pCMN33 delecionando mediante PCR con oligonucleótidos divergentes la ORF <i>all4722</i> .
pCMN41	Ap	Plásmido obtenido a partir del pCMN32 después de haber eliminado la ORF <i>all4723</i> (<i>thrS2</i>) mediante PCR con cebadores divergentes.
pCMN42	Km	Plásmido que contiene un fragmento de restricción de 1.7 kb (XhoI/BamHI) escindido de pCMN41 y clonado en pRL278 (BamHI/XhoI). Dicho fragmento contiene la región C-terminal de <i>all4724</i> y la región N-terminal de <i>all4722</i> .
pCMN43	Km	Plásmido que contiene un fragmento de restricción de 1.3 kb (XhoI-BamHI) escindido de pCMN40 y clonado en pRL278 (BamHI/XhoI).

Materiales y Métodos

		Dicho fragmento contiene la región C terminal de <i>all4723</i> y la región N terminal de <i>all4721</i> .
pCMN44	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de 400 bp obtenido por 5'RACE utilizando el primer All 4721-1R, y clonado en pMBL-T.
pCMN45	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de alrededor de 400 bp obtenido por 5'RACE utilizando el primer All 4725-3R y clonado en pMBL-T.
pCMN46	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de alrededor de 600 bp obtenido por 5'RACE utilizando el primer All 4727-5R y clonado en pMBL-T.
pCMN47	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de alrededor de 500 bp obtenido por 5'RACE utilizando el primer All 4722-5R y clonado en pMBL-T.
pCMN49	Km	Plásmido derivado de pCMN20 en el que se ha sustituido el promotor de T7 por un fragmento que contiene el promotor <i>nirA</i> de <i>Anabaena</i> 7120 obtenido por PCR. El inserto se clonó en BglII/NcoI.
pCMN52	Km	Plásmido que contiene un fragmento de alrededor de 2 Kb (BglII/XhoI) compuesto por el promotor de <i>nirA</i> seguido de la fusión StrepTag II:: <i>thrS2</i> , escindido de pCMN49 y clonado en pRL278 (BamHI/XhoI).
pCMN53	Ap	Plásmido que contiene un fragmento de 115 bp que incluye las cajas -10 y -35 del promotor de <i>all4722</i> , clonado en pBS377-1(BamHI/XhoI).

2.2.2 Aislamiento de DNA

2.2.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico de *E.coli*

Para el aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizaba un método basado en la lisis alcalina de las células (Sambrook & Russell, 2001). Las células contenidas en 3 ml de cultivo se recogían mediante centrifugación (16.000 x g, 0,5 min) en tubos de microcentrifuga y el pellet se resuspendía con el vórtex en 100 µl de solución I fría (Tris-HCl 25 mM, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM [pH 8]). A continuación se añadían 200 µl de solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1% [p/v]) recién preparada y se agitaba brevemente para provocar la lisis celular. Las muestras se neutralizaban posteriormente con 150 µl de solución III fría (acetato potásico 5,2 M [pH 4.8]), se homogeneizaba agitando suavemente, se incubaba en hielo durante 5 min y se centrifugaba (16.000 x g, 15 min, 4°C). El sobrenadante obtenido se transfería a un tubo nuevo y se sometía a una extracción con fenol:cloroformo (1:1, [v/v]) y luego a otra extracción con cloroformo, separándose las fases mediante centrifugación (16.000 x g, 2 min). El DNA se precipitaba con 2 volúmenes de etanol absoluto. Tras centrifugar las muestras (16.000 x g, 15 min, 4°C), el precipitado se lavaba con etanol 70% (v/v), se secaba y se resuspendía en 25 µl de TE (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], EDTA 1 mM) suplementado con RNasa A a concentración 20 ng/µl.

Materiales y Métodos

Para el aislamiento de DNA plasmídico de alta calidad, utilizado para la secuenciación, se empleaba el sistema comercial *NucleoSpin Plasmid* (Macherey Nagel).

2.2.2.2 Aislamiento de DNA total de *E. coli*

Un cultivo de 3 ml de *E. coli* en fase estacionaria se recogía por centrifugación (16.000 x g, 1 min) en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml. El pellet se resuspendía en 400 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], EDTA 1 mM) suplementado con 40 µl de SDS 10% y 20 µl de proteinasa K 20 µg·µl⁻¹. La suspensión celular se mezclaba por inversión y se incubaba a 55°C durante 30 min. Posteriormente el DNA se extraía con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1, [v/v]). Tras centrifugar la mezcla a 16.000 x g durante 5 min, la fase acuosa se transfería a tubos nuevos y se repetía la extracción con fenol:cloroformo (1:1, [v/v]). El DNA se precipitaba añadiendo 1 volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato sódico 3M (pH5.2) y centrifugando durante 15 min a 16.000 x g y 4°C. El precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba y se resuspendía en 150 µl T_{1/10}E (Tris-HCl 1 mM [pH 8.0], EDTA 1 mM) suplementado con RNasa A 50 µg/ml.

2.2.2.3 Aislamiento de DNA total de *Cyanobacterias*

El DNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de las estirpes mutantes derivadas de ésta se aislaba siguiendo un método descrito por Cai y Wolk, (Cai & Wolk, 1990). Células procedentes de 25-50 ml de cultivo se recogían por centrifugación y se congelaban en N₂ líquido tras la eliminación del sobrenadante. El precipitado celular congelado se machacaba en un mortero enfriado con N₂ líquido añadiendo 100-150 µl de perlas de vidrio de 100 µm de diámetro. El polvo resultante se recogía en tubos de microcentrifuga de 2 ml y se resuspendía en 8 volúmenes de TE + 0,5% SDS. Luego mezclaba por agitación vigorosa con un volumen de fenol y las fases se separaban mediante centrifugación (16.000 x g, 5 min). Se realizaban tantas extracciones con fenol cuantas fuesen necesarias hasta que desapareciera de la pigmentación. La fase acuosa de la última extracción con fenol se extraía posteriormente con cloroformo. Los ácidos nucleicos de la fase acuosa se precipitaban mediante la adición de 2 volúmenes de etanol frío y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2). Tras centrifugar las muestras (16.000 x g, 15 min, 4°C), el precipitado se lavaba con etanol 70% (v/v), se

Materiales y Métodos

secaba al aire y se resuspendía en 30 μ l de tampón TE suplementado con RNasa A (20 ng/ μ l).

2.2.3 Determinación de la concentración de DNA

La concentración de DNA de las muestras se determinaba por comparación con muestras de concentración conocida. Para ello alícuotas de la muestra problema, así como diluciones de la misma, se sometían a electroforesis en gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio, utilizando como patrón de tamaño cantidades conocidas del marcador comercial “*Gene RulerTM 1KB*” (*Fermentas*).

En algunas ocasiones la concentración de un fragmento de DNA se ha determinado espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro NanoDrop modelo *ND-1000*.

2.2.4 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Para separar fragmentos de DNA se realizaban electroforesis en geles de agarosa (Sambrook & Russell, 2001) de concentración comprendida entre 0.6% y 1.2% (p/v) preparados en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM [pH 8]) al que se añadía bromuro de etidio a concentración de 1 mg·ml⁻¹. Las muestras se suplementaban con 1/6 de volumen de tampón de carga 6x (glicerol 50% [p/v], azul de bromofenol 0,4% [p/v], xilenocianol FF 0,4% [p/v]) antes de cargar. La electroforesis se llevaba a cabo en aparatos horizontales *Apollo Instruments* modelos 75.710 y 75.1214 en tampón TBE a 100 voltios. Para determinar el tamaño de los fragmentos de DNA se utilizaba el marcador comercial de peso molecular *Gene RulerTM* (*Fermentas*). El DNA se visualizaba utilizando un transiluminador de luz ultravioleta.

2.2.5 Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA que habían sido sometidos a electroforesis se extraían de los geles de agarosa mediante la utilización del juego de reactivos *IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*GE Healthcare*). La purificación de fragmentos de DNA en disolución o en geles de agarosa se realizaba mediante la unión específica del

Materiales y Métodos

DNA a las columnas comerciales con matriz de fibra de vidrio siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.2.6 Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se realizaba en un aparato termociclador *MJ MINI Personal Thermal Cycler (Bio-Rad)*. La reacción se llevaba a cabo en un volumen final de 20 a 50 μ l, en una mezcla que contenía: 1–10 ng de DNA molde, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μ M de cada cebador y la DNA polimerasa con su tampón correspondiente. El resultado de la amplificación se analizaba mediante electroforesis en geles de agarosa según se describe en el apartado 2.2.4. El programa utilizado constaba de 25-35 ciclos de: desnaturalización durante 10-30 segundos a 94°C o 98°C dependiendo de la DNA polimerasa utilizada, apareamiento durante 30 segundos a temperatura variable que dependía de los cebadores que se utilizaban y de una extensión a 72°C durante un tiempo variable que dependía del tamaño del amplicón y de la velocidad de la DNA polimerasa que se utilizaba. El programa de ciclos iba precedido de una desnaturalización durante 0,5-4 minutos y terminaba con una extensión final a 72°C durante 5-10 minutos.

Tabla 2.5 Descripción de las DNA polimerasas utilizadas en este trabajo.

<i>Dna Polimerasa</i>	<i>Unidades/Reacción</i>	<i>Tampón (1x)</i>	<i>Tiempo de extensión</i>
BioTaq (Bioline)	1	(NH ₄) ₂ SO ₄ 16,6 mM, Tris-HCl 67 mM, (pH 8,8), 0,1% Tween-20, MgCl ₂ 1,5-4 mM	45 s/Kb
iProof High Fidelity DNA Polymerase (Biorad)	0,2-0,5	tampón comercial	15-30 s/Kb

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo como cebadores en diferentes reacciones de amplificación, ensayos de EMSA, ensayos de 5'- RACE, experimentos de RT-PCR, reacciones de secuenciación y experimentos de extensión del cebador se describen en la tabla 2.6.

Materiales y Métodos

Tabla 2.6. Descripción de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

<i>Nombre</i>	<i>secuencia (5' – 3')</i>	<i>experimento</i>
ALL4725-GS-1F	CTACAACACAAAATGAACGGCTTCC	EMSA
ALL4725-GS-1R	TAAGACTTCACAAGATTGATAACCATTATCATAATGGAAGCCGTTTCATT	EMSA
ALL4725-GS-2R	TAAGACTTCACAAGATTGATAACCATTGGGGTAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-3R	TAAGACTTCACAAGATTGATAACCAGGATCATAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-4R	TAAGACTTCACAAGATTGATGGCCAGGATCATAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4745-GS-5R	TAAGACTTCACAAGATTGATAACCATTGGCATAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-6R	TAAGACTTCACAAGATTGATAACCATTGGCATAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-7R	TAAGACTTCACAAGATCCATAACCATTATGGTAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-8R	TAAGACTTCACAAGATTGGGAACCATTGGCATAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-9R	TAAGACTTCACAAGATTGATAACTGTTATCATAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-10R	TAAGACTTCACAAGATTGATAATCATTATCATAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-11R	TAAGACTTCACAAGATTGATAACCATTATCAGAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-12R	TAAGACTTCACAAGACTGATAACCATTATCAGAATGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-13R	TAAGACTTCACACCCCTGATAACCATTATCAGGGGGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4725-GS-14R	TAAGACTTCACAAGATTGATAACCATTATCAGGGGGGAAGCCGTTTCATTT	EMSA
ALL4722-GS-1F	AGCGATTAATTTAAATGATCTGACAAATCACTTACGAGAAACTATAATTG	EMSA
ALL4722-GS-1R	TACTTCTTGGCAATTATAGTTTCTC	EMSA
ALL4721-GS-1F	TTTATACACAACCTTAACAATTGTTT	EMSA
ALL4721-GS-1R	AATTGTTTGATTACTTAACACTTCTTAATCATAACCAACAATTGTTAAGT	EMSA
ALL4721-GS-2F	GTTTGGTATGATTAAGAAGTGTTAAGTAATCAAACA	EMSA
ALL4721-GS-2R	CTGAATTGTTTGATTACTTAACACTTCTTAATCATAAC	EMSA
ALL4723-GS-1F	TTCCCAATCCGCCCTTTTTCGCT	EMSA
ALL4723-GS-1R	CCATATTAATAAATAATGAGAATCGTTATCATGTTAGCGCAAAAAGGGGC	EMSA

Materiales y Métodos

ALL4723-GS-2R	CCATATTAATAAATAATGAGAATCGTTGGGGTGTAGCGCAAAAAGGGGC	EMSA
ALR3495-R	TAAGACTTCACGTTTTTGATAAAGGTTATCATTATTGGAAGCCGTTTCATT	EMSA
ALL3515-R	TAAGACTTCACACTCCGATAATGATTATCATAATCGGAAGCCGTTTCATT	EMSA
ALR4028-AR	TAAGACTTCACCAGTGTGATAATAATAATCATTATCGGAAGCCGTTTCATT	EMSA
ALR4028-BR	TAAGACTTCACTGTTTAGATAATGATTATTATTATCGGAAGCCGTTTCATT	EMSA
ALL4726-2F	CTACCTTTAGCATCCCGCTTG	EMSA Sonda para northern blots
ALL4726-1R	CAAATAGTGCTGCTGCGCCAAGC	EMSA 5' RACE
ALR5287-1F	CTAGTTCCAACGGTTCCAATC	RT-PCR
ALR5287-1R	GCTGGTTGATGACGAATCAAG	RT-PCR
ALR4380-1F	CACCGCCCTCGTCGTTTGC	RT-PCR
ALR4380-1R	GGTAACCAACGAGCAGCATC	RT-PCR
2473DEL-1F	CTGCATCACTCGAGAGAACCG	construcción Δ Zur pCMN34
2473DEL-1R	TGGTGCGGATCCAAATTCG	construcción Δ Zur pCMN34
2473DEL-2F	TCAATAGCCGAACTACTGACC	construcción Δ Zur pCMN36
2473DEL-2R	AGACTATTATTTAAATTTGCCACTGG	construcción Δ Zur pCMN36
ALL2473-4R	CTAAATTTCACTCGCGTGA	caracterización Δ Zur
ALL2474-1R	GTATCCCATTTGCAGGAGACC	caracterización Δ Zur
pRL278-1F	CGCCTTCTATGAAAGGTTGG	caracterización Δ Zur y otros mutantes
CS3SEC-1F	GCGAGGGCTTTACTAAGCTG	secuenciación

Materiales y Métodos

		mutantes C.S3
CS3SEC-1R	CTTGGCACCCAGCCTGCG	secuenciación mutantes C.S3
ALL4722-1F	ATGAATACCCTAACCGCAGA	Sonda para northern blots
ALL4722-2R	GGTCATGGTCGTGTTTCATGG	Sonda para northern blots RT-PCR - 5' RACE
ALL4724-1F	GACTTAGCTATTGTTGGCGC	Sonda para northern blots
ALL4724-1R	TGGGGACGCAGATGATGAGG	Sonda para northern blots RT-PCR - 5' RACE
ALL4726-2R	GTGCTGCCAATACCTAGTTCA	Sonda para northern blots
ALL4721-1F	ATGACTTTATCGATTTCGTC	Sonda para northern blots
ALL4721-1R	AATCAATACCATCTCATTGGC	Sonda para northern blots RT-PCR – 5' RACE
A7120THRS2-1F	TTTATTCATATGGTCAGTTCCTTAAC	Sonda para northern blots construcción pCMN1
A7120THRS2-1R	CGTATATTCAACTCGAGCAATCTGC	Sonda para northern blots construcción pCMN1
ALL4725-1F	AAGTCATATGTCAGTTGAAAAT	Sonda para northern blots
ALL4725-1R	GCCCTCGAGGTCTAAAGCAAC	Sonda para northern

Materialles y Métodos

		blots RT_PCR
ALL4727-1F	ATGGACATTCTAATTGTTGAG	Sonda para northern blots
ALL4727-1R	GCGGAAATTACAGGAGAGTCT	Sonda para northern blots RT-PCR
ALL1092-1F	GTTAAGATGTATTGCTGCGG	Sonda para northern blots
ALL1092-1R	GCGGTAATGTGCCTGCAAG	Sonda para northern blots
ALR1093-1F	CGATAATTCTCAACCAATGG	Sonda para northern blots
ALR1093-1R	GATATTGAGGTGAAACCATCG	Sonda para northern blots
ALL0258-1F	GATTGCGGCAAGCTTGCGACG	Sonda para northern blots
ALL0258-1R	CACGGTGAGGTTTCGAGTAG	Sonda para northern blots
7120isiA-1	CGCTTCGCCAATCTCTCTG	Sonda para northern blots
7120isiA-2	AACCTGAGTTGTTGCGTCG	Sonda para northern blots
RNPB7120-QPCR 1F	AGGGAGAGAGTAGGCGTTG	Sonda para northern blots
RNPB7120-QPCR 1R	TGGGTATGGGGATTAGG	Sonda para northern blots
all4721-2R	AATTAGCATTGTGTCGTACC	RT-PCR – 5' RACE
A7120THRS2-3R	CCCAGCGCACAAGTCCCACC	RT-PCR – 5' RACE
ALL4722-2F	GTCTGATAGGCCGTTTGATG	RT-PCR

Material es y Métodos

A7120THRS2-3F	CCCGTGGTTGGTGTCGTAGG	RT-PCR
ALL4724-2F	GCCAACAGCACGCAACTTATC	RT-PCR
A7120THRS2-2R	GTTTAACTGAGCGATTTCGG	RT-PCR – 5' RACE
ALL4725-2F	CATCAAGTCCAGCAAGCTACCC	RT-PCR
ALL4726-1F	CTCCGGTGGCACAGGTATTGGC	RT-PCR
ALL4725-2R	CAGTGTTCAGTCCGACGCAACCG	RT-PCR
ALL4727-3R	GGGATTGGTTGGGATCAGGTTC	RT-PCR
ALL4728-1F	CATTGCCACCCCTACTGTCTTG	RT-PCR
ALL4727-2R	CCATCGCGGCTAGTCCGACAG	RT-PCR
ALL4722-2F	CTGGGCGAGTGTGGAACCGTA	RT-PCR
ALL4729-2F	GTCTTGTTAGCGGTGATGGT	RT-PCR
ALL4727-4R	TACAACACGCTCATCACC	5' RACE
ALL4727-5R	TCTAAAGCTTCTGGTTGATGG	5' RACE
ALL4726-3R	TGTGCGTAGTTCATGAGTC	5' RACE
ALL4725-4R	CTACGTCAGTGATCACAAC	5' RACE
ALL4725-3R	GTTGTAGCTTTCTGCACCGATG	5' RACE
ALL4724-2R	GTATGGTGTCTGAATCTCG	5' RACE
ALL4724-3R	CTAAAGGAATGACTCGC	5' RACE
ALL4724-4R	GGGAAATAACTCATGAGGACG	5' RACE
ALL4722-3R	ATGTTTCGTGAGCATCTTCTGC	5' RACE
ALL4722-6R	CAGACACTAACA ACTGGCTATC	5' RACE
ALL4722-7R	CTGAAGTAGCCAAGTCTG	5' RACE
ALL4722-5R	TAATCGATGCGTTCTTCTCG	5' RACE
ALL4722-4R	TACGACTGTCAGGATTGAG	5' RACE
THRS2-5R	GCTGATTGGACAATCGAAGTC	5' RACE
THRS2-6R	GCGGGTGATGGTTTCTTCTGG	5' RACE

Material es y Métodos

THRS2-7R	GGGGCTTGCTTTCATCGC	5' RACE
THRS2-8R	GATTCTGGTGTGCTGGTG	5' RACE
Bensing DNA	GGTATTGCGGTACCCTTGT	5' RACE
Bensing RNA	CUAGUACUCCGGUAUUGCGGUACCCUUGUACGCCUGUUUUUAUA	5' RACE
CS-3	TTCACAAAACGGTTTACAAGC	caracterización mutantes C.S3
A7120S1KO-AR	CGGCTTTGTTCCAAACTTCAT	caracterización mutantes C.S3
A7120S2KO-AR	GTAACGAATACTCGCGCCTTTGG	caracterización mutantes C.S3
A7120S1KO-F	TACCAATGCGCTTGGCTGAGT	caracterización mutantes C.S3
A7120S2KO-F	CATTGCCGGTGCATATTGGC	caracterización mutantes C.S3
NIR-1F	CTCTATTAGATCTACGCATTAATACG	construcción pCMN52
NIR-2F	ACCAAGATCTTAGCTACTCATTAG	construcción pCMN52
pET28b-1F	GTAGAGGATCGAGATCTCG	caracterización y secuenciación
A7120thrS2-4R	GCAATCTGCTCTAGAATTTTG	construcción pCMN31 y pCMN42
24STREP-1F	GTAGCGCTCGAGGTCAAATC	construcción Δ thrS2
24DEL-1R	ATTAATAAATAATGAGAATCGTTATCAT	construcción Δ thrS2
22DEL-1F	TTTACAAATACAAAATCCTTAAGCAG	construcción Δ thrS2
22DEL-1R	TGGCTAGGATCCTCATGATTATG	construcción Δ thrS2
23STREP-2R	GCCAATAGGATCCGGCAATGTTT	construcción pCMN31
pRL278 +-1R	CCTCTTCATCGGGAATGCG	caracterización - secuenciación

Material es y Métodos

ALL2473-3F	CATTAACAAGGCATTTCTGC	secuenciación furB
ALL2473 -2R	GCTAGGCTGTAGAGAGCTTCG	secuenciación furB
A7120THRS1-1F	GTCACCTTCGCATATGGTTCAGCAGC	pCMN2, nort. blot
A7120THRS1-1R	GAGTTTCTCGACCTGGGTCATAC	pCMN2, nort. blot
A7120CGU-1F	GTTCAGGATCCAAACGCTTTTTTGG	clon. tRNA ^{thr} _{CGU}
A7120CGU-1R	CTTTAGATAAGCTTTATAAATAGCCTCT	clon. tRNA ^{thr} _{CGU}
M13-Reverse	GAGGAAACAGCTATGAC	caracterización - secuenciación
M13-Universal	GTAAAACGACGGCCAGT	caracterización - secuenciación
A7120CGU-2F	CGGCTCCATTTTCATAAAAATCATAT	clonación tRNA ^{thr} _{CGU} (pCMN11)
A7120CGU-2R	GAAAATGGAGCCGATGATGGGATTTG	clonación tRNA ^{thr} _{CGU} (pCMN11)
STREPTAG-1F	CATGGCAAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAGGGTGCACCTGAAGTCC TCTTTCAGGGACCCCA	linker strep (pCMN28b)
STREPTAG-1R	TATGGGGTCCCTGAAAGAGGACTTCAAGTGCACCCTTTCGAACTGCGGGT GGCTCCAGCTTGC	linker strep (pCMN28b)
THRSECOLI-1F	GCAAATAAGAATTCAAAAATGCCTG	construcción pCMN17
THRSECOLI-1R	GACCTGTCGACCGAACTTCCTGGG	construcción pCMN17
4722LUX-1F	GTAAGAACTCGAGCAAATGGTG	clonación P _{all4722} (pCMN53)
4722LUX-1R	CTGCTTAAGGATCCTGTATTG	clonación P _{all4722} (pCMN53)
ALL4723-10R	GAAATAACTTCTGTACTGCCA	PRIMER EXTENSION
ALL4722-10RBIS	GTTGTTTCTGCGGTTAG	PRIMER EXTENSION

Materiales y Métodos

ALL4721-3R	ATAAAGTCATGTTATTTTCG	PRIMER EXTENSION
ALL4725-5R	AAATCATCCACTGTCAGG	PRIMER EXTENSION
ALL4721-3F	CATACTCGAGCTAAGAACCAATTGG	clonación P _{all4721}
ALL4721-4R	GTAGGGATCCTGAGTTAGTTAATAG	clonación P _{all4721}

2.2.7 Secuenciación del DNA

Para la secuenciación rutinaria de fragmentos de DNA las muestras se enviaban al servicio de secuenciación de la empresa Secugen S.L. Para otros fines se utilizaba el método descrito por Sanger (Sanger et al, 1977) basado en la parada aleatoria de la reacción de polimerización por incorporación de didesoxiribonucleótidos (ddNTPs) como se describe a continuación: El DNA (6-8 µg) se desnaturalizaba en presencia de NaOH 0,2 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. El NaOH se eliminaba mediante filtración en columnas de *Sephadex G-25*. Las reacciones de secuenciación se llevaban a cabo usando el conjunto de reactivos llamado *SequenaseTM Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizaba una reacción de elongación a partir de un oligonucleótido que apareaba con una zona adyacente al fragmento de DNA que se deseaba secuenciar. A continuación, la mezcla de reacción correspondiente se dividía en cuatro partes iguales a cada una de las cuales se añadía uno de los cuatro ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) para detener la elongación. El marcaje radiactivo se realizaba con [α -³⁵S]-thio dATP (1000 Ci·mmol⁻¹) (*Perkin Elmer*). El producto de la reacción se analizaba mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (Sambrook & Russell, 2001). Estos se preparaban al 6% (p/v) de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 30:1) en tampón TBE 1x conteniendo urea 40.5% y se polimerizaban con persulfato amónico al 0.062% (p/v), usando como catalizador de la polimerización TEMED 0.1% (v/v). Se empleaba un aparato de electroforesis marca *Owl (modelo ADJ-2)* conectado a una fuente de alimentación *Hofer DC Power Supply PS 3000 (Hofer Scientific Instruments)*. La electroforesis se llevaba a cabo durante 90–120 minutos con una potencia de 50 W y una temperatura de 50-60°C. Terminada la electroforesis el gel se transfería a un papel Whatman 3MM y se

Materiales y Métodos

secaba al vacío durante 2 horas a 80°C en un secador de geles *Bio-Rad modelo 583*. La detección de las señales radiactivas se realizaba según se describe en el apartado 2.3.7.

2.2.8 Tratamientos enzimáticos del DNA

2.2.8.1 Digestión del DNA con endonucleasas de restricción.

Las endonucleasas de restricción empleadas eran proporcionadas por *New England Biolabs* y *Fermentas* y se utilizaban según las instrucciones del fabricante correspondiente. Como sustrato para las reacciones de restricción se utilizaban plásmidos o productos de PCR. Las reacciones se llevaban a cabo a la temperatura recomendada (generalmente 37°C) durante un tiempo variable (3-16 horas). Cuando se utilizaban las endonucleasas de restricción denominadas “*Fast Digest*” (*Fermentas*) las reacciones se llevaban a cabo durante un tiempo comprendido entre 5 minutos y 1 hora.

2.2.8.2 Defosforilación del DNA

En algunas clonaciones, con el fin de evitar la religación del vector, se procedía a la eliminación del grupo fosfato de los extremos 5' mediante la utilización de la fosfatasa alcalina de camarón ártico (SAP) (*Roche*). Tras la reacción de restricción, el vector se incubaba a 37°C durante 30 min con 1 unidad de SAP, según las instrucciones del fabricante. Después de la primera incubación se añadía otra unidad de enzima y se incubaba 30 min a 37°C. La reacción se detenía inactivando la enzima a 70°C durante 15 min. La preparación obtenida se sometía a electroforesis en gel de agarosa y el plásmido lineal se purificaba como se describe en el apartado 2.2.5.

2.2.8.3 Relleno de extremos 3' recesivos

Para obtener extremos romos en fragmentos de DNA que habían sido digerido con enzimas de restricción que dejan extremos 3' recesivos, se realizaban tratamientos de relleno con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (*Fermentas*). La reacción de relleno se realizaba tras la restricción incubando el DNA durante 1 h a 37°C en tampón Tris-HCl 50 mM (pH7,5), MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, BSA 50 µg·ml⁻¹ con 2 U de enzima Klenow. La mezcla de reacción se suplementaba con los dNTPs correspondientes a una concentración final de 0,05 mM. La reacción se detenía mediante incubación a 65°C durante 10 min.

2.2.8.4 Ligación del DNA

Para ligar diferentes fragmentos de DNA se empleaba la ligasa del bacteriófago T4 proporcionada por *Dominion MLB*. La reacción se llevaba a cabo en un volumen de 10-20 μl a una temperatura de 22°C durante 1-12 horas. Las moléculas producidas se utilizaban para transformar o electroporar células de *E. coli*.

2.2.8.5 Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA

Durante este trabajo se han utilizado tres métodos diferentes de marcaje de DNA, dependiendo de la utilización final del DNA marcado.

A. Marcaje uniforme de fragmentos de DNA de doble cadena. Para ello se utilizaba el conjunto de reactivos denominado “*Ready to go DNA Labelling Beads*” (*GE-Healthcare*) basado en la extensión a partir de oligonucleótidos de secuencia casual. La mezcla de reacción comercial se proporciona liofilizada y contiene dATP, dGTP, dTTP, 4-8 U de enzima Klenow y una mezcla de oligodesoxirribonucleótidos de secuencia aleatoria. 50 ng de DNA desnaturalizado se incubaban 1 h a 37°C con la mezcla de reacción, una vez que ésta había sido rehidratada y resuspendida, y 25 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (3.000 $\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) (*Perkin-Elmer*). Los fragmentos de DNA marcados de esta forma se utilizaban como sondas radiactivas en análisis de Northern blot.

B. Marcaje de extremos 3' recesivos. 0,5–1 μg del fragmento de DNA que se deseaba marcar se incubaba durante 1h a 37°C con 2 U de la enzima Klenow (*Fermentas*), 10 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3.000 $\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) (*Perkin-Elmer*) y 0,05 mM de los otros tres dNTPs (dATP, dGTP y dTTP) en el tampón recomendado por el fabricante. Los fragmentos de DNA marcados de esta forma se utilizaban en ensayos de EMSA.

C. Marcaje de oligonucleótidos en el extremo 5'. Se utilizaban 25 pmol de oligonucleótido y 30 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (3.000 $\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) (*Perkin-Elmer*). La reacción se llevaba a cabo durante 1 h a 37°C en presencia de 20 U de la enzima polinucleótido quinasa (PNK) del fago T4 (*Fermentas*), en Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl_2 10 mM, DTT 5 mM y EDTA 0,1 mM. Los oligonucleótidos marcados de esta forma se utilizaban en ensayos de extensión del cebador.

Materiales y Métodos

Los nucleótidos no incorporados en las reacciones de marcaje se eliminaban mediante filtración en columnas de Sephadex G-25 (*Sigma-Aldrich*). La eficiencia del marcaje se estimaba cuantificando la radiactividad de 1 μ l de muestra en un contador de centelleo *Beckmann LS 6000IC* en viales conteniendo 5 ml de líquido de centelleo *EcoLite™* (*MP Biomedicals*).

2.3 Métodos de manipulación y análisis del RNA

2.3.1 Aislamiento de RNA de cianobacterias

Durante este trabajo se ha utilizado un método de aislamiento de RNA total de cianobacterias que es una modificación del protocolo descrito por Mohamed y Jansson (Mohamed & Jansson, 1989) y que consiste en la rotura de las células con fenol ácido (pH 4,5, *Amresco*) a 65°C. Células de un volumen de 50 ml de cultivo se recogían por filtración (apartado 2.1.1.3), se lavaban con T₅₀E₁₀₀ (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM [pH 8]) y se congelaban en nitrógeno líquido. El precipitado de células se resuspendía en 300 μ l de tampón de resuspensión (sacarosa 0.3 M, acetato sódico 10 mM, [pH 4.5]), 400 μ l tampón de lisis (SDS 2%, acetato sódico 10 mM, [pH 4,5]), 100 μ l de Na₂-EDTA 250 mM (pH 8) y 1 ml de fenol ácido (pH 4,5) (*Amresco*) a 65°C. La resuspensión celular se incubaba a 65°C durante 5 min agitando el contenido cada 2.5 min aproximadamente. Después se centrifugaba 5 min a 16.000 x g y se recuperaba la fase acuosa, que se extraía nuevamente con 1 ml de fenol ácido caliente. Posteriormente se realizaba una extracción con fenol:cloroformo (1:1, [v:v]) y finalmente una extracción con cloroformo. La fase acuosa de esta última extracción se precipitaba con 1 volumen de isopropanol, sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido para facilitar la precipitación. Los ácidos nucleicos se recogían por centrifugación a 16.000 x g durante 30 min a 4°C. Posteriormente se lavaban con etanol 70% (v/v), se secaban al aire y se incubaban 1 hora a 37°C en presencia de 10-20 U de DNasa I (libre de RNasas) (*Roche*) en un volumen final de 200 μ l (180 μ l H₂O-DEPC, 20 μ l tampón comercial de la DNasa I). Tras la incubación con DNasa I se realizaban dos nuevas extracciones con fenol:cloroformo (1:1, [v:v]) y cloroformo. El sobrenadante se precipitaba añadiendo 0,2 volúmenes de LiCl 10M y 2 volúmenes de etanol, y sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido. El RNA se recogía por centrifugación a 16.000 x g durante 30 min a 4°C. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado se lavaba con etanol 70% (v/v), se secaba al aire y se resuspendía en 30 μ l H₂O tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

2.3.2 Sobreexpresión en *Escherichia coli* y purificación de tRNAs^{Thr} de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Anabaena 7120 posee 4 genes *trnT* que cifran tRNAs^{Thr}. Tres genes de localización cromosómica cifran tRNAs con anticodón CGU, GGU y UGU y un gen del plásmido Δ cifra otro tRNA con anticodón UGU. Para sobreexpresar estos tRNAs en *E. coli* se amplificaron por PCR fragmentos de DNA que contenían los genes de los 4 tRNAs y secuencias adyacentes, y se clonaron en el vector de expresión pPROEX-Htb (*Invitrogen*). Salvo en casos excepcionales, en cianobacterias la secuencia CCA del brazo aceptor de los tRNAs no se cifra en el gen sino que es añadida postranscripcionalmente por la acción de una nucleotidil transferasa. El gen *trnT* del plásmido D es uno de estos casos excepcionales. En los otros casos, las secuencias que se clonaron en el plásmido pPROEX-Htb se modificaron para introducir la secuencia CCA en el extremo 3' del gen del modo que se indica en la figura 2.1. Cada secuencia de DNA se sometía a tres amplificaciones por PCR utilizando cada vez distintas combinaciones de oligonucleótidos (Fig. 2.1).

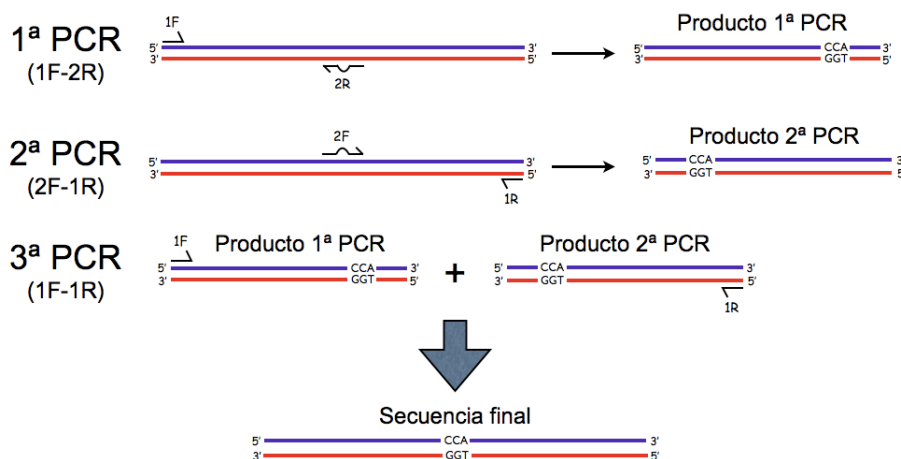


Figura 2.1. Esquema del procedimiento para amplificar las secuencias de DNA portadoras de los genes de los tRNAs^{Thr} e introducir la secuencia CCA en el extremo 3'

Los fragmentos de DNA se secuenciaban para comprobar que no se hubiesen introducido mutaciones en las amplificaciones por PCR. Los plásmidos generados se introducían en *E. coli* XL1-Blue para poder sobreexpresar los tRNA^{Thr} de interés.

2.3.3 Sobreexpresión y purificación de tRNAs

La estirpe que sobreexpresaba el tRNA de interés se inoculaba en 15-25 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y glucosa al 2% (p/v), y se cultivaba toda la noche a 30°C. A continuación se inoculaban 500 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente con 15 ml del cultivo y se cultivaban a 30°C hasta que la DO_{600} alcanzara el valor de 0.5 unidades de absorbancia (4-5 horas aproximadamente). Posteriormente se añadía IPTG a una concentración final de 1mM y se cultivaba a 30°C durante 16 horas. Tras la inducción con IPTG las células se recogían por centrifugación (8.000 x g, 4°C, 10 min) en una centrifuga *Beckman Avanti J-25* utilizando un rotor *JLA 16.250*. Las células se lavaban con 50 mM Tris-HCl pH 7,5 y se resuspendían en 12.5 ml de buffer TL (acetato sódico 0,3 M, EDTA 10 mM, pH 4,3). La suspensión celular se transfería a tubos *Falcon* de 50 ml y se procedía a la extracción de los ácidos nucleicos añadiendo 1 volumen de fenol ácido a pH 4,5 (*Amresco*). La mezcla se agitaba por vaivén durante 20 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaba a 5.000 x g durante 10 min. Tras ello, la fase acuosa se transfería a otro tubo y la fase orgánica se extraía de nuevo añadiendo otros 12.5 ml de buffer TL. Tras una segunda centrifugación se combinaban ambas fases acuosas obteniendo así un volumen final de 25 ml. La fase acuosa se dispensaba en 3 tubos *Corex* (8,3 ml por tubo) y se precipitaban los ácidos nucleicos con 2 volúmenes de etanol absoluto y centrifugando a 8.000 x g durante 30 min a 4°C. Tras la eliminación del sobrenadante se procedía a la desacilación de los tRNAs. Los precipitados se resuspendían en un volumen total de 5 ml de Tris-acetato 200 mM, pH 8,5 y se alicuoteaban en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (0,5 ml por tubo) que se incubaban 1 hora a 37°C. Los ácidos nucleicos de elevado peso molecular se precipitaban añadiendo isopropanol a una concentración final de 30% (v/v) y centrifugando a 4.500 x g durante 15 min a temperatura ambiente. Para precipitar los ácidos nucleicos de bajo peso molecular el sobrenadante se transfería a tubos nuevos, se ajustaba la concentración de isopropanol al 60% (v/v) y se centrifugaba a 4.500 x g durante 25 min a temperatura ambiente. Los precipitados se lavaban con etanol 70% (v/v), se secaban al aire, se resuspendían en H₂O-DEPC y se combinaban en un solo tubo. Antes de su utilización, los tRNAs se sometían a un tratamiento para favorecer su correcto plegamiento que consistía en incubar las preparaciones a 75°C durante 3 min tras lo que se dejaban enfriar lentamente

Materiales y Métodos

hasta los 65°C y luego se incubaban durante 10 min a temperatura ambiente en presencia de MgCl₂ 2 mM.

2.3.4 Determinación de la concentración de RNA

La cuantificación del contenido de RNA en las muestras se realizaba midiendo en el espectrofotómetro la absorbancia a 260 nm (OD₂₆₀) (Sambrook & Russell, 2001). El coeficiente de extinción empleado en este caso era $\epsilon = 0.02 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ (una solución con una OD₂₆₀=1 contiene 40 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). En algunos casos la concentración del RNA se determinaba también mediante la utilización de un espectrofotómetro *Nanodrop* modelo *ND-1000*.

2.3.5 Electroforesis de RNA en geles de agarosa

Los geles para la electroforesis de RNA se preparaban con agarosa al 1% (p/v) en tampón MOPS 1x (MOPS 40 mM, acetato sódico 10 mM, EDTA 1mM [pH 7.2]), y formaldehído al 2% (v/v). Las muestras se preparaban en un volumen final de 20 μl y contenían 10 μg de RNA en un volumen de 5 μl y 15 μl de tampón de carga (Formamida desionizada 60% [v/v], formaldehído 6% [v/v], tampón MOPS 1x, azul de bromofenol 0,25% [p/v], xilenocianol FF 0,25% [p/v], 0,1% bromuro de etidio y glicerol 10% [v/v]). Tras una incubación a 95°C durante 3 min las muestras se enfriaban en hielo, se cargaban en el gel y se sometían a electroforesis a 5 V·cm⁻¹. Para determinar el tamaño del RNA se empleaba el marcador de tamaño comercial *RiborulerTM High Range RNA Ladder* (Fermentas).

2.3.6 Electroforesis de RNA en geles de acrilamida

Los geles se preparaban al 6% (p/v) de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 30:1) en tampón TBE 1x conteniendo urea 7 M y se polimerizaban con persulfato amónico al 0.08% (p/v), usando como catalizador de la polimerización TEMED 0.1% (v/v). La electroforesis se realizaba en tampón TBE 1x (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM [pH 8.0]) en un aparato de electroforesis de la marca *OWL* (modelo *ADJ-2*) y una corriente de 25mA.

Materiales y Métodos

2.3.7 Detección de secuencias de RNA mediante hibridación en filtro con sondas radiactivas (Northern blot)

2.3.7.1 Transferencia de RNA de geles de agarosa a filtros de nailon

Tras la electroforesis del RNA, el gel se sometía a tres lavados con H₂O-milliQ autoclavada durante 5 min cada uno para eliminar las trazas de formaldehído y se equilibraba sumergiéndolo en tampón SSC 10x pH 7.0 (NaCl 1.5 M, Citrato sódico 150 mM) durante 10 min. A continuación el RNA se transfería a un filtro de nailon *GeneScreen Plus* (*Perkin Elmer*) por uno de los procedimientos que se exponen a continuación:

A. Transferencia por vacío. El RNA se transfería a la membrana de nailon mediante la aplicación de vacío durante 1 hora, utilizando un aparato *TransVac TE80* (*GE Healthcare*) utilizando como solución de transferencia NaOH 100 mM.

B. Transferencia por capilaridad. El RNA se transfería a la membrana de nailon por capilaridad manteniendo el gel en contacto con la membrana durante 15 horas. Para llevar a cabo este procedimiento se construía sobre una plataforma situada sobre un recipiente que contenía la solución de transferencia (tampón SSC 10x) una “pirámide de transferencia” constituida por una hoja larga de papel Whatman 3MM que descansa sobre la plataforma y está en contacto con la solución de transferencia. Esta hoja actúa como mecha de capilaridad y encima de ella se disponía por este orden de abajo a arriba, el gel, la membrana de nailon, dos hojas de papel Whatman 3MM del mismo tamaño de la membrana de nailon y varias capas de papel de filtro. Sobre la pirámide se colocaba un peso de aproximadamente 1 Kg. El ascenso por capilaridad del tampón de transferencia arrastraba al RNA del gel depositándolo sobre la superficie de la membrana en contacto con él.

Independientemente del método empleado, la membrana de nailon se incubaba tras la transferencia durante 10 min sobre un papel Whatman 3MM humedecido con NaOH 100 mM, se lavaba brevemente en SSC 2x y se secaba a 80°C durante 1-2 horas.

2.3.7.2 Transferencia de RNA de geles de poliacrilamida a filtros de nailon

Tras la electroforesis el RNA se transfería a un filtro de nailon *Gene Screen Plus* (*Perkin Elmer*) utilizando como tampón de transferencia TBE 1x y el sistema de transferencia “*TE77 Semi-Dry Transfer Unit*” (*GE Healthcare*). Para la transferencia se colocaban sobre el cátodo 4 capas de papel de filtro, 2 capas de papel *Whatman* 3MM, el filtro de nailon, el gel, 2 capas de papel *Whatman* 3MM y 4 capas de papel de filtro. La corriente a la que debía transferirse el gel se calculaba multiplicando el valor de la superficie (en cm²) de éste por un factor de 0,8 mA. La transferencia se realizaba durante 1 hora y posteriormente el filtro de nailon se secaba en una estufa a 80°C durante 30 minutos.

2.3.7.3 Hibridación de RNA con sondas radiactivas

Para la hibridación con sondas radiactivas del RNA fijado a una membrana de nailon, el filtro se incubaba en un horno de hibridación a 65°C durante 2 horas (prehibridación) con una solución de K₂HPO₄ 0,5 M, KH₂PO₄ 0,6 M, SDS 7% y EDTA 1 mM (pH 8). Tras la prehibridación se añadía la sonda marcada radiactivamente (apartado 2.2.8.5.) previamente desnaturalizada a 100°C durante 3 min y se incubaba durante 12-15 horas a 65°C en el horno de hibridación. Tras la hibridación el filtro se sometía a tres lavados de 10 minutos cada uno en el horno a 65°C. Los dos primeros lavados se realizaban con una solución SSC 2x, SDS 0,1%, mientras que el tercero se realizaba con SSC 1x, SDS 0,1 %.

Como control de la cantidad de RNA cargada en cada calle del gel, las membranas se hibridaban con una sonda del gen *rnpB* de *Anabaena* sp. PCC 7120 que cifra el componente RNA de la RNasa P y se expresa constitutivamente.

En algunas ocasiones membranas anteriormente hibridadas con sondas radiactivas se reutilizaban. Para ello la señal radiactiva se eliminaba hirviendo el filtro a 100°C durante 30 min en una solución que contenía 10 mM Tris-HCl pH 7,5-8,0, 1 mM EDTA, 1% SDS (Stripping solution).

2.3.8 Detección de la radiactividad

La detección y el análisis de las áreas radiactivas en las membranas de nailon se realizaba mediante autorradiografía electrónica con el sistema *Cyclone Phospor System* y el programa de análisis de imágenes *Optiquant (Packard)*.

2.3.9 RT-PCR

En los experimentos de RT-PCR se utilizaban 12 µg de RNA de *Anabaena* sp. PCC 7120 para cada oligonucleótido empleado. Tras un tratamiento con DNasa *Turbo (Ambion)* el RNA se resuspendía en H₂O-DEPC y se procedía a la retrotranscripción. En cada reacción, el RNA se mezclaba con 10 pmol de oligonucleótido en presencia del tampón de hibridación (150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA), se calentaba a 85°C durante 10 min para desnaturalizar los ácidos nucleicos y luego se incubaba 1 hora a 50°C para permitir el apareamiento del oligonucleótido. Las reacciones de elongación se llevaban a cabo a 47°C durante 1 hora en un volumen final de 63 µl que contenía la siguiente mezcla: 10 mM DTT, 0,5 mM dNTPs, 50 U de transcriptasa reversa *Superscript II (Invitrogen)*, y 1/5 del volumen del tampón *First strand 5x (Invitrogen)*. Paralelamente se realizaban reacciones control a las cuales no se añadía transcriptasa reversa. Tras la inactivación de la enzima a 70°C durante 15 min se añadían 40 ng de Rnasa A (*Fermentas*) y se incubaba 15 min a 37°C. 1-2 µl de las mezclas de reacción se utilizaban como molde en la reacción posterior de PCR. Cuando fuese necesario, se utilizaban 20 ng de DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 como molde en una reacción paralela de PCR que servía de control positivo. La amplificación por PCR se realizaba como se describe en el apartado 2.2.6. Los productos de amplificación se resolvían por electroforesis en geles de agarosa de diferente dureza.

2.3.10 5' – RACE

La localización de promotores se llevaba a cabo por el procedimiento de 5'-RACE (Rapid Amplification of 5' cDNA Ends) descrito por Bensing (Bensing et al, 1996). 50 µg de RNA aislados a partir de cultivos de *Anabaena* se incubaban a 37°C durante 2 horas en presencia de 20 U de fosfatasa alcalina de tabaco *TAP (Epicentre)* en presencia del tampón aconsejado por la casa comercial. En paralelo se realizaban reacciones

Materiales y Métodos

control que no eran tratadas con *TAP*. Tras la incubación, el RNA se extraía con fenol:cloroformo (1:1, p/v], se precipitaba añadiendo 2 volúmenes de etanol frío y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M PH 5.2, sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido y centrifugando (15 min, 16.000 x g, 4°C). El precipitado de RNA se resuspendía en 10 µl de H₂O-DEPC y el RNA se ligaba durante aproximadamente 16 h con 150 pmol del oligonucleótido de RNA denominado “RNA Bensing” (tabla 2.6) en presencia de 5 µg de BSA, 80 U de la ligasa de RNA del bacteriófago T4 (*Fermentas*) usando el tampón recomendado por el fabricante. Posteriormente, el RNA se volvía a extraer con fenol:cloroformo (1:1, p/v], se precipitaba añadiendo 2 volúmenes de etanol frío y 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M PH 5.2, sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido y finalmente se resuspendía en 60 µl de H₂O-DEPC. Para la reacción de retrotranscripción se utilizaban oligonucleótidos específicos complementarios al mRNA del gen de interés. 7 µg de RNA se incubaba con 10 pmol de cada oligonucleótido en presencia del tampón de hibridación (150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA), durante 10 min a 85°C y durante 1 hora a 50°C para permitir su apareamiento. La elongación se llevaba a cabo a 47°C durante 1h en presencia de 10 mM DTT, 0.25 mM de los dNTPs, 100 U de transcriptasa reversa *Superscript II* (*Invitrogen*) y 1/5 del volumen del tampón First Strand 5x buffer (*Invitrogen*). Tras la elongación, la enzima se inactivaba a 70°C durante 20 min. El cDNA resultante se amplificaba por PCR utilizando un oligonucleótido de DNA cuya secuencia coincide con una porción interna del oligonucleótido de RNA utilizado anteriormente (“RNA-Bensing”) y un oligonucleótido de orientación contraria que alinea aguas arriba del que se había utilizado como cebador para la retrotranscripción. En cada reacción se utilizaban 2 µl de mezcla como molde. Los productos de PCR se resolvían en electroforesis en geles de agarosa y las bandas diferenciales (las que sólo aparecían en las muestras tratadas con *TAP*) se purificaban y secuenciaban como se describe en los apartados 2.2.5 y 2.2.7.

2.3.11 Ensayos de extensión del cebador (*primer extension*)

Los ensayos de extensión del cebador permiten analizar la regulación de promotores previamente identificados por 5’-RACE. Para el ensayo se utilizaban oligonucleótidos específicos marcados en el extremo 5’ con la enzima polinucleótido quinasa (PNK) del bacteriófago T4 (*Fermentas*) y [γ -³²P]-dATP (3.000 Ci·mmol⁻¹) (*Perkin Elmer*) según se describe en el apartado 2.2.8.5. La reacción de apareamiento del oligonucleótido

Materiales y Métodos

marcado con el RNA se realizaba en un volumen final de 15 µl que contenía: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), KCl 150 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), 24 µg de RNA libre de DNA y 2 pmol del oligonucleótido marcado radiactivamente. La mezcla se calentaba a 85°C durante 10 min para desnaturalizar el RNA y luego se incubaba una hora a 50°C para permitir el apareamiento del cebador. A esta mezcla se añadía posteriormente una mezcla de extensión preincubada a 47°C que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), KCl 75 mM, MgCl₂ 3mM, dNTPs 0,25 mM (cada uno), DTT 10 mM y 50-100 U de la transcriptasa reversa *SuperscriptTM II (Invitrogen)*. La reacción de extensión se llevaba a cabo a 47°C durante una hora. En ocasiones se utilizaba la transcriptasa reversa termorresistente *SuperscriptTM III (Invitrogen)*. En estos casos, tanto el apareamiento del cebador como la reacción de extensión se realizaban a 55°C. Tras la elongación, la mezcla de extensión se suplementaba con 100 µl de una mezcla denominada que contenía 0.04 µg de RNasa I libre de DNasas (*Fermentas*) y 0.2 µg de esperma de salmón y se incubaba durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se realizaba una extracción fenol:cloroformo (1:1, [v/v]) y los ácidos nucleicos se precipitaban añadiendo 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5.2) y 2 volúmenes de etanol absoluto y sumergiendo los tubos en nitrógeno líquido. Tras centrifugar 30 min a 16.000 x g a temperatura ambiente, se descartaba el sobrenadante y el precipitado radiactivo se resuspendía en 4 µl de un tampón de carga que contenía: formamida 97,5%, (v/v), xilenocianol FF 0,3% (p/v), azul de bromofenol 0,3% (p/v) y EDTA 10 mM (pH 8,0). Los productos de la reacción se resolvían en un gel de urea-poliacrilamida al 6% paralelamente a reacciones de secuenciación que se habían obtenido con el mismo cebador y que servían como patrón de tamaño (apartado 2.2.7).

2.4 Métodos de purificación y análisis de proteínas

2.4.1 Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad por níquel

A. Preparación del extracto crudo

Para la purificación de His-ThrRS1 e His-ThrRS2 se utilizaba la estirpe BL21(DE3) (tabla 2.2) que tiene integrado en el genoma una copia del gen que cifra la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG. Los genes *alr0335 (thrS1)* y *all4723 (thrS2)* se clonaron en el vector de expresión pET28b

Materiales y Métodos

en la misma orientación que el promotor de T7 de modo que las ORFs se fusionasen en el extremo 5' con la secuencia de una cola de hexahistidina, generando respectivamente los plásmidos pCMN2 y pCMN1. Se partía de cultivos de células de *E.coli* que contenían los plásmidos pCMN2 y pCMN1 en medio LB suplementado con 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Km y 2% (p/v) de glucosa, cultivadas a 37°C durante 10-12 horas. 5 ml de los preinóculos se re-inoculaban en 250 ml de LB conteniendo 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Km. Cuando el cultivo alcanzaba una $\text{DO}_{600} = 0,5-0,7$ se añadía IPTG a una concentración final de 1 mM. Tras 3-4 horas de incubación a 37°C las células se recogían por centrifugación, se lavaban con Tris-HCl 50 mM (pH 7,5-8,0) y el pellet se congelaba a -20°C o bien se resuspendía en 4-5 ml de tampón A (Tris-HCl 40 mM [pH 8,0], NaCl 200 mM, glicerol 10%) si se iba a procesar las muestras directamente. Para obtener el extracto libre de células la suspensión celular se suplementaba con PMSF a una concentración final de 1 mM y a continuación se sometía a sonicación con un sonicador *Branson*, modelo “digital sonifier 250”, durante 1,5 minutos y con una amplitud del 15%. Alternativamente se sometía a dos ciclos de rotura (20.000 psi) en una prensa de French (*SML-AMINCO*). El lisado celular se alicuoteaba en tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se centrifugaba (15-30 min, 16.000 x g, 4°C) en una centrifuga *Hitachi* modelo *Himac CT15RE* para separar la fracción particulada de la fracción soluble. La presencia de la proteína de interés en cada una de estas fracciones se comprobaba mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, apartado 2.4.3.).

B. Cromatografía de afinidad

Las proteínas His-ThrRS1 e His-ThrRS2 se purificaban a partir de fracciones solubles mediante cromatografía de afinidad en una columna de níquel *His-Select™ Cartridge* (*Sigma*) de 1 ml, según las instrucciones del fabricante. El método utilizado consistía en equilibrar la columna con 5 ml de tampón A, inyectar la muestra previamente filtrada con filtros con poros de un radio promedio de 0,25 μm y posteriormente lavar la columna con 15 ml de tampón A. La elución de las proteínas se realizaba utilizando un gradiente de imidazol de 0 M a 1 M, preparado en el tampón A y equilibrado a pH 8,0 con HCl. Las proteínas presentes en las distintas fracciones se visualizaban mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8-12% (apartado 2.4.3) y tinción con azul de Coomassie (apartado 2.4.5).

2.4.2 Purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad por estreptavidina

A. Preparación del extracto crudo

Como para las proteínas fusionadas con una cola de hexahistidina, también para Strep-ThrRS1 y Strep-ThrRS2 se utilizaba la estirpe BL21(DE3). La secuencia codificante de la cola de histidinas en los plásmidos pCMN1 y pCMN2 se sustituyó con una secuencia que cifra un péptido de 8 aminoácidos conocido como StrepTag II, que presenta una alta afinidad para el sitio de unión de la biotina de una proteína estreptavidina modificada, llamada *Strep-Tactin* (IBA). Los plásmidos generados se denominaron pCMN20 y pCMN21, que una vez introducidos en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3) determinaban la sobreexpresión de Strep-ThrRS2 y Strep-ThrRS1, respectivamente. La preparación del extracto libre de células se realizaba de la misma manera que se describe en el apartado anterior con la única diferencia que la temperatura de cultivo era 30°C en lugar de 37°C.

B. Cromatografía de afinidad

Las proteínas Strep-ThrRS1 y Strep-ThrRS2 se purificaban a partir de las fracciones solubles de los correspondientes extractos mediante cromatografía de afinidad en columnas *Streptactin*[®] *Superflow*[®] (IBA BioTAGnology) de 1ml, siguiendo las instrucciones del fabricante. El método utilizado consistía en equilibrar la columna con 2 volúmenes de tampón W (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl), añadir la muestra previamente filtrada y posteriormente lavar la columna con 5 ml de tampón W. La elución de las proteínas se realizaba añadiendo destiobiotina al tampón W a una concentración final de 2,5 mM. La destiobiotina compite con la Strep-tag para el sitio de unión de la biotina. Las proteínas eluidas se visualizaban mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8-12% (apartado 2.4.3) y tinción con azul de Coomassie (apartado 2.4.4).

2.4.3 Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida-SDS

La separación analítica de proteínas en condiciones desnaturizantes mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se llevaba a cabo según el procedimiento de Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando aparatos *Miniprotean II* o *Miniprotean III* (Bio-

Materiales y Métodos

Rad). El gel de separación se preparaba en tampón Tris-HCl 375 mM (pH 8,8) y tenía una concentración de acrilamida:bis-acrilamida (30:0.8) del 8-12%. El gel de empaquetamiento se preparaba en tampón Tris-HCl 125 mM (pH 6,8) y tenía una concentración de acrilamida:bis-acrilamida (30:0.8) del 4%. Ambos geles contenían SDS 0.1% (p/v). Como catalizador de la polimerización se utilizaba persulfato amónico 0.05% y TEMED 0.1%. Antes de ser sometidas a electroforesis, las muestras se mezclaban con 0.25 volúmenes de tampón de carga 4x (Tris-HCl 125mM [pH 6,8], glicerol 20% [v/v], SDS 4% [p/v], 2-mercaptoetanol 10% [v/v] y azul de bromofenol 0,0025% [p/v]) y se incubaban a 100°C durante 3 min. La electroforesis se realizaba a temperatura ambiente con un voltaje constante de 200 V. El tampón de electroforesis contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%, con un pH de 8,3.

Como patrón de tamaño se utilizaba *Page RulerTM Unstained Protein Ladder* (*Fermentas*). Tras la visualización de las proteínas (apartado 2.4.5), los geles se conservaban en ácido acético 10% o se secaban en un secador de geles *Bio-Rad* modelo 583.

2.4.4 Tinción de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida con azul de *Coomassie R-250*

Tras la electroforesis, para visualizar las proteínas, los geles se sumergían en una disolución de azul de *Coomassie R-250* (*Sigma*) 0.5%, ácido acético 10% (v/v) y metanol 40% (v/v) en agua destilada. Tras 30-45 min de tinción los geles se lavaban varias veces con un desteñidor (ácido acético 10% [v/v], metanol 40% [v/v]) y finalmente se fijaban en ácido acético 10% . Las proteínas se visualizaban como bandas de color azul.

2.4.5. Cuantificación del contenido en proteínas de muestras biológicas.

La concentración de proteínas se determinaba según el método descrito por Bradford (Bradford, 1976) usando el reactivo concentrado suministrado por *Bio-Rad*. Las reacciones se incubaban durante 5 min y se medía su absorbancia a 595 nm. Para la estimación del contenido de proteína en función de la absorbancia se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de BSA.

2.4.6 Inmunnodetección de proteínas (*Western blot*)

La inmunodetección de proteínas fusionadas con His-tag y Strep-tag se realizaba con anticuerpos comerciales que reaccionan con estas secuencias tal como se describe a continuación: tras la electroforesis las proteínas se transferían a membranas de PVDF *Hybond P* (*GE Healthcare*) utilizando el sistema de transferencia “*TE77 Semi-Dry Transfer Unit*” (*GE Healthcare*). Para la realización de la transferencia se preparaban para cada gel 6 piezas de papel Whatman 3MM y una membrana de PVDF de las mismas dimensiones del gel a transferir. La membrana se sumergía durante unos segundos en metanol y posteriormente 15 minutos en H₂O milli-Q. Dos hojas de papel Whatman se sumergían en tampón ánodo 1 (Tris 75 mM, metanol 20%, pH 10,4), una hoja se sumergía en tampón ánodo 2 (Tris 6,32 mM, metanol 20%, pH 10,4) y 3 hojas se sumergían en tampón cátodo (SDS 3,46 mM, Tris 6,23 mM, 20% metanol, pH 9,4). Antes de la transferencia la membrana se sumergía brevemente en tampón ánodo 2. Sucesivamente se procedía al montaje de la “pirámide de transferencia” compuesta de abajo a arriba por: dos hojas de papel Whatman humedecidas en tampón ánodo 1, una hoja de papel Whatman humedecida en tampón ánodo 2, la membrana de PVDF, el gel y tres hojas de papel Whatman humedecidas en tampón cátodo. La transferencia se realizaba durante 1 – 1,5 horas con un voltaje constante comprendido entre 4 y 8 voltios y con una intensidad de corriente que se calculaba multiplicando la superficie del gel expresada en cm² por 0,8 mA. La inmunodetección se llevaba a cabo mediante el sistema “*SNAP i.d.*” (*Millipore*), utilizando anticuerpos comerciales anti-His acoplados a la enzima peroxidasa de rábano (*Qiagen*) o anticuerpos comerciales *Strep MAB classic* acoplados a la misma enzima (*IBA BioTAGnology*). El proceso de relevado se realizaba mediante el juego de reactivos “*ECL-Plus*” (*GE Healthcare*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.7 Determinación de la actividad treonil-tRNA sintetasa

La actividad treonil-tRNA sintetasa se determinaba *in vitro* según el procedimiento descrito por Francklyn (Francklyn et al, 2008). La mezcla de reacción contenía: 50 mM Hepes pH 7,5, 25 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 5 mM ATP, 25 μM ¹⁴C-treonina, 5 μM tRNA^{Thr}_(CGU), 0,2 μM de proteína ThrRS. La reacción se incubaba a 30°C. A distintos tiempos, se tomaban alícuotas de 20 μl y la treonina incorporada se

Materiales y Métodos

precipitaba 100 μ l de ácido tricloroacético al 20%, tras lo que se filtraba a través de filtros de 0,45 μ m (*Millipore*). El material precipitado retenido en los filtros se cuantificaba en un contador de centelleo *Beckman*, modelo *LS 6000 IC*.

2.4.8 Cromatografía de exclusión molecular

Para la cromatografía de exclusión molecular se utilizaba una columna *Superdex 200 (S200) Tricorn (GE Healthcare)*, con un rango de separación de 10-600 kDa. La cromatografía se llevaba a cabo en un cromatógrafo FPLC tipo *ÄKTA (Amersham Pharmacia)*, que permite controlar de forma precisa el flujo de solvente, la presión a través de la columna y la cantidad de proteína en cada fracción en función de la absorbancia a 280 nm.

El procedimiento consistía en lavar la columna con 50 ml (2 volúmenes de columna) de agua milli-Q, después equilibrarla con 50 ml de tampón de aminoacilación (50 mM Hepes pH 7.5, 25 mM KCL, 15 mM MgCl₂, 5mM ZnCl₂), inyectar un volumen de muestra de unos 200 μ l conteniendo proteína purificada. Una vez inyectada la muestra, se hacía pasar por la columna un volumen de 50 ml del mismo tampón y se recogían fracciones de 0,3-0,5 ml. El volumen vacío (V_0 , volumen de elución del azul dextrano) era de 8,28 ml mientras que el volumen de elución (V_e) corresponde al volumen en el que eluye la proteína de interés. Para calibrar la columna se sometía a cromatografía una mezcla de proteínas de peso molecular (PM) conocido, a saber: tiroglobulina bovina (670 kDa), γ -globulina bovina (158 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina de caballo (17 kDa), ribonucleasa A (13,5 kDa) y vitamina B12 (1,35 kDa). Representando el coeficiente de distribución (K_{av}), que se define como $K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$ (donde V_t es el volumen total de la columna), de estas proteínas de PM conocido frente al log PM, se obtenía una recta, cuya ecuación permitía estimar el PM de cualquier proteína de interés conociendo el parámetro V_e .

2.5 Análisis de interacción DNA-Proteína

2.5.1 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

Para los ensayos de retardo en gel se realizaron con la proteína recombinante Strep-FurB purificada de un estirpe de *Escherichia coli* que contenía el plásmido pCJS19 según se describe en el apartado 2.4.2. Los fragmentos de DNA usados para los ensayos

Materiales y Métodos

de retardo se obtenían mediante digestión de productos de PCR o mediante el apareamiento de oligonucleótidos parcialmente solapantes (All4725GS-1F y All4725GS-1R; All4723GS-1F y All4723GS-1R; aAll4722GS-1F y All4722GS-1R; All4721GS-1F y All4721GS-1R), y se marcaban con [α - 32 P]-dCTP mediante relleno de los extremos 3' recesivos con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa (*Fermentas*) (apartado 2.2.8.5). El oligonucleótido directo All4725GS-1F y los oligonucleótidos reversos de All4725GS-2R a All4725GS-14R se utilizaron para generar versiones mutantes del sitio de unión de ZUR en el promotor de *all4725*. La incubación de la proteína con el DNA se llevaba a cabo en un volumen final de 15 μ l en una mezcla que contenía 1.5 μ l del tampón de unión 10x (200 mM Tris-HCl [pH 7,8], 500 mM KCl, 10 mM DTT, 50% glicerol, BSA 1 μ g· μ l $^{-1}$, DNA de esperma de salmon 0,05 μ g·ml $^{-1}$), el fragmento de DNA marcado y la proteína purificada en el siguiente tampón: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 20% glicerol (v/v). La cantidad de DNA marcado que se utilizaba en los ensayos oscilaba entre 0.1-0.5 fmol, mientras que la cantidad de proteína variaba de un mínimo de 0.01 pmol a un máximo de 20 pmol. Tras incubar la mezcla durante 15 min a temperatura ambiente se añadía 1,5 μ l de tampón de carga (apartado 2.2.5) y la reacción se resolvía en un gel de poliacrilammida al 4-5% (p/v) (acrilamida:bis-acrilamida, 30:0.38) preparado en tampón Tris-acetato 40 mM pH 8,0. Antes de cargar las muestras el gel se sometía a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora a 4°C en un aparato *MiniProtean* (*Bio-Rad*) y, una vez cargadas las muestras, la intensidad se regulaba a 18 mA por gel. Para visualizar las bandas de DNA radiactivo se utilizaba el sistema *Cyclone storage phosphor system* y el programa de análisis de imágenes *Optiquant* (*Packard*) (apartado 2.3.7).

2.6 Determinación de la concentración de clorofila

La concentración de clorofila *a* de los cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos (Mackinney, 1941). Una suspensión celular de 1 ml contenida en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml se sometía a centrifugación (16.000 x g, 1 min). Tras la eliminación del sobrenadante, al sedimento se añadía 1 ml de metanol y se agitaba durante 1 min con un vórtex. La mezcla obtenida se sometía a otra centrifugación (16.000 x g, 1 min). La concentración de clorofila *a* se estimaba midiendo la A_{665} del sobrenadante, utilizándose un coeficiente de extinción $\epsilon = 74.46 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.7 Procedimientos Genéticos

2.7.1 Transferencia de DNA a *E.coli* mediante transformación

Las células transformables eran proporcionadas por el Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigación Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja), y se preparaban según el método de Hanahan (Hanahan, 1983). El procedimiento consistía en mezclar 100 μl de células previamente descongeladas en hielo con el DNA transformante (10 μl si se trataba de una mezcla de ligación, 1 μl si se trataba de un plásmido purificado). La mezcla se incubaba 15 min en hielo y luego se sometía a un choque térmico mediante incubación a 42°C durante 90 segundos. Tras ello, las células se incubaban en hielo durante 5 min, se les añadía 1 ml de LB estéril y se incubaban a 37°C durante 1 hora en agitación (200 r.p.m.). Finalmente, la mezcla de transformación se sembraba en cajas de Petri conteniendo medio LB sólido y los antibióticos requeridos. Para la selección de transformantes mediante α -complementación las cajas petri se suplementaban también con X-Gal 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Sambrook y Russel, 2001).

2.7.2 Transferencia de DNA a *E. coli* mediante electroporación

Las células electroporables eran proporcionadas por el Servicio de Cultivos Biológicos del Centro de Investigación Científicas Isla de la Cartuja (cicCartuja), o se preparaban en nuestro laboratorio. El procedimiento consistía en mezclar 100 μl de células previamente descongeladas en hielo con el DNA transformante (10 μl si se trataba de una mezcla de ligación, 1 μl si se trataba de un plásmido purificado). La mezcla se pasaba a cuvetas de electroporación de 2 mm de separación entre electodos (*Cell Projects*) enfriadas en hielo y se procedía a la electroporación utilizando un electroporador *Easyject Optima* (*EquiBio*). Posteriormente se añadía 1 ml de LB estéril y se cultivaba a 37°C durante 1 hora. Finalmente la suspensión celular se sembraba en cajas de Petri conteniendo medio LB sólido y los antibióticos requeridos.

2.7.3 Transferencia de DNA a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación

La transferencia de DNA a *Anabaena* sp. PCC 7120 se realizaba según se describe en (Elhai & Wolk, 1988b) mediante conjugación triparental con dos estirpes de *E. coli*,

Materiales y Métodos

HB101 y ED8654. HB101 contiene al plásmido llamado “lanzadera”, que en este trabajo siempre era un plásmido derivado de pRL278 y que portaba el fragmento de DNA que se quería transferir a la cianobacteria y el plásmido auxiliar pRL623 que codificaba para las metilasas de los sitios de restricción *Ava* I, *Ava* II y *Ava* III (Elhai et al, 1997). Estas enzimas protegen el DNA que se va a introducir en *Anabaena* sp. PCC 7120 frente a las endonucleasas de restricción de la cianobacteria. ED8654 porta el plásmido conjugativo pRL443 que contiene los genes para movilizar el DNA. La conjugación se realizaba como sigue: 250 µl de cultivos en fase estacionaria de HB101: pRL623, pCMNx (donde pCMNx es cualquier plásmido lanzadera) y ED8654: pRL443 se inoculaban en 10 ml de LB suplementado con los antibióticos apropiados. Tras 2,5 horas de incubación a 37°C, las células en fase exponencial de crecimiento se recogían por centrifugación, se lavaban 2 veces, primero con 10 ml y luego con 5 ml de LB esteril, y finalmente se resuspendían en un volumen final de aproximadamente 300 µl y se incubaban 2 horas a temperatura ambiente. Tras ello, las células de *E. coli* se mezclaban con una suspensión celular de *Anabaena* sp. PCC 7120 que contenía 10 µg de clorofila en un volumen de 300-500 µl, y la mezcla resultante se sembraba sobre unos filtros de nitrocelulosa (*Immobilon-NC*, *Millipore*) colocados en cajas de petri conteniendo medio BG11 no selectivo (sin antibióticos) suplementado con 5% LB. Las cajas se cultivaban a 30°C a baja intensidad de luz durante 2 horas y luego a una intensidad de 75 µE m⁻² s⁻¹ durante 24 horas. Sucesivamente los filtros se transferían a otras cajas que contenían BG11 no selectivo, se incubaban a 30°C durante 24 horas y luego se transferían a medio selectivo (BG11 suplementado con los antibióticos adecuados). Las colonias resistentes aparecían habitualmente después de 15 días. Puesto que el pRL278 porta el gen de *Bacillus subtilis sacB* que produce letalidad en presencia de sacarosa y el gen de resistencia a Nm, la selección de estirpes dobles recombinantes se realizaba aislando colonias resistentes a sacarosa y sensibles a Nm de la siguiente manera. Se preparaban cultivos líquidos a partir de las colonias exconjugantes que se sometían a sonicación en un baño de ultrasonidos para obtener filamentos cortos de 4-5 células. Tras la ruptura de los filamentos, se sembraban diluciones seriadas en cajas con medio selectivo suplementado con sacarosa 5%. Entre las colonias que resistentes a sacarosa que aparecían en estas cajas era importante diferenciar los dobles recombinantes de recombinantes simples en los que el gen *sacB* era inactivo. Para ello las colonias resistentes a sacarosa se sembraban en cajas con medio selectivo suplementado con Nm para comprobar su sensibilidad a este antibiótico.

2.8 Detección de luminescencia

Para detectar la bioluminescencia de las estirpes de *E.coli* que portaban plásmidos derivados del pSB377_1 (Winson et al, 1998a), que contiene los genes *luxCDABE* de *Photorhabdus luminescens*, se utilizaba un aparato de captación de imágenes *Chem Doc XRS* (Bio-Rad).

2.9 Análisis informáticos de secuencias de DNA Y PROTEÍNAS

Para el manejo rutinario de secuencias de DNA (búsqueda de pautas de lectura abiertas, localización de sitios de restricción, la traducción de secuencias nucleotídicas a secuencias aminoácidas, etc...) se utilizaba el programa “DNA Strider” diseñado por C. Mark (Service de Biochimie, Centre d’Études Nucléaires de Saclay, Francia).

La secuencia del genoma completo de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Kaneko et al, 2001) está disponible en “Cyanobase” (<http://bacteria.kazusa.org.jp/cyanobase/>).

Para la identificación de genes y proteínas homólogas se utilizaba la aplicación BLAST (Altschul et al, 1990). Para el alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoácidas se empleaba el programa CLUSTALW2 (Chenna et al, 2003) proporcionado por el European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).

2.10 Elaboración de árboles filogenéticos

Para la elaboración de los árboles filogenéticos se procedía en primer lugar a la realización de un alineamiento múltiple de secuencias aminoácidas utilizando el programa CLUSTALW2. El archivo generado se modificaba mediante el programa GBlocks (Castresana, 2000) que elimina los residuos que presentan una escasa conservación entre las secuencias. Para la realización del árbol, el alineamiento curado mediante GBlocks se abría con el programa PHYML (Guindon et al, 2010).

Resultados

3. Resultados

Resultados

3.1 Algunos genomas de cianobacterias contienen genes de treonil-tRNA sintetasa duplicados

Al comienzo de esta tesis nuestro grupo publicó un estudio sobre la evolución de las aminoacil-tRNA sintetetasas en el que se puso en evidencia que algunos genomas cianobacterianos contenían dos genes que cifraban posibles ThrRSs. El análisis filogenético de las secuencias de ThrRSs cianobacterianas indicaba que los genes duplicados probablemente se originaron por una duplicación génica que ocurrió de forma temprana en la evolución del phylum las cianobacterias (Luque et al, 2008). Aunque es difícil determinar con precisión cuándo tuvo lugar la duplicación, parece muy probable que ocurriera antes de la divergencia de las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos (grupos IV y V de la clasificación de Ripka), lo que sitúa la duplicación como un evento ocurrido hace más de 2000 millones de años (Tomitani et al, 2006). Entre las especies actuales de cianobacterias encontramos algunas que han conservado los dos genes resultantes de la duplicación, algunas que han perdido uno u otro y otras que han perdido ambos tras adquirir un gen foráneo por transferencia horizontal. En el artículo de Luque *et al.* se describían tres especies que contenían genes *thrS* duplicados, *Cyanothece* sp. CCY0110, *Anabaena variabilis* ATCC 29413 y *Anabaena* sp. PCC 7120. Los genes originados por la duplicación se denominaron *thrS1* y *thrS2* y se diferenciaban en la secuencia de sus posibles productos y en la presencia de tres *indels* (inserciones o deleciones) localizados en sitios específicos (Figura 3.1). El *indel 1* se encuentra en el dominio de edición N2 y aparece como una inserción de 7 a 32 aminoácidos en las ThrRS2 excepto en las de los *Synechococcus* marinos, lo que sugiere que probablemente la inserción ocurrió tras la divergencia de estos. El *indel 2* se encuentra entre los motivos conservados 1 y 2 del dominio catalítico y aparece en ThrRS1 como una inserción de 1 a 6 aminoácidos, mientras que el *indel 3* se encuentra entre los motivos 2 y 3 del dominio catalítico y aparece en ThrRS1 como una inserción de 3-4 aminoácidos. Puesto que las inserciones y deleciones raramente revierten, los *indels* se consideran marcadores evolutivos fiables y permiten clasificar fácilmente cualquier ThrRS cianobacteriana como ThrRS1 o ThrRS2. Actualmente, gracias a la disponibilidad de un número creciente de genomas cianobacterianos secuenciados, el conjunto de especies que contienen genes *thrS* duplicados ha aumentado hasta 32, lo que supone un 28 % de los 115 genomas analizados (Tabla 3.1). En todos los genomas en los que hay dos genes *thrS*, siempre encontramos un gen de

Resultados

cada clase. Algunos genomas cuentan con más de dos genes *thrS*. Por ejemplo, en el genoma de *Arthrospira platensis paraca* aparecen anotados 4 genes *thrS*, dos ThrRS1 y dos ThrRS2, lo que probablemente se debe a un error de la anotación del genoma que actualmente se encuentra en proceso. Hemos comprobado que esta especie cuenta con un gen de cada clase. En *Acaryochloris marina* MBIC11017 y *Anabaena variabilis* ATCC 29413 se encuentran tres genes de tipo *thrS*, pero uno de ellos está truncado y probablemente es un pseudogen. En *Cyanothece* sp. ATCC 51142 y *Cyanothece* sp. ATCC 51472 se observan tres genes *thrS* anotados, uno de ellos es un gen *thrS1* y los otros dos son genes *thrS2*. En este caso los tres genes están completos y podrían ser funcionales.

Tabla 3.1. Especies de cianobacterias cuyos genomas contienen más de un gen *thrS*. En azul se señalan las proteínas tipo ThrRS1, en rojo las de tipo ThrRS2. y en negro los genes truncados. Para la realización de esta tabla se han utilizado las secuencias anotadas como treonil-tRNA sintetasa en la base de datos <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi> a fecha de 15 de Febrero de 2013.

Genoma	Locus tag	Aas
<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017	AM1_B0169	439
	AM1_3055	616
	AM1_1540	606
<i>Acaryochloris</i> sp CCMEE 5410	ACCM5_010100031439	606
	ACCM5_010100015458	616
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Ava_2787	615
	Ava_1947	60
	Ava_B0226	614
<i>Arthrospira maxima</i> CS-328	AmaxDRAFT_3972	604
	AmaxDRAFT_0835	622
<i>Arthrospira platensis</i> C1 (Draft2 circular genome)	SPLC1_S550060	604
	SPLC1_S204740	622
<i>Arthrospira platensis</i> NIES-39	NIES39_O00250	604
	NIES39_A07630	622
<i>Arthrospira platensis</i> Paraca	AplaP_010100025626	102
	AplaP_010100025291	525
	AplaP_010100016508	103
	AplaP_010100015483	508
<i>Arthrospira</i> sp. PCC 8005	APCC8_010100025313	617
	APCC8_010100000712	604

Resultados

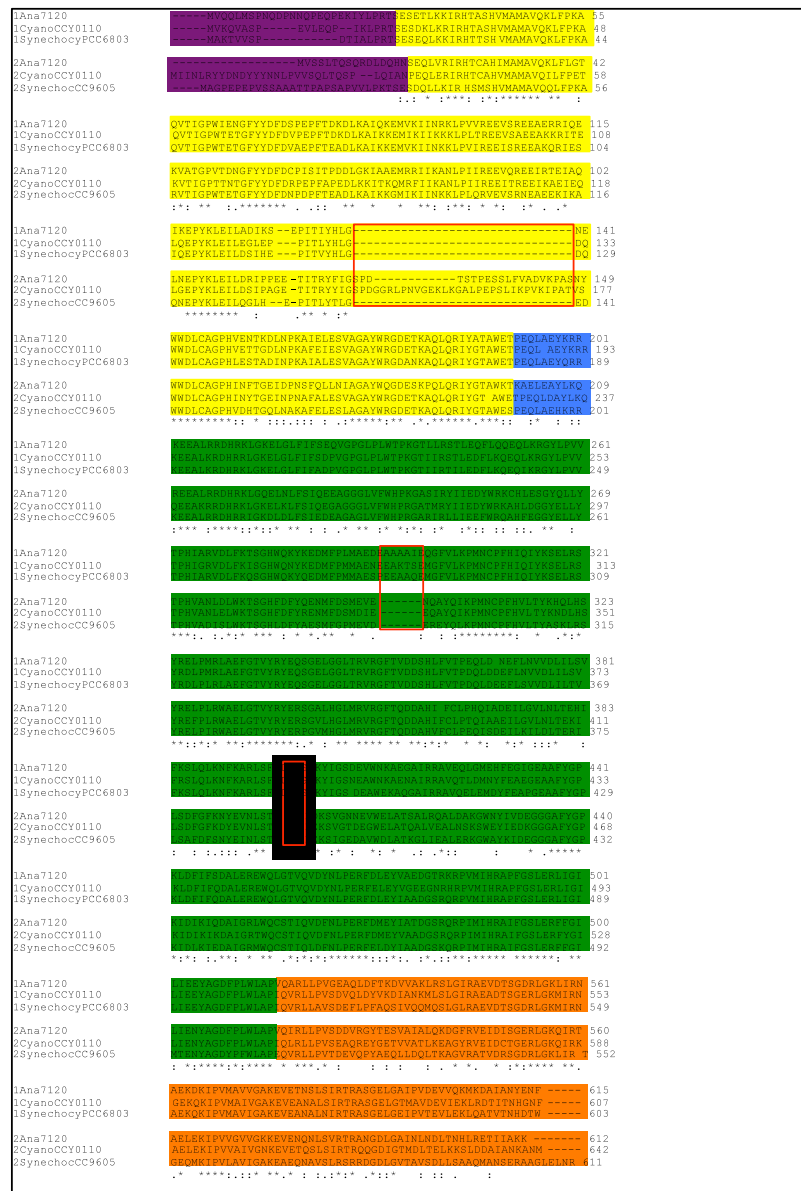
<i>Calothrix</i> sp. PCC 6303	Cal6303_4362	609
	Cal6303_0080	621
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7103	Cal7103DRAFT_00074240	617
	Cal7103DRAFT_00008910	612
<i>Chamaesiphon minutus</i> PCC 6605	Cha6605_5483	602
	Cha6605_0996	121
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. PCC 6712	Chr6712_4421	639
	Chr6712_2431	604
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> PCC 7203	Chro_3782	617
	Chro_1762	618
<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	CwatDRAFT_0093	33
	CwatDRAFT_6125	642
<i>Cyanobacterium stanieri</i> PCC 7202	Cyast_2122	605
	Cyast_0673	615
<i>Cyanothece</i> sp. BH63E, ATCC 51472	Cy51472_4969	642
	Cy51472_2527	637
	Cy51472_0266	608
<i>Cyanothece</i> sp. BH68, ATCC 51142	cce_4835	644
	cce_3947	608
	cce_1495	666
<i>Cyanothece</i> sp. CCY 0110	CY0110_32060	642
	CY0110_25151	607
<i>Dactylococcopsis salina</i> PCC 8305	Dacsa_2983	609
	Dacsa_2642	564
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9431	Fis9431DRAFT_2636	611
	Fis9431DRAFT_1354	202
<i>Fischerella</i> sp. PCC 9605	FIS9605DRAFT_03249	396
	FIS9605DRAFT_02856	610
<i>Geminocystis herdmanii</i> PCC 6308	Syn6308DRAFT_2392	599
	Syn6308DRAFT_0601	608
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 6406	LEP6406DRAFT_4282	623
	LEP6406DRAFT_0349	606
<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375	Lepto7375DRAFT_7077	599
	Lepto7375DRAFT_7006	621
<i>Lyngbya</i> sp. CCY 8106	LY8106_07020	608

Resultados

<i>Lyngbya</i> sp. CCY 8106	L8106_07029	608
	L8106_07024	62
<i>Microcoleus</i> sp. PCC 7113	Mic7113_3034	623
	Mic7113_2784	604
<i>Microcystis aeruginosa</i> NIES-843	MAE_31590	618
	MAE_31430	599
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	all4723	612
	alr0335	615
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7524	Nos7524_1257	613
	Nos7524_0062	615
<i>Oscillatoriales</i> sp. JSC-12	OscopyDRAFT_4279	605
	OscopyDRAFT_0247	100
<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7319	Pleur7313DRAFT_04376	603
	Pleur7313DRAFT_03011	632
<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327	Ple7327_3850	628
	Ple7327_2806	614
<i>Raphidiopsis brookii</i> D9	CRD_02567	224
	CRD_02566	332
<i>Rivularia</i> sp. PCC 7116	Riv7116_2600	615

Resultados

A



B

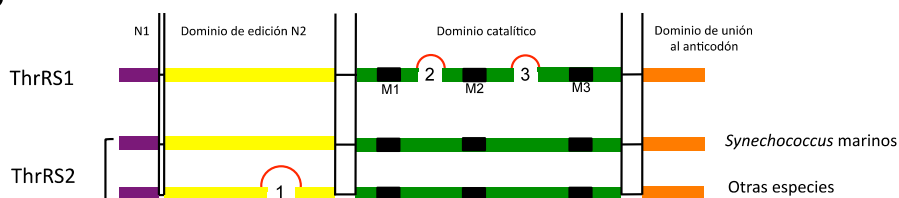


Figura 3.1 Indels como elementos identificativos de ThrRS1 y ThrRS2. En los paneles A y B los dominios de cada proteína se representan utilizando el mismo código de color: violeta para el subdominio N1, amarillo para N2, azul para la hélice conectora, verde para el dominio catalítico y naranja para el dominio de unión al anticodón. (A) Alineamiento de secuencias de ThrRS1 y ThrRS2. Los indels 1, 2 y 3 están enmarcados en rojo. (B) Representación esquemática de las secuencias de las proteínas ThrRS. Los indels aparecen como semicírculos rojos y los motivos conservados del dominio catalítico en negro.

Resultados

3.2 Análisis de la funcionalidad de los genes *thrS1* y *thrS2*.

Para el análisis experimental de los genes *thrS1* y *thrS2* se eligió como organismo modelo *Anabaena* sp. PCC 7120 (en adelante *Anabaena*), cuyo genoma contiene los genes *thrS1* y *thrS2*. Para analizar si ambos genes son funcionales, es decir, si ambos cifran proteínas con actividad treonil-tRNA sintetasa, se utilizó un acercamiento *in vivo* consistente en un ensayo de complementación de la estirpe letal condicional de *E. coli* IBPC6881(pSGUB4), cuyo gen *thrS* es inactivo por la inserción de una cassette de resistencia a kanamicina y porta una copia intacta de *thrS* en el plásmido pSGUB4, bajo el control del promotor *trc*. Dicho plásmido lleva también un gen de resistencia a cloramfenicol y el gen contraseleccionable *sacB* de *Bacillus subtilis* que provoca letalidad en un medio que contiene sacarosa, lo que permite seleccionar las células que hayan perdido el plásmido pSGUB4. (Sankaranarayanan et al, 1999), (Caillet et al, 2003). Puesto que el gen *thrS* es esencial, en un medio enriquecido con 5% de sacarosa sólo serán viables las células a las que se les haya introducido un gen capaz de complementar la pérdida del gen *thrS* de pSGUB4. Para el experimento de complementación se clonaron los genes *thrS1* y *thrS2* de *Anabaena* 7120 y el gen *thrS* de *E. coli* K-12 entre los sitios *NcoI* y *Sall* del vector de expresión pTrc99A generando respectivamente los plásmidos pCMN15, pCMN16 y pCMN17. En los plásmidos pCMN15 y pCMN16, las proteínas ThrRS1 y ThrRS2, respectivamente se expresan fusionadas a una cola de hexahistidina en posición N terminal. Estos plásmidos, junto con el vector vacío pTrc99A se introdujeron por electroporación en *E. coli* IBPC6881(pSGUB4) generando las siguientes estirpes:

- IBPC6881(pSGUB4, pTrc99A)
- IBPC6881(pSGUB4, pCMN15)
- IBPC6881(pSGUB4, pCMN16)
- IBPC6881(pSGUB4, pCMN17)

El ensayo de complementación se llevó a cabo a 30°C en tres tipos de medio sólido distintos:

- MEDIO 1: LB con ampicilina, kanamicina y cloramfenicol
- MEDIO 2: LB con ampicilina, kanamicina y 5% sacarosa
- MEDIO 3: LB con ampicilina, kanamicina, 5% sacarosa e IPTG

Resultados

El medio 1 es un medio permisivo en el que las 4 estirpes pueden sobrevivir y la presencia de cloramfenicol y ampicilina selecciona tanto el plásmido residente pSGUB4 como los plásmidos derivados de pTrc99A. En el medio 2, con sacarosa y sin cloramfenicol se seleccionan las células que hayan perdido pSGUB4 y la permanencia de los plásmidos derivados del pTrc99A, de modo que sólo pueden sobrevivir las células que producen una ThrRS activa. En el medio 3 la situación es la misma a la diferencia de que el IPTG induce la expresión de los genes que se encuentran bajo el control del promotor *trc*.

Como se muestra en la figura 3.2A, la estirpe control negativo IBPC6881 (pSGUB4, pTrc99A) no sobrevivió en los medios 2 y 3, en presencia de sacarosa, puesto que en estas condiciones carece de treonil-tRNA sintetasa. El control positivo, la estirpe IBPC6881 (pSGUB4, pCMN17), portadora del gen *thrS* de *E. coli*, sobrevivió en todas las condiciones de ensayo. De las estirpes portadoras de los genes *thrS1* y *thrS2*, la primera no consiguió sobrevivir en los medios selectivos, mientras que la segunda consiguió sobrevivir en el medio 3 suplementado con IPTG en el que se induce el promotor *trc*. La incapacidad de *thrS1* de complementar *E. coli* IBPC6881 (pSGUB4) no se debía a una insuficiente expresión de su producto en la estirpe IBPC688 (pSGUB4, pCMN15), lo que se comprobó mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos comerciales anti-His. Como se muestra en figura 3.2 C, ThrRS1 y ThrRS2 se expresaban en las correspondientes estirpes a un nivel similar, que era notablemente más alto en presencia de IPTG. El resultado del ensayo de complementación indicaba que el gen *thrS2* de *Anabaena* puede complementar la deficiencia del gen *thrS* en *E. coli* y por tanto cifra una proteína con actividad ThrRS. Por otra parte, de acuerdo con este resultado, el gen *thrS1* de *Anabaena* no cifraría una ThrRS funcional.

Resultados

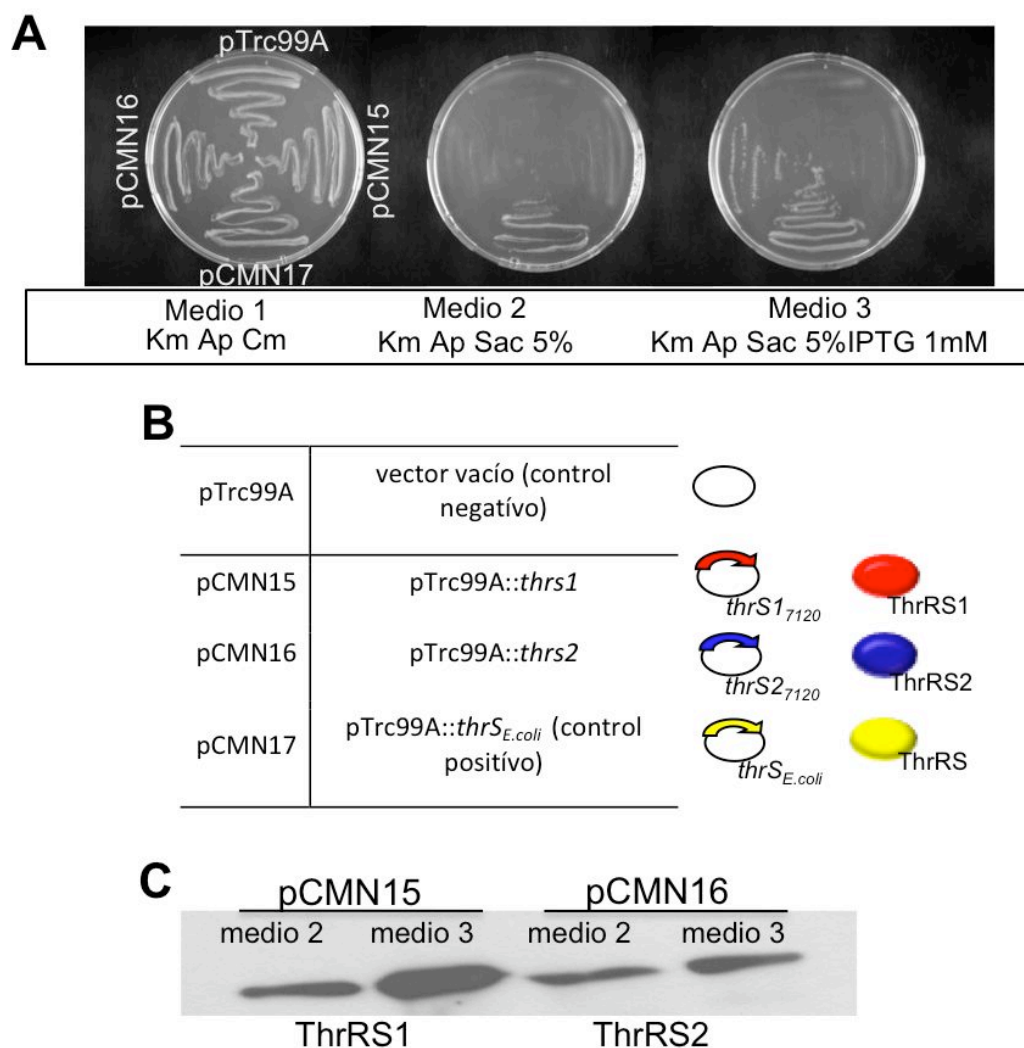


Figura 3.2 Ensayo de complementación. (A) Las células se sembraron en placas de LB con los suplementos que se indican bajo el panel y se cultivaron a 30°C durante 24 horas. Junto a cada sector se indican las estirpes ensayadas. (B) Tabla en que se describe la estructura de los plásmidos utilizados en el ensayo. (C) Western Blot con anticuerpo anti-HIS. 10 µg de proteína de extractos crudos de las estirpes IBPC 6881 (psGUB4, pCMN15) e IBPC 6881 (psGUB4, pCMN16) cultivadas en medio 2 y 3 se resolvieron en SDS-PAGE. El gel se transfirió a una membrana de PVDF que se incubó en presencia de un anticuerpo anti-HIS.

Para analizar la posibilidad de que la incapacidad de *thrS1* de complementar la estirpe IBPC6881:psGUB4 pudiera deberse a una falta de reconocimiento de los tRNAs^{Thr} de *E. coli* por ThrRS1, se realizó el siguiente experimento. Se clonó el gen *trnT-CGU*, que cifra el tRNA^{Thr}_{CGU} de *Anabaena* 7120, aguas abajo de los genes *thrS1* y *thrS2* en los plásmidos pCMN15 y pCMN16, generando de esta forma los plásmidos pCMN18 y pCMN19, respectivamente. Estos dos nuevos plásmidos, que coexpresan los genes *thrS1* y *thrS2* con el gen *trnT-CGU*, se utilizaron en un nuevo ensayo de complementación junto con los que se habían ensayado en el experimento anterior. Como se observa en figura 3.3A ambos plásmidos pudieron complementar en medio LB suplementado con sacarosa e IPTG. La observación de que pCMN18, que coexpresa

Resultados

thrS1 y el tRNA^{Thr}_{CGU}, es capaz de complementar demuestra que la incapacidad de complementación de pCMN15 (que expresa solo *thrS1*) se debe probablemente a un deficiente reconocimiento de los tRNA^{Thr} de *E. coli* por parte de ThrRS1. La expresión de las proteínas ThrRS1 y ThrRS2 en este segundo ensayo de complementación también se comprobó mediante Western blot con anticuerpos comerciales anti-HIS (Fig. 3.3C).

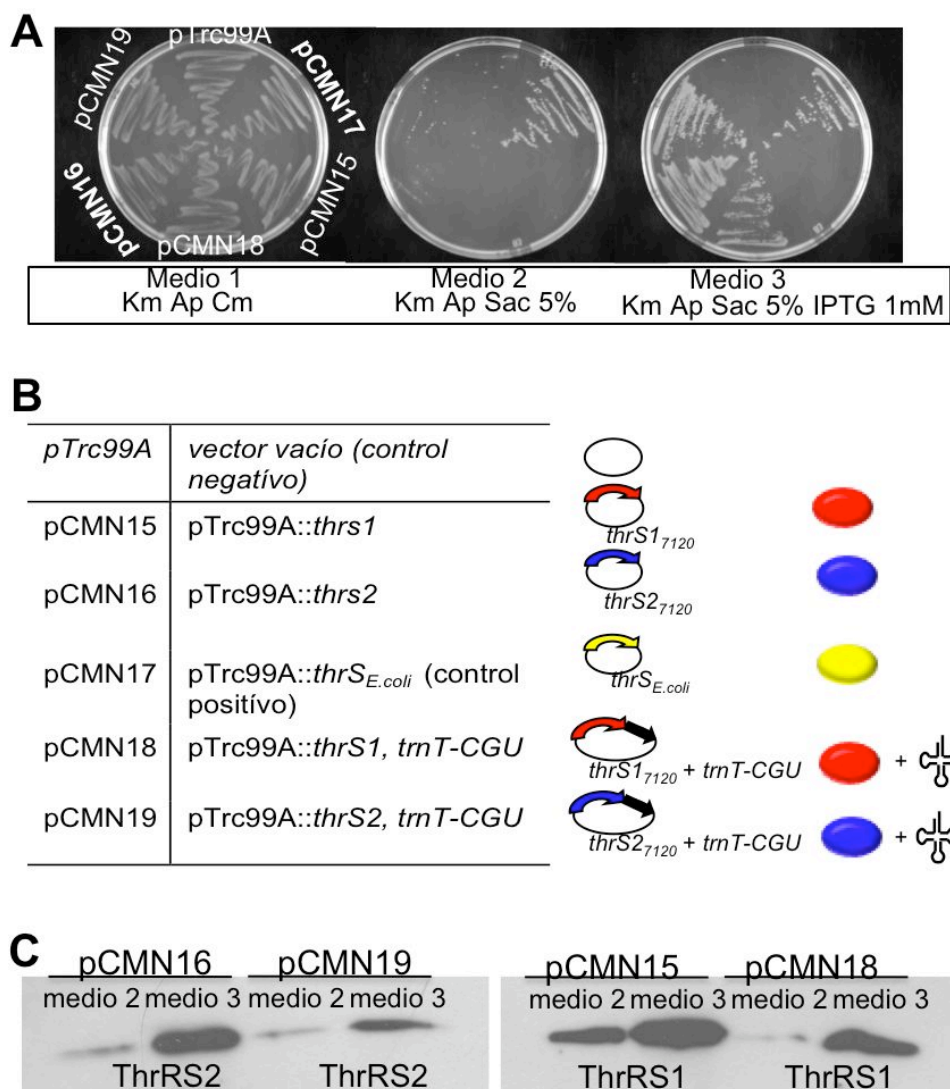


Figura 3.3 Ensayo de complementación. (A) Las células se sembraron en placas de LB con los suplementos que se indican bajo el panel y se cultivaron a 30°C durante 24 horas. Junto a cada sector se indican las estirpes ensayadas. (B) Tabla en la que se describe la estructura de los plásmidos utilizados en el ensayo; (C) Western Blot con anticuerpo anti-HIS. 10 µg de proteína de extractos totales de las estirpes IBPC (pSGUB4, pCMN15), IBPC (pSGUB4, pCMN18), IBPC (pSGUB4, pCMN16) y IBPC (pSGUB4, pCMN19) cultivadas en medio 2 y 3 se resolvieron mediante SDS-PAGE. El gel se transfirió a una membrana PVDF que se incubó en presencia de un anticuerpo comercial anti-His.

Resultados

En conjunto, los resultados de ambos ensayos de complementación indican que ambos genes *thrS1* y *thrS2* de *Anabaena* cifran proteínas activas que sin embargo presentan diferente especificidad en el reconocimiento de los tRNAs^{Thr}. ThrRS1 muestra una especificidad más restringida pues es capaz de reconocer únicamente los tRNAs^{Thr} de *Anabaena*, mientras que ThrRS2 tiene una especificidad más relajada y puede aminoacilar también los tRNAs^{Thr} de *E. coli*.

Para confirmar los resultados obtenidos *in vivo* mediante los ensayos de complementación, se adoptó un acercamiento alternativo *in vitro* que consistía en medir la actividad treonil-tRNA sintetasa de las dos proteínas mediante ensayos de aminoacilación (Francklyn et al, 2008). Para ello se clonaron los genes *thrS1* y *thrS2* en el vector de expresión pET28b en fase con la secuencia del vector que cifra una cola de hexahistidina en posición 5', generando respectivamente los plásmidos pCMN2 y pCMN1. Además se realizó también una versión alternativa de cada proteína sustituyendo la secuencia que cifra la cola de hexahistidina en los plásmidos pCMN1 y pCMN2 por una secuencia que cifra una cola Strep-Tag II, produciendo respectivamente los plásmidos pCMN21 y pCMN20. Las proteínas recombinantes se sobreexpresaron en *E. coli*, se purificaron por cromatografía de afinidad según se describe en los apartados 2.4.1 y 2.4.2. y se utilizaron en ensayos de aminoacilación con tRNA^{Thr} de *Anabaena* 7120 (apartado 2.4.7). La realización de ensayos de aminoacilación requiere preparaciones de tRNAs que se utilizan como sustrato. Puesto que es frecuente que los tRNAs transcritos *in vitro* no funcionen como sustrato debido a la ausencia de modificaciones postranscripcionales, se decidió utilizar tRNA total de *E. coli* enriquecido en el tRNA de *Anabaena* a ensayar. El genoma de *Anabaena* 7120 contiene 4 genes *trnT* que cifran tRNA^{Thr}, tres de los cuales están en el cromosoma (*trnT*-CGU, *trnT*-GGU, *trnT*-UGU1) y el cuarto (*trnT*-UGU2) se halla en el plásmido delta en un agrupamiento de genes de tRNA (Puerto-Galan & Vioque, 2012). Los 3 genes *trnT* de *Anabaena* 7120 de localización cromosómica se clonaron en el vector de expresión pPROEX-HTb (apartado 2.3.2) generando los plásmidos pCMN11, pCMN13 y pCMN14 que se introdujeron por electroporación en *E. coli* XL1-Blue. La expresión de los tRNAs en las estirpes resultantes se comprobó mediante Northern blot con muestras de tRNA total sometidas a electroforesis en geles de acrilamida (Fig. 3.4). Los tRNAs^{Thr} se sobreexpresaron y purificaron como se describe en el apartado 2.3.3. La

Resultados

En los ensayos de aminoacilación que se muestran en la figura 3.5 se utilizó ThrRS1, ThrRS2 y BSA como control negativo a una concentración final de 200 nM. Las proteínas se incubaron a 30°C durante 15 minutos en presencia de tRNA^{Thr}_{CGU}, ATP y ¹⁴C L-Thr. Como se observa en el gráfico, ThrRS1 y ThrRS2 son capaces de aminoacilar tRNA^{Thr}_{CGU} con treonina marcada mientras que el control negativo no muestra actividad. Este resultado confirma los resultados obtenidos previamente *in vivo*, esto es, los genes *thrS1* y *thrS2* cifran proteínas con actividad treonil-tRNA sintetasa.

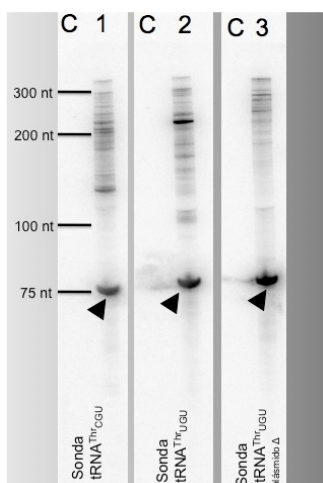


Figura 3.4 Comprobación de la expresión de los tRNA^{Thr} en *E. coli* XL1Blue. 10 µg de tRNA total de las estirpes XL1Blue (pROEX) (C), XL1Blue (pCM11) (C1), XL1Blue (pCMN13) (C2) y XL1Blue (pCMN14) (C3) cultivadas en medio LB suplementado con IPTG 1 mM se sometieron a electroforesis en un gel de acrilamida y se transfirieron a una membrana de nailon. La membrana se cortó en tres partes cada una de las cuales se hibridó con las sondas que se indican en la parte inferior de cada panel.

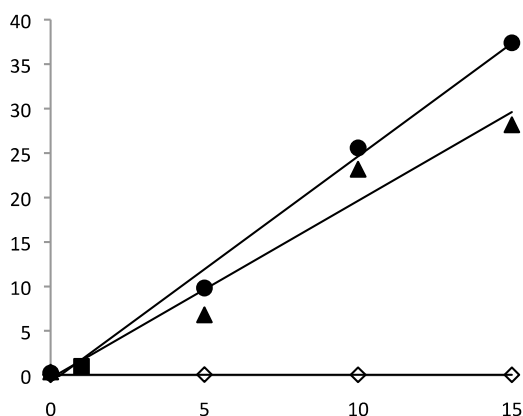


Fig. 3.5 Ensayo de aminoacilación. 200 nM de proteínas recombinantes ThrRS1(círculos), ThrRS2 (triángulos) o BSA (rombos) se incubaron con tRNA^{Thr}_{CGU} de *Anabaena* 7120, ATP y ¹⁴C-L-treonina. Se tomaron alícuotas a los tiempos que se indican en minutos en el eje horizontal y se cuantificó la radiactividad del material precipitable. En el eje vertical se indican los pmol de treonina marcada incorporados al tRNA.

Resultados

3.3 Inactivación de los genes *thrS1* y *thrS2* mediante mutagénesis insercional.

Una vez comprobado que ambos genes son funcionales, se decidió analizar si su función es plenamente redundante o si cada gen tiene una función específica. Para ello se decidió generar estirpes mutantes para dichos genes mediante la interrupción de sus respectivas ORFs por inserción de la cassette C.S3 que confiere resistencia a estreptomicina y espectinomicina (Elhai & Wolk, 1988b). La cassette C.S3 procedente del plásmido pRL453 se clonó en el sitio EcoRI de pCMN2 (que porta *thrS1*) o en el sitio HindIII de pCMN1 (que porta *thrS2*) produciendo respectivamente los plásmidos pCMN6 y pCMN4. Posteriormente los insertos de estos plásmidos se clonaron en el plásmido movilizable por conjugación pRL278 digerido con XhoI y BamHI, generando de esta forma los plásmidos pCMN10 y pCMN8, que contenían respectivamente las versiones interrumpidas de *thrS1* y *thrS2* y que fueron transferidos a *Anabaena* por conjugación triparental (apartado 2.7.3). Puesto que *Anabaena* es una cianobacteria filamentosa cuyas células contienen múltiples copias del cromosoma (Hess, 2011), un mutante está segregado cuando todas las células de sus filamentos contienen únicamente las copias del cromosoma que llevan el alelo mutante. La obtención de una estirpe segregada se consigue mediante la fragmentación rutinaria de los filamentos procedentes de las colonias ex-conjugantes y su posterior cultivo en medios selectivos. El análisis de la estructura genómica de los clones exconjugantes se realizó por PCR utilizando oligonucleótidos que flanqueaban la zona de inserción de la cassette para ambas construcciones. Los productos de las amplificaciones se resolvieron en geles de agarosa (figura 3.6 A,B,C). Para el análisis de los exconjugantes del plásmido pCMN8 se utilizaron los oligonucleótidos A7120S2KO-F Y A7120S2KO-AR que dan lugar a un fragmento de alrededor de 230 pb en el caso del alelo silvestre y a uno de alrededor de 2,2 Kb en el caso del mutante. En figura 3.6A se muestra el análisis de clones exconjugantes que se seleccionaron para posteriores análisis. En la calle M de la figura 3.6 A sólo se observa la banda de 2,2 Kb correspondiente al alelo mutante, sin rastro de la banda silvestre de 230 pb, que sin embargo está presente en las calles de los controles en los que se utiliza DNA de la estirpe silvestre o del plásmido pCMN1 como molde, lo que indica que el clon seleccionado corresponde a una estirpe segregada portadora de la mutación *thrS2::C.S3* que se denominó MN8. Para analizar los exconjugantes del plásmido pCMN10 se utilizaron los oligonucleótidos A7120S1KO-F y A7120S1KO-AR que dan lugar a fragmentos de 260 pb y 2.3 kb para los alelos silvestre y mutante,

Resultados

respectivamente. Como se observa en la figura 3.6B, en la calle correspondiente al clon exconjugante sólo aparece la banda silvestre de 260 bp, lo que resulta sorprendente puesto que el DNA utilizado como molde se había extraído de colonias resistentes a estreptomycin y espectinomycin, que por lo tanto tenían la cassette C.S3. Una posibilidad es que solo una pequeña fracción de los cromosomas albergara el alelo mutante, lo que unido a la ventaja de la banda silvestre para ser amplificada por PCR debido a su menor longitud (10 veces inferior a la de la banda mutante), podría explicar la ausencia de la banda mutante en la electroforesis. Para confirmar esto se realizó otra PCR utilizando los oligonucleótidos A7120S1KO-F y C.S3 (que alinea con la cassette) que producen un amplicón de alrededor de 200 bp. Como se muestra en figura 3.6C en la calle M se observa una banda de 200 bp que está completamente ausente en el control silvestre, lo que confirma la presencia del alelo mutante en algunos cromosomas y evidencia que el clon analizado no está segregado. Se analizaron de forma similar a la descrita alrededor de 100 exconjugantes del plásmido pCMN10, obtenidos en tres conjugaciones independientes y se comprobó que ninguno estaba segregado, lo que indica que la mutación de *thrS1* es probablemente letal y dicho gen por tanto esencial. El gen *thrS2* parece ser por el contrario un gen prescindible.

Resultados

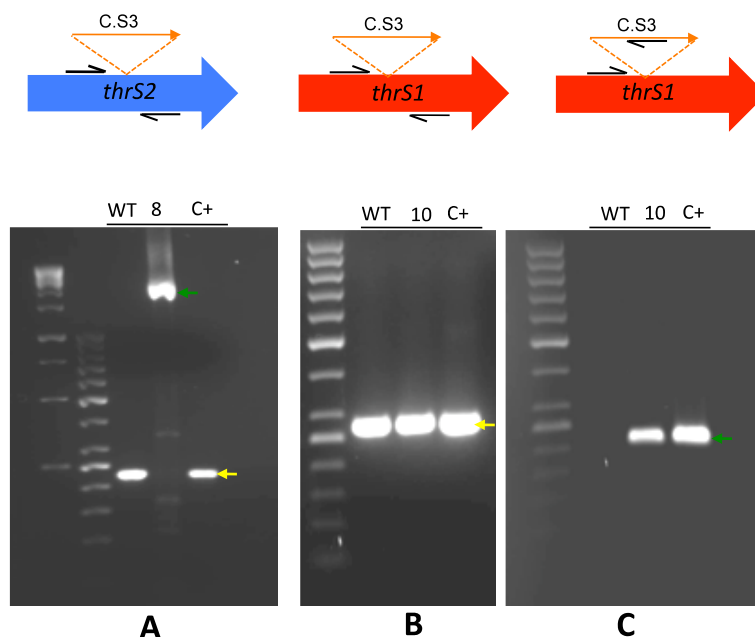


Fig. 3.6 Estructura genómica de la estirpes con la inserción de la C.S3 en *thrS1* y *thrS2*. (A) DNA genómico de *Anabaena* silvestre (WT), de una estirpe resistente a estreptomcina y espectinomicina (8) y un plásmido que porta el gen *thrS2* como control positivo (C+) se utilizó como molde para reacciones de PCR con oligos que flanquean la zona de inserción de C.S3. La flecha amarilla indica las bandas silvestres y la flecha verde la banda mutante. (B) DNA genómico de *Anabaena* 7120 (WT), de una estirpe resistente a estreptomcina y espectinomicina (10) y un plásmido que lleva el gen *thrS1* como control positivo (C+) se utilizó como molde para reacciones de PCR con oligos que amplifican el alelo silvestre (flecha amarilla). (C) DNA genómico de *Anabaena* 7120 (WT), de una estirpe resistente a estreptomcina y espectinomicina (10) y un plásmido que lleva el gen *thrS1* como control positivo (C+) se utilizó como molde en reacciones de PCR con oligos que alinean con el alelo que lleva la inserción de la cassette C.S3 (flecha verde).

3.4. Análisis de la expresión de *thrS1* y *thrS2*

Los niveles de mRNA de *thrS1* y *thrS2* se analizaron mediante Northern blot utilizando sondas específicas marcadas radiactivamente. En experimentos realizados por otros miembros del laboratorio se analizaron los niveles de mRNA de *thrS1* y *thrS2* cultivando *Anabaena* 7120 en condiciones muy diversas, como por ejemplo, condiciones de crecimiento diazotrófico, alta irradiancia, anaerobiosis o estrés de nitrógeno inducido por la adición de MSX. Asimismo se analizó su expresión en estirpes mutantes de algunos genes reguladores como *ntcA* y *hetR*., Mientras que con la sonda de *thrS1* se observaba en la mayoría de las condiciones ensayadas una banda de hibridación discreta de unas 2 Kb, relativamente intensa y cuya intensidad mostraba poca variación, con la sonda de *thrS2* se observaba una señal muy débil, casi indetectable. El análisis del contexto genómico de *thrS2* mostró que este gen se encuentra en un agrupamiento de nueve genes con su misma orientación, lo que sugiere

Resultados

que algunos podrían coexpresarse en un mensajero policistrónico formando un operón. Con el objeto de obtener alguna pista sobre las posibles condiciones en la que se expresaría *thrS2* se analizaron los productos hipotéticos de los genes circundantes. *all4729* cifra una proteína de función desconocida, *asl4728* un pequeño péptido de 55 aminoácidos, *all4727* y *all4726* cifran respectivamente el regulador de respuesta y la histidina quinasa de un sistema de dos componentes, *all4725* una porfobilinógeno sintasa, *all4724* una óxido-reductasa dependiente de FAD, *all4723* es *thrS2* y cifra por tanto una treonil-tRNA sintetasa, *all4722* una hipotética metalochaperona perteneciente a la familia COG0523 y *all4721* una hipotética GTP-ciclohidrolasa (Fig.3.8B). Excepto *all4727* y *all4726*, el resto de los genes no parecen tener una aparente relación funcional. No obstante, varios genes del agrupamiento muestran dos rasgos comunes: (1) siete de los genes de agrupamiento cuentan con uno o más homólogos en otras regiones del genoma y (2) seis de las posibles proteínas cifradas en el agrupamiento contiene probablemente un cofactor metálico (Fig. 3.8B). Esta última observación nos animó a analizar la expresión del gen *thrS2* en presencia de agentes quelantes. Para estos estudios se seleccionó el agente quelante TPEN (*N,N,N',N'*-tetrakis(2-pyridylmethyl-ethylenediamine) que a diferencia de otros como el EDTA puede permear la membranas celulares y que por otra parte, se ha utilizado en numerosos estudios para inducir deficiencia de zinc (Chimienti et al, 2001), (Hyun et al, 2001), (Nasir et al, 1999) que es precisamente el cofactor metálico de las ThrRS (Sankaranarayanan et al, 1999), (Torres-Larios et al, 2003), (Dock-Bregeon et al, 2000), (Nureki et al, 1993) (Ling et al, 2012), (Shimizu et al, 2009). En figura 3.7 se muestra un experimento de Northern blot con RNA de células de *Anabaena* 7120 cultivadas a 30°C durante 24 horas en presencia o ausencia de TPEN a una concentración final de 20 µM . La señal de hibridación obtenida con la sonda *thrS1* correspondía a una banda discreta de alrededor de 2 Kb cuya intensidad variaba moderadamente a lo largo del experimento, mostrando una caída de un 50% a las 24h de tratamiento con TPEN . Por contra, la señal de hibridación obtenida con la sonda *thrS2* tenía forma de un barrido sobre el que destacan algunas bandas más intensas. El barrido comienza en la zona de alto peso molecular (6 Kb aprox.) lo que sugiere que *thrS2* podría transcribirse en un transcrito de gran tamaño. La intensidad de la señal, prácticamente indetectable en las células no tratadas con TPEN aumentaba de forma muy notable tras 3 h de incubación con el quelante, llegando a alcanzar a las 24 h de incubación niveles 200 veces superiores al nivel basal.

Resultados

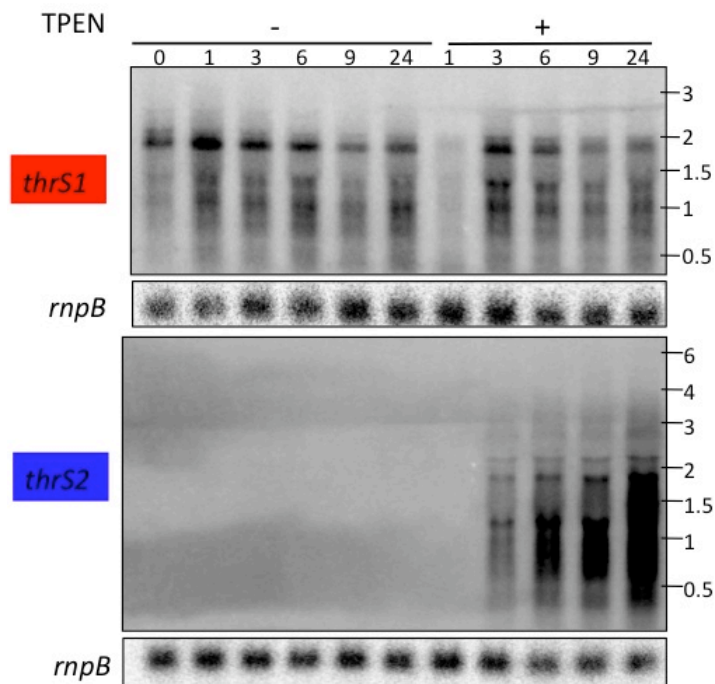


Figura 3.7 Inducción de la expresión de *thrS2* mediante adición de TPEN. Cultivos de *Anabaena* en BG11 se dividieron en dos; a uno de ellos se le añadió TPEN a una concentración final de 20 μ M, y ambos se cultivaron durante 24 horas. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados en la figura de las que se extrajo RNA con el que se prepararon membranas que se hibridaron mediante Northern blot con sondas de *thrS1* y *thrS2*. Los números a la derecha indican las posiciones de los marcadores de peso molecular de RNA. Debajo de cada membrana se muestran las hibridaciones con el gen *rnpB* usado como control de carga.

3.6 Análisis de la expresión de los genes circundantes a *thrS2*

Como se señala arriba, el hecho de que la señal de hibridación de *thrS2* tenga forma de barrido que ocupa la zona entre 0,5 y 6 Kb indica que *thrS2* podría transcribirse en un transcrito largo e inestable que necesariamente debería incluir secuencias de genes vecinos. Para comprobar esto se hibridaron membranas similares a la mostrada en la Figura 3.7 con sondas radiactivas de todos los genes del agrupamiento con la excepción de *asl4728*. Se observaron dos perfiles distintos (Figura 3.10): por un lado *all4729*, *all4727* y *all4726*, que se encuentran en la región 5' del agrupamiento, mostraban

Resultados

bandas de hibridación discretas cuya intensidad aumentaba ligeramente (un máximo de 2-3 veces) después de la incubación con TPEN; por otro lado, las ORFs de *all4725* a *all4721*, situadas en la región 3' del agrupamiento, presentaban una señal en forma de barrido con un tamaño máximo de unas 6-7 kb, sobre el que se distinguen algunas bandas discretas, y cuya intensidad aumentaba drásticamente (unas 150-200 veces) después de la adición de TPEN al cultivo. La similitud en la señal de hibridación y el patrón de expresión de los genes *all4725-all4721* indica fuertemente que estos genes forman un operón, cotranscribiéndose en un RNA policistrónico inestable. Por otro lado, el patrón de expresión sugiere que el operón *all4725-all4721* agrupa a una serie de genes que probablemente no ejercen ninguna función en condiciones estándar de cultivo, puesto que su nivel de expresión es muy bajo. Ello contrasta con la esencialidad de la función del producto de alguno de estos genes predecible de su secuencia. Por ejemplo, los productos de los genes *all4725*, *all4723* (*thrS2*) y *all4721* son respectivamente una posible porfobilinógeno sintasa (también conocida como ácido δ -aminolevulínico deshidratasa) que participa en la síntesis de tetrapirroles, una treonil tRNA sintetasa y una GTP cyclohidrolasa, una de las enzimas de la síntesis de tetrahidrofolato que juega un papel esencial en muchas reacciones de transferencia de un carbono (Nichol et al, 1985). La presencia de genes homólogos a estos tres genes en distintos puntos del genoma de *Anabaena* sugería que algunos de estos homólogos podrían ejercer la función de mantenimiento (*housekeeping*), mientras que los genes del operón podrían tener un papel alternativo en condiciones similares a las que en el laboratorio conseguimos mediante la adición de TPEN a los cultivos. En consonancia con esta hipótesis, habíamos comprobado que el gen homólogo a *all4723* (*thrS2*), *alr0335* o *thrS1*, se expresaba a un nivel notable en condiciones de cultivo estándar. Mediante RT-PCR se comprobó asimismo que los genes *alr4380* y *alr5287*, homólogos de *all4725* y *all4721* respectivamente, se expresan en condiciones estándar de cultivo figura 3.9, lo que apoyaría asimismo esta hipótesis. No obstante no se han realizado análisis cuantitativos sobre la expresión relativa de estos genes.

Resultados

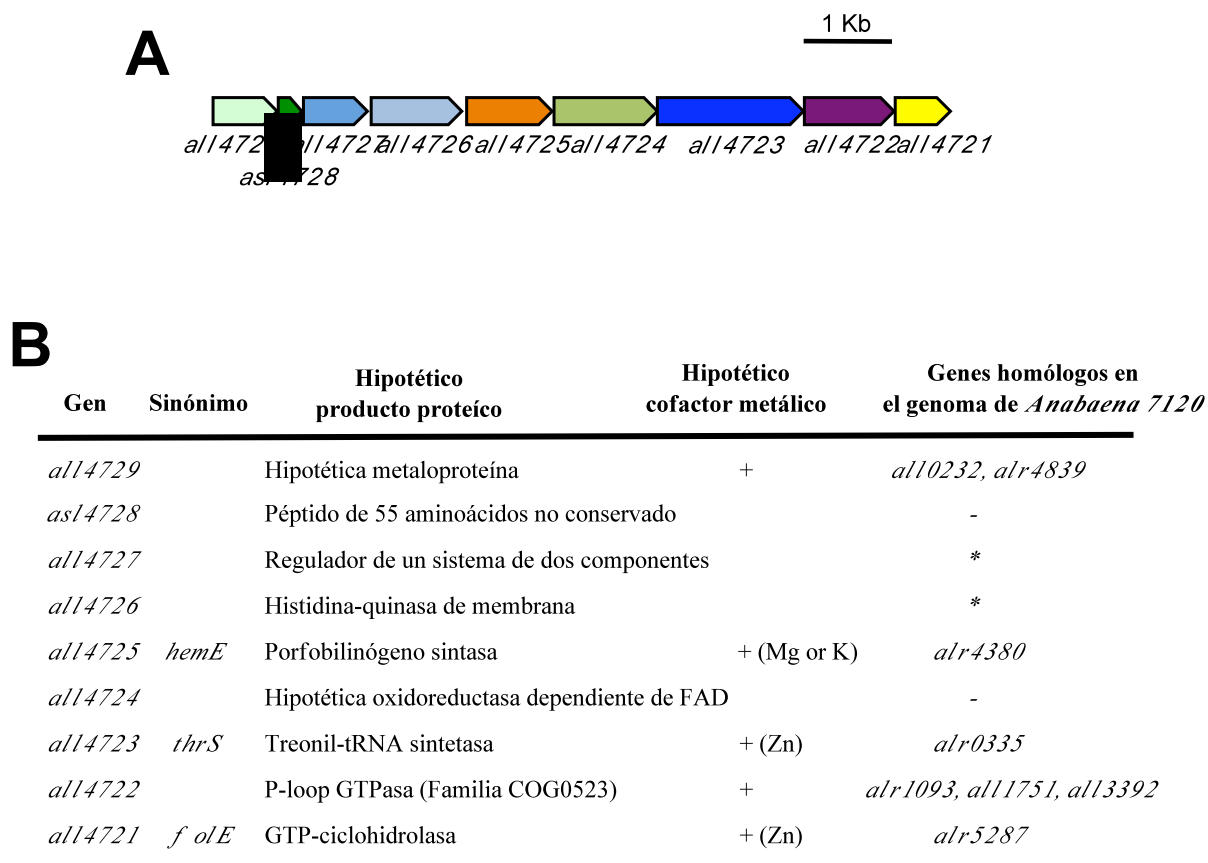
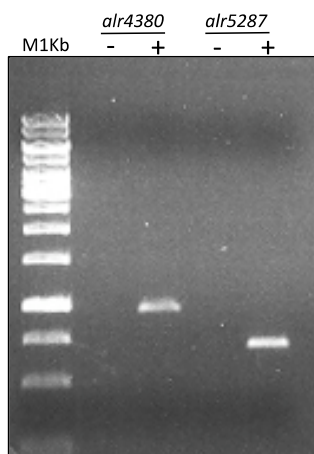


Figura 3.8 Contexto genómico de *thrS2*. (A) Representación esquemática del agrupamiento de genes *all4729-all4721*. (B) Tabla en la que se describen las características relevantes de los genes del agrupamiento. + representa la presencia de un cofactor metálico, indicado en paréntesis qué metal es cuando es predecible. Los genes homólogos a los del agrupamiento se indican con sus respectivos



nombres o con * cuando aparecen varios en el genoma.

Figura 3.9 RT-PCR de *alr4380* y *alr5287*. Como molde para la reacción de PCR se utilizó cDNA obtenido retrotranscribiendo RNA extraído de células de *Anabaena 7120* cultivadas en condiciones estándar de laboratorio. + y - indican respectivamente las muestras de RNA a las cuales se añadió o no añadió transcriptasa reversa en la reacción de retrotranscripción.

Resultados

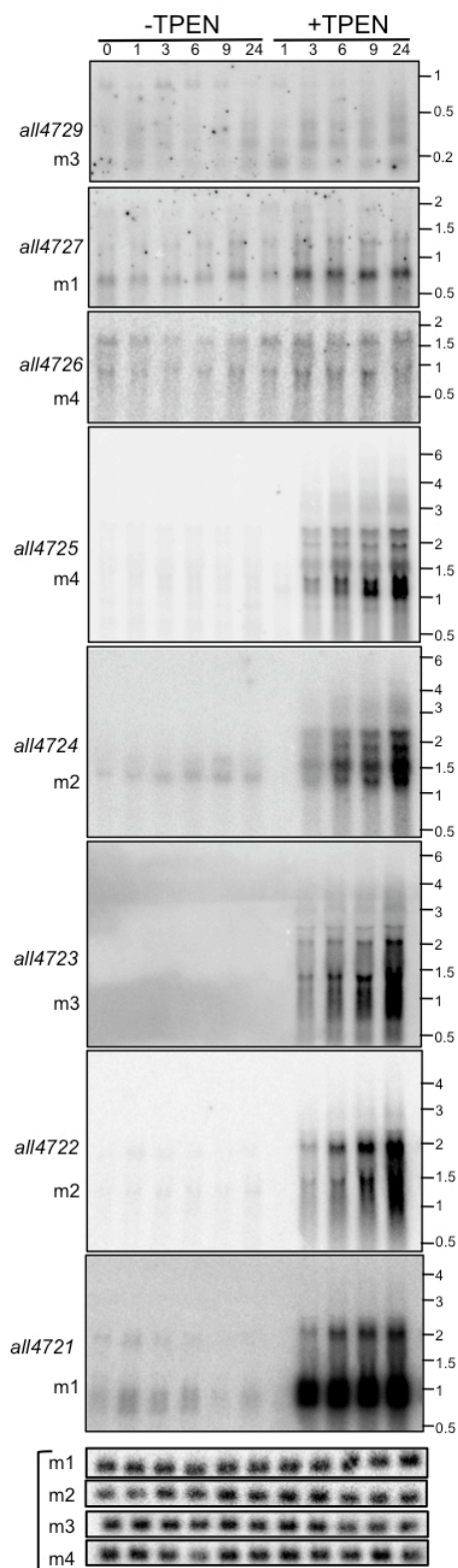


Figura 3.10 Regulación transcripcional de los genes del agrupamiento *all4729* – *all4721*. Cultivos de *Anabaena* en medio BG11 se dividieron en dos; a uno de ellos se le añadió TPEN a una concentración final de 20 μ M, y ambos se cultivaron durante 24 horas tomando alícuotas a los tiempos indicados (en horas) en la figura. RNA de las muestras se hibridó mediante Northern blot con sondas de los genes que se indican a la izquierda. m1, m2, m3 y m4 se refieren a las membranas que se utilizaron en las hibridaciones. Los números a la derecha indican las posiciones de los marcadores de peso molecular de RNA. En la parte inferior de la figura se muestran las hibridaciones de cada membrana con el gen *rnpB* usado como control de carga.

3.7 Identificación de los límites del operón

Se realizaron experimentos de RT-PCR, con un doble objeto: corroborar la existencia de transcritos solapantes entre genes contiguos y delimitar los límites del operón. Para la realización de estos experimentos se utilizó RNA procedente de células que habían sido incubadas durante 24 horas en medio BG11 suplementado con 20 μ M TPEN. El RNA se sometió a retrotranscripción (apartado 2.3.8) utilizando los oligonucleótidos ALL4721-2R, A7120THRS2-3R, ALL4725-1R, y ALL4727-1R como cebadores (Fig. 3.11A) Para la reacción de PCR subsiguiente se utilizaron tres moldes diferentes: el producto de la reacción de retrotranscripción (cDNA), una mezcla control obtenida de forma similar a la anterior pero omitiendo la enzima transcriptasa reversa y DNA génomico de *Anabaena* 7120 que sirve como control positivo. En primer lugar se realizaron reacciones de PCR con parejas de cebadores de genes contiguos (tabla 3.2). En el gel de la figura 3.11B1 se observa que en las calles correspondientes a las muestras de RNA retrotranscritas aparecen bandas del tamaño esperado (fragmentos A-E), que están ausentes en el control negativo, lo que demuestra la existencia de transcritos solapantes entre genes contiguos, desde *all4727* a *all4721*. Los mismos moldes se utilizaron en reacciones de PCR con parejas de cebadores de genes alternos. En algunos casos se observaron bandas que abarcan tres genes (fragmentos F-I, figura 3.11B1). Sin embargo, no se observaron bandas en las reacciones de PCR correspondientes a los fragmentos J y K, lo que indica que no existen transcritos solapantes entre *asl4728* y *all4727* (la reacción que genera el fragmento L se utilizó como control positivo). Este resultado demuestra la existencia de transcritos solapantes entre ORF adyacentes, desde *all4727* a *all4721*. Sin embargo, la marcada diferencia observada en los experimentos de Northern blot entre los patrones de expresión de *all4727* y *all4726* por un lado y *all4725*-*all4721* por otro, sugería la existencia de dos unidades transcripcionales: una compuesta por *all4727* y *all4726*, que cifra un hipotético sistema de dos componentes y la otra compuesta por *all4725*, *all4724*, *all4723*, *all4722* y *all4721*.

Resultados

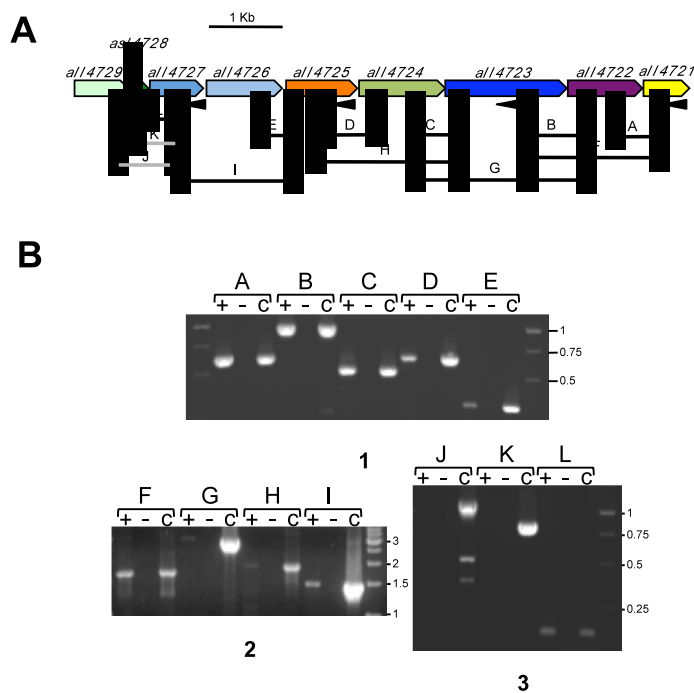


Figura 3.11 Determinación de los límites del operón por RT-PCR. (A) Representación esquemática del agrupamiento de genes *all4729* - *all4721*. Los oligonucleótidos utilizados para la retrotranscripción se indican con flechas. Los fragmentos amplificados se indican con líneas negras y los no amplificados con líneas grises. (B) Electroforesis de los productos de RT-PCR. + y - indican respectivamente las reacciones en las cuales se añadió o no la enzima retrotranscritasa. “C” indica el control positivo de cada reacción en el que se utilizó DNA genómico como molde. Las letras de A hasta L indican los productos de amplificación y los correspondientes fragmentos en el panel A.

Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados en el experimento de RT-PCR y tamaño de cada amplicón. En sombreado se muestran las parejas de oligonucleótidos que no dieron lugar a un producto de amplificación.

<i>Oligonucleótidos RT</i>	<i>Oligonucleótidos PCR</i>	<i>Nombre fragmento</i>	<i>Tamaño amplicón esperado</i>
ALL4721-2R	ALL4722-2F -ALL4721-1R	A	629 bp
ALL4721-2R	A7120ThrS2-3F-ALL4722-2R	B	977 bp
A7120ThrS2-3R	ALL4724-2F-A7120ThrS2-2R	C	537 bp
A7120ThrS2-3R	ALL4725-2F-ALL4724-1R	D	654 bp
ALL4725-1R	ALL4726-1F-ALL4725-2R	E	321 bp
ALL4721-2R	A7120ThrS2-3F-ALL4721-1R	F	1689 bp

Resultados

ALL4721-2R	ALL4724-2F-ALL4722-2R	G	2902 bp
A7120ThrS2-3R	ALL4725-2F-A7120ThrS2-2R	H	1915 bp
ALL4725-1R	ALL4727-2F-ALL4725-2R	I	1502 bp
ALL4727-1R	ALL4729-2F-ALL4727-3R	J	1124 bp
ALL4727-1R	ALL4729-1F-ALL4727-3R	K	846 bp
ALL4727-1R	ALL4727-2F-ALL4727-3R	L	192 bp

3.8 Identificación y caracterización de promotores

Para la localización de los sitios de inicio de la transcripción (tsps) en el agrupamiento de genes descrito se utilizó una técnica de 5'-RACE que permite discriminar entre moléculas de RNA cuyos extremos 5' llevan un grupo trifosfato, que corresponden a inicios de transcripción, y moléculas de RNA con un grupo monofosfato en el extremo 5', que corresponden a productos de procesamiento de transcritos más largos (Bensing et al, 1996). En este procedimiento se utilizan muestras duplicadas de RNA que se incuban o no con TAP (fosfatasa alcalina de tabaco). La TAP es una pirofosfatasa que convierte los grupos trifosfato de los extremos 5' en grupos monofosfato. Las muestras de RNA tratadas o no con TAP se ligan a un oligonucleótido de RNA de secuencia conocida, los productos se retrotranscriben con un oligonucleótido que alinea con el gen de interés y el cDNA producido se amplifica por PCR con un oligonucleótido directo (*forward*) cuya secuencia coincide parcialmente con la secuencia del oligonucleótido de RNA utilizado, y uno reverso (*reverse*) que alinea con el gen de interés (Fig. 3.12). Los productos de amplificación se separan por electroforesis en gel de agarosa. Por este procedimiento, los transcritos que contienen un extremo 5' trifosfato generarán fragmentos de amplificación en las reacciones tratada con TAP pero no en las reacciones no tratadas. Por el contrario, los transcritos que portan un extremo 5' monofosfato generarán bandas de amplificación en ambas reacciones. Para este experimento se utilizaron muestras de RNA de células cultivadas durante 24 horas en presencia o ausencia de 20 μ M TPEN. Para las reacciones de retrotranscripción se utilizaron oligonucleótidos reversos que alineaban con cada uno de los genes del agrupamiento desde *all4727* a *all4721* (ALL4727-4R, ALL4726-3R, ALL4725-4R,

Resultados

ALL4724-1R, ALL4723-8R, ALL4722-2R o ALL4721-2R, respectivamente; Fig. 3.13A). Salvo en el caso de la reacción en la que se utilizó el oligonucleótido ALL4724-1R como cebador de la retrotranscriptasa, en el resto de reacciones se observaron bandas (señaladas con una flecha negra en la Fig. 3.13B) en las calles correspondientes a las muestras incubadas con TAP que están ausentes (o son de intensidad considerablemente menor) en las muestras no tratadas con TAP. El DNA de tales bandas, se clonó en el vector pMBL-T y se secuenció el inserto de cada plásmido resultante, lo que permitió la identificación de 5 tsps, localizados respectivamente a -68, -19, -20, -118 y -90 bp aguas arriba de las ORFs *all4727*, *all4725*, *all4723*, *all4722* y *all4721* (Fig. 3.13A). El tsp identificado utilizando el oligonucleótido ALL4726-1R como cebador de la retrotranscriptasa corresponde al mismo que se identificó utilizando el oligonucleótido ALL4727-5R, que se localiza aguas arriba de *all4727*, lo que corrobora que *all4727* y *all4726* se cotranscriben desde un promotor común al que corresponde dicho tsp. Es de destacar que en la figura R10B se aprecian diferencias de intensidad entre las bandas de amplificación obtenidas con los oligos ALL4725-3R, ALL4723-5R, ALL4722-5R y ALL4721-1R entre las reacciones en las que se usa RNA de células no tratadas con TPEN frente a aquellas en las que se usa RNA de células tratadas con el quelante. Estas diferencias de intensidad son consistentes con las señales obtenidas en los experimentos de Northern blot, y sugieren que estos promotores están regulados.

Resultados

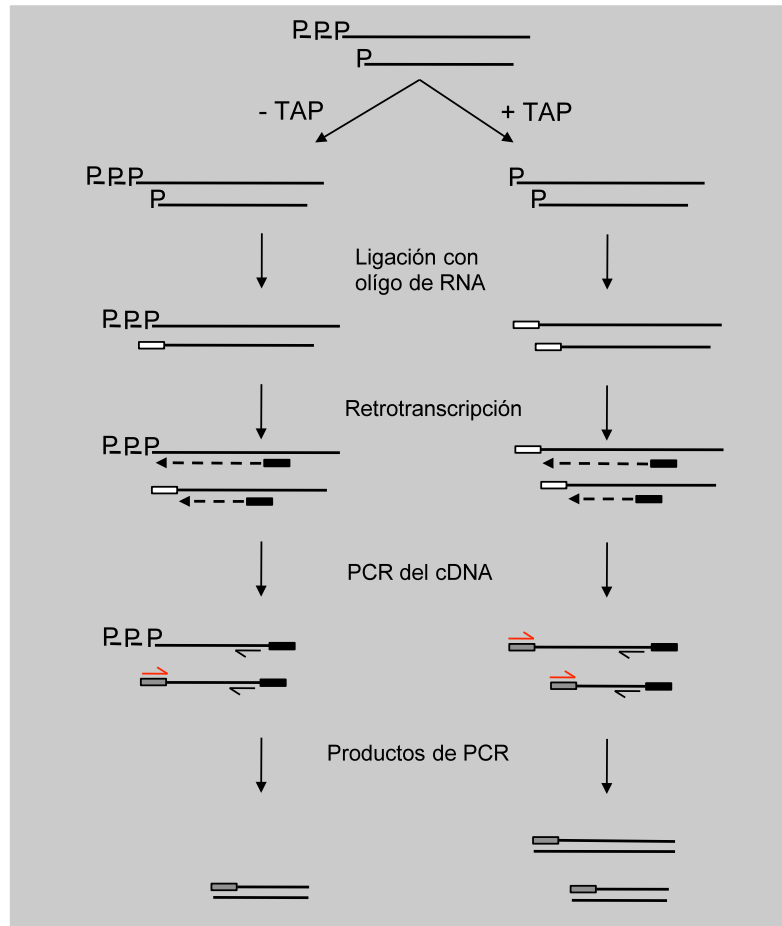


Figura 3.12 Esquema explicativo de la técnica de 5'- RACE (modificado a partir de Bensing *et al.*, 1996). Técnica del 5' – RACE que permite discriminar entre moléculas de RNA cuyos extremos 5' llevan un grupo trifosfato, que corresponden a inicios de transcripción, y moléculas de RNA que tienen en el extremo 5' un grupo monofosfato, que corresponden a productos de procesamiento de transcritos más largos. Los rectángulos blancos representan el oligonucleótido de RNA; los rectángulos negros representan los oligonucleótidos que se utilizan para la RT; los rectángulos grises representan las secuencias complementarias al oligonucleótido de RNA utilizado; las flechas rojas y negras representan respectivamente los oligonucleótidos directos y reversos que se utilizan en las reacciones de PCR.

Resultados

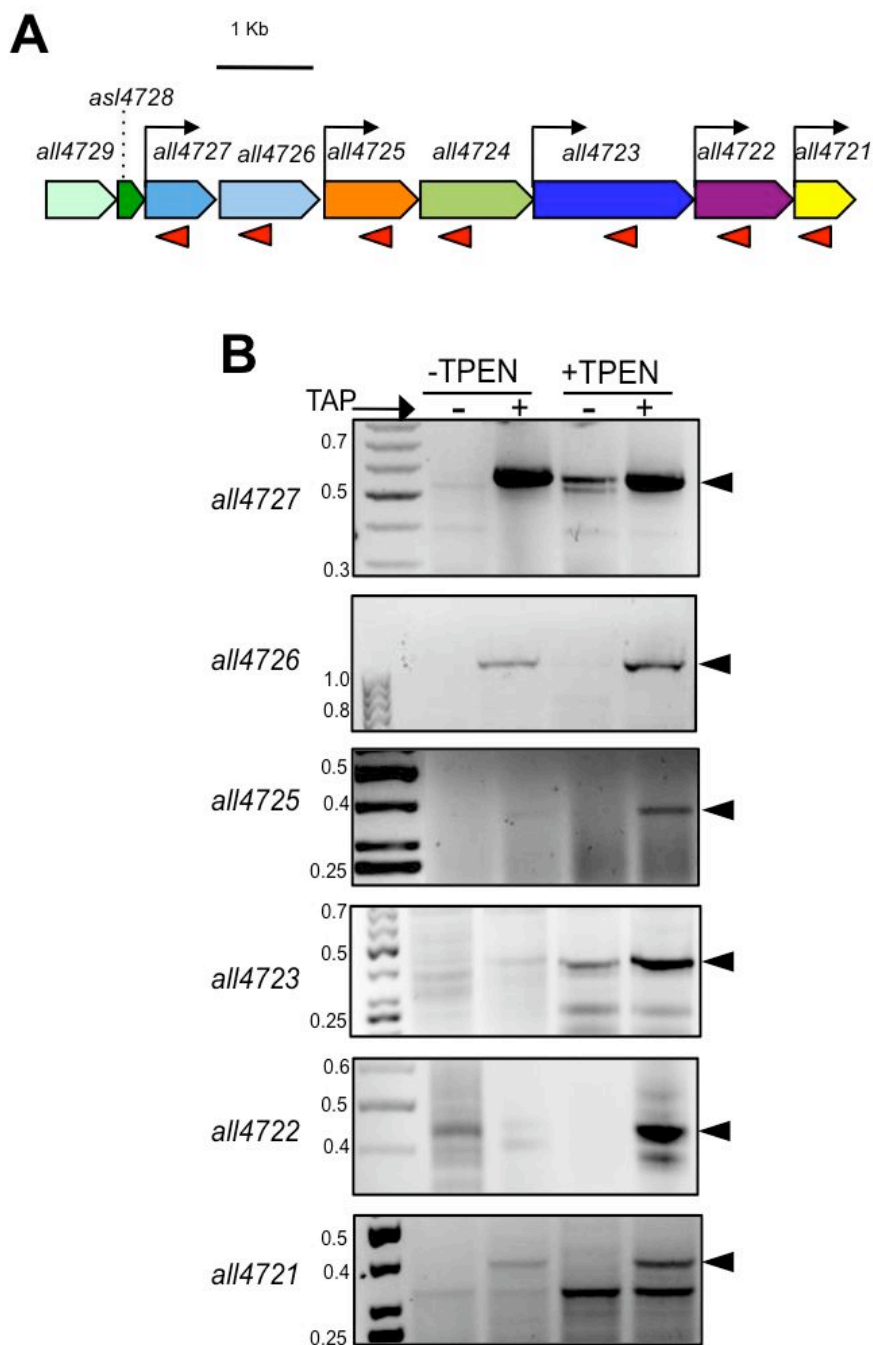


Figura 3.13 Identificación de promotores por 5'-RACE. (A) Representación esquemática del agrupamiento de genes *all4729*–*all4721*. Los oligonucleótidos reversos (*all4727*-5R, *all4726*-1R, *all4725*-3R, *all4724*-1R, *all4723*-5R, *all4722*-5R y *all4721*-1R) utilizados para las reacciones de retrotranscripción, están representados con flechas rojas. Las flechas en ángulo recto indican los sitios de inicio de la transcripción que se identificaron en este experimento. (B) Electroforesis de los productos de las reacciones de 5'-RACE. Muestras de RNA de células cultivadas en presencia o ausencia de TPEN fueron tratadas o no con TAP y sometidas luego a 5'-RACE. A la izquierda de cada panel se indica la ORF con la que alinean los oligonucleótidos reversos utilizados como cebadores en las reacciones de retrotranscripción y PCR. Los números indican las posiciones de los marcadores de DNA. Las flechas indican las bandas diferenciales que se purificaron y secuenciaron.

3.9 Análisis de la regulación de los promotores del operón *all4725-all4721*

El patrón de regulación observado en los genes del operón *all4725-all4721* sugería la implicación de algún regulador dependiente de metales. La inspección de las secuencias próximas a los tsps mapeados en la sección anterior permitió señalar algunas secuencias palindrómicas parecidas a los sitios de unión de proteínas de la familia FUR (Ferric Uptake Regulator) descritas en otras bacterias (Lucarelli et al, 2007), (Lee & Helmann, 2007), (Gaballa & Helmann, 1998), (Ma et al, 2011). Las proteínas de esta familia son factores de transcripción que generalmente regulan la expresión de genes en función de la disponibilidad de un metal específico (Lee & Helmann, 2007).

En el genoma de *Anabaena* 7120 existen tres genes que cifran proteínas de la familia FUR, *all1691*, *all2473* y *alr0957*. El producto de uno de ellos, *all1691*, se ha identificado como Fur (el regulador de la homeostasis del hierro) y al gen se le ha dado el nombre de *furA* (Hernandez et al, 2004). Para analizar si el producto de alguno de estos genes podía estar involucrado en la regulación transcripcional del operón *all4725-all4721*, otros miembros el grupo llevaron a cabo experimentos en los que sobreexpresaron las tres proteínas en *Escherichia coli* como proteínas de fusión a una cola Strep-Tag II, tras su purificación, se ensayó su unión a un fragmento de DNA de la región 5' del operón (correspondiente a la región promotora de *all4725*) mediante experimentos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Este experimento (Fig. 3.14) se muestra en esta tesis de forma únicamente ilustrativa. Como se observa en la figura 3.14, sólo la proteína All2473 producía una banda retardada, lo que constituía una identificación tentativa de dicha proteína como el posible factor regulador. Los siguientes experimentos fueron realizados (a menos que se indique) por el autor de esta tesis. Para analizar si la unión de All2473 al promotor de *all4725* era específica se llevó a cabo un experimento de competición, en que se incubó 5 pmol de dímero de la proteína recombinante con 0.25 fmol de un fragmento del promotor de *all4725* generado por PCR con los oligonucleótidos ALL4725-2F y ALL4725-2R y marcado radiactivamente. A las mezclas de reacción se les añadió DNA competidor frío (sin marcar radiactivamente) tal como se indica en la figura 3.15A en un exceso de 10, 50, 100 o 200 veces la cantidad de DNA marcado. Se utilizaron dos tipos de DNA competidor: el mismo fragmento de PCR que se utiliza en el ensayo y un fragmento de DNA no relacionado, generado por PCR con los oligonucleótidos ALL4726-2F y

Resultados

ALL4726-1R. En figura 3.15A se muestra que la adición de DNA competidor idéntico a la sonda en un exceso de 150-200 veces hace desaparecer parcial o totalmente la banda retrasada (calles 5-6) mientras que la adición de la misma cantidad de DNA competidor no relacionado no tiene efecto (calles 7-10). Este resultado indica que la unión de All2473 al promotor de *all4725* es específica.

Se analizó si All2473 podía unirse *in vitro* a las regiones promotoras de *all4723*, *all4722* y *all4721*, para lo que se realizaron ensayos de EMSA utilizando fragmentos de DNA de los promotores de dichos genes. En la figura 3.15B. se muestra que All2473 puede retardar un fragmento del promotor de *all4723*, pero no un fragmento del promotor de *all4722*. También se observó que All2473 podía retardar un fragmento del promotor de *all4721* pero sólo cuando se utilizaban cantidades de proteína muy elevadas en el ensayo, 10 veces superiores a las necesarias para retardar los fragmentos de *all4725* y *all4723*..

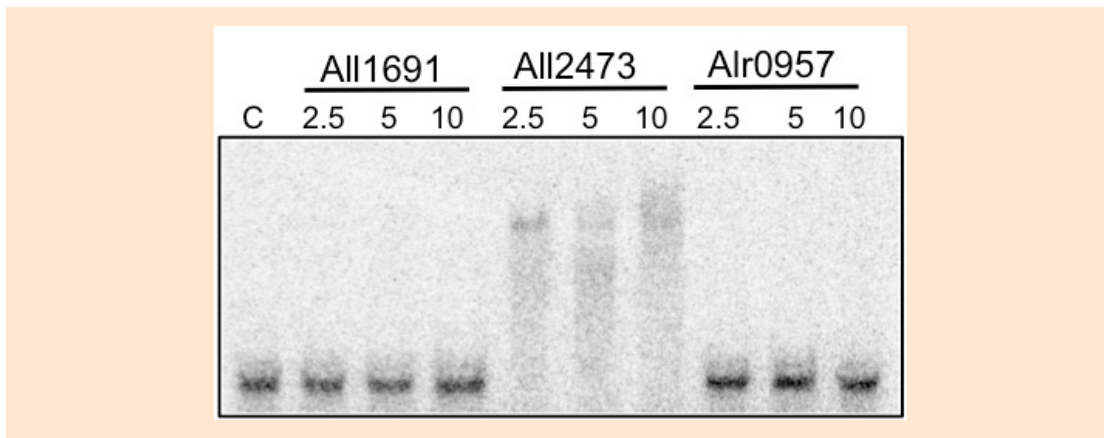


Figura 3.14 Ensayo de retardo de la movilidad electroforética con las tres proteínas miembros de la familia FUR. Cantidades crecientes de las proteínas All1691, All2473 y Alr0957 se incubaron a 25°C durante 15 minutos con 0.25 fmol de un fragmento marcado del promotor de *all4725* en un volumen final de 15 μ l. Las mezclas de reacción se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 6%. C indica el control sin proteína. Este experimento ha sido realizado por Miguel Ángel Rubio Gómez y se presenta con su permiso y con fines ilustrativos.

Resultados

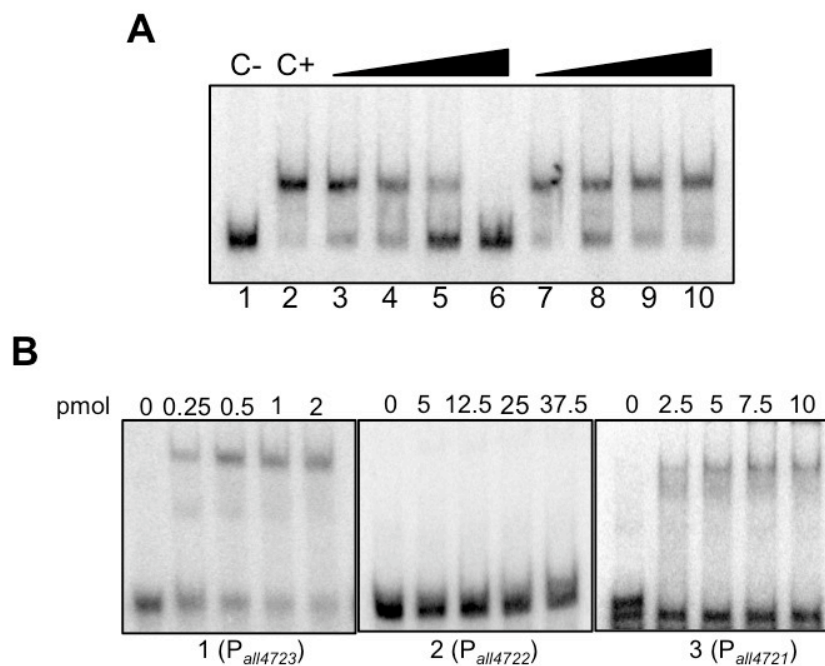


Figura 3.15 Ensayos de EMSA para analizar la unión de la proteína ZUR a los promotores de *all4725*, *all4723*, *all4722* y *all4721*. (A) 0.25 fmol de un fragmento de DNA del promotor de *all4725* se incubaron con 5 pmol de All2473 (excepto el control negativo “C-“ en ausencia (“C+”) o presencia de un exceso de 10, 50 100 ó 200 veces DNA competidor frío en un volumen final de 15 μ l. Las calles 3-6 corresponden a las reacciones que se incubaron con DNA competidor idéntico a la sonda; las calles 7-10 corresponden a las reacciones que se incubaron en presencia de DNA competidor no relacionado. (B) Ensayos de EMSA de All2473 con fragmentos de DNA de los promotores de *all4723*, *all4722* y *all4721*. Las cantidades de proteína utilizadas en cada ensayo se indican arriba. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 ml.

3.10 Análisis del papel de All2473 en la regulación del operón *all4725-all4721*.

Para confirmar la implicación de All2473 en la regulación del operón se construyó un mutante por delección/inserción de la ORF *all2473*, que se denominó MN38. Para ello se amplificó por PCR un fragmento de DNA de aproximadamente 1.5 Kb que incluye *all2473* y secuencias flanqueantes, utilizando como molde DNA genómico de *Anabaena* 7120 y como cebadores los oligonucleótidos 2473DEL-1F y 2473DEL-1R. El producto de PCR se clonó en el vector pBluescript SK+ digerido con *XhoI* y *BamHI*, generando el plásmido pCMN34, que se utilizó como molde para una reacción de PCR con los oligonucleótidos divergentes 2473DEL-2F y 2473DEL-2R. El producto de PCR se purificó y se ligó con la cassette de resistencia a estreptomycin y espectinomycin C.S3, generando el plásmido pCMN36. Finalmente esta construcción se transfirió al plásmido conjugativo pRL278 cortado con *XhoI* y *SacI*, produciendo el plásmido pCMN38, que se introdujo en *Anabaena* 7120 por conjugación triparental. Se

Resultados

seleccionaron algunos exconjugantes resistentes a estreptomycin y espectinomycin que se sometieron a ciclos sucesivos de fragmentación de los filamentos mediante sonicación y selección en medio BG11 suplementado con los antibióticos mencionados. La segregación del alelo mutante en colonias obtenidas por el procedimiento descrito se comprobó mediante PCR (Fig. 3.16A y B). Uno de los clones mutantes segregados se seleccionó para análisis posteriores y se denominó MN38. Para determinar el papel de All2473 en la regulación de la transcripción de los genes del operón *all4725 – all4721* se realizó un experimento de Northern blot con RNA extraído de células de *Anabaena* silvestre o del mutante MN38 cultivadas durante 24 horas en medio BG11 suplementado o no con 20 μ M TPEN. Se realizaron hibridaciones independientes con sondas de los genes operón *all4725-all4721* y también con el gen *all4727* como control (Fig. 3.17). A diferencia de lo que se observa en la estirpe silvestre en la que los transcritos de los genes *all4725-all4721* muestran un nivel muy bajo en ausencia de TPEN y un nivel significativamente superior en presencia del quelante, en la estirpe MN38 los transcritos de los genes *all4725-all4721* muestran un nivel muy elevado, similar o superior al observado en el silvestre en presencia de TPEN, en todas las condiciones (Fig. 3.17). Estos resultados son compatibles con un papel de All2473 como regulador negativo, de modo que su ausencia en el mutante determina la inducción permanente de los genes regulados. El gen *all4727* sin embargo muestra una expresión similar en el silvestre y el mutante que es muy baja en todas las condiciones, lo que refuerza la idea anteriormente expuesta de que este gen pertenece a una unidad transcripcional distinta.

Resultados

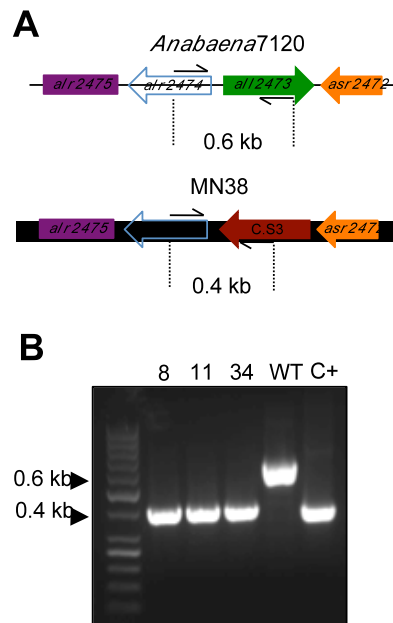


Figura 3.16 Comprobación de la estructura cromosómica del mutante MN38 . (A) Representación esquemática de la estructura genómica del mutante MN38 y de *Anabaena* silvestre. Se indican los oligonucleótidos que se utilizaron para la reacción de PCR . **(B)** Electroforesis de los productos de PCR obtenidos con los cebadores indicados en A y como molde DNA genómico de *Anabaena* silvestre (WT), de tres clones resistentes a estreptomcina y espectinomycin (8, 11 y 34) o un plásmido que lleva la construcción utilizada para la creación del mutante (C+). Las flechas indican las bandas mutantes de 0.4 kb y la banda silvestre de 0.6 kb.

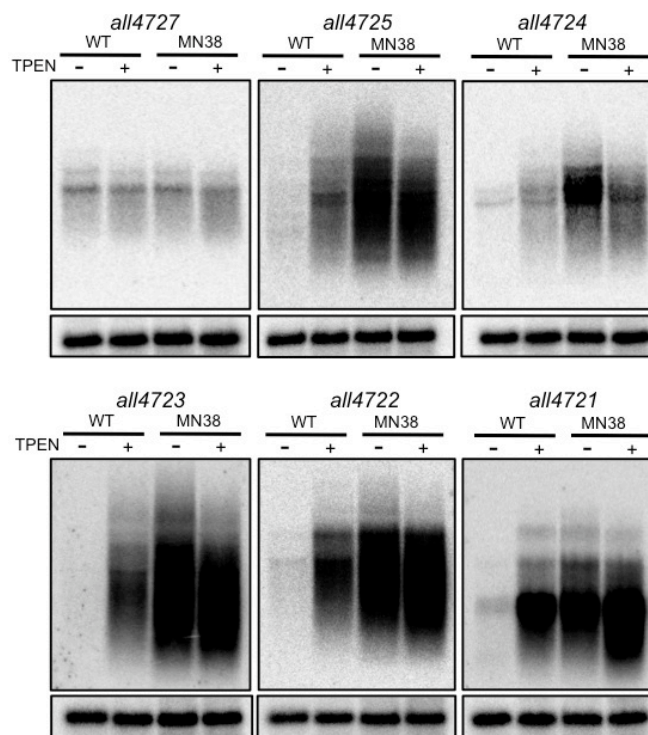


Figura 3.17 Expresión de *all4727* y de los genes del operón *all4725-all4721* en el mutante MN48. Northern Blot con RNA de células de *Anabaena* silvestre (WT) o del mutante MN38 incubadas o no con TPEN durante 24 horas. Las sondas utilizadas para cada membrana se indican en la parte superior de cada panel. Las hibridaciones con el gen *rnpB* utilizado como control de carga se muestran debajo de cada panel.

Resultados

3.11 Análisis del cofactor metálico de All4723

Las proteínas de la familia FUR responden a distintos metales u otros estímulos como la deficiencia de hemo o el estrés oxidativo. El hecho de que el operón *all4725-all4721* se induzca por el tratamiento con el quelante TPEN indica que el estímulo al que responde All2473 es un metal. El TPEN aparece citado extensamente en la literatura como un quelante específico de zinc y ha sido utilizado en numerosos trabajos como tal (Chimienti et al, 2001), (Hyun et al, 2001), (Nasir et al, 1999). Sin embargo, en trabajos recientes se demuestra que no es así (Blindauer et al, 2006) y que en *E. coli* afecta a la expresión de genes que responden a otros metales como hierro Sigdel TK y colaboradores (Sigdel et al, 2006). Se decidió comprobar la especificidad del TPEN en nuestro sistema experimental, para lo que se realizaron experimentos de Northern Blot usando RNA de células de *Anabaena* 7120 cultivadas en medio BG11 suplementado o no con 20 μM TPEN durante distintos tiempos que se hibridaron con sondas radioactivas de los genes *isiA* y *petE*, cuya expresión responde a hierro o cobre respectivamente (Boekema et al, 2001), (Laudenbach & Straus, 1988), (Kouril et al, 2005), (Buikema & Haselkorn, 2001). En la figura 3.18 se muestra que la adición de TPEN al cultivo induce la expresión de *isiA* y reprime la expresión de *petE*, lo que demuestra que en *Anabaena* el tratamiento con TPEN induce la expresión de genes que responden a distintos metales y por ello no puede ser considerado un quelante específico.

Para identificar el cofactor metálico de la proteína All4723 se escogió un acercamiento *in vitro*. En primer lugar, se tituló la concentración de TPEN necesaria en las reacciones de EMSA para inhibir la unión de All4723 al DNA. Una incubación de una hora en presencia de concentraciones de TPEN iguales o superiores a 500 μM , (calles 8-10) suprimía casi completamente la unión de Strep-All2473 al DNA figura 3.19A. Posteriormente se suplementaron mezclas de reacción tratadas con 500 μM de TPEN como se ha descrito con concentraciones crecientes de distintos metales y se incubaron en las mismas condiciones durante 30 minutos adicionales. En la figura 3.19B se observa que sólo en las reacciones suplementadas con ZnSO_4 , Strep-All2473 recupera su actividad puesto que sólo en estas calles reaparecen las bandas retrasadas (calles 4-6). Este resultado indica que la unión de All4723 al DNA es dependiente de zinc y que por lo tanto dicha proteína es Zur (zinc uptake regulator), que hasta el momento no se

Resultados

había identificado en *Anabaena*. Asimismo, este resultado indica que la expresión del operón *all4725-all4721* responde no a una deficiencia general de cationes metálicos (como podría deducirse de los experimentos en los que se usa TPEN) sino a la deficiencia específica de zinc.

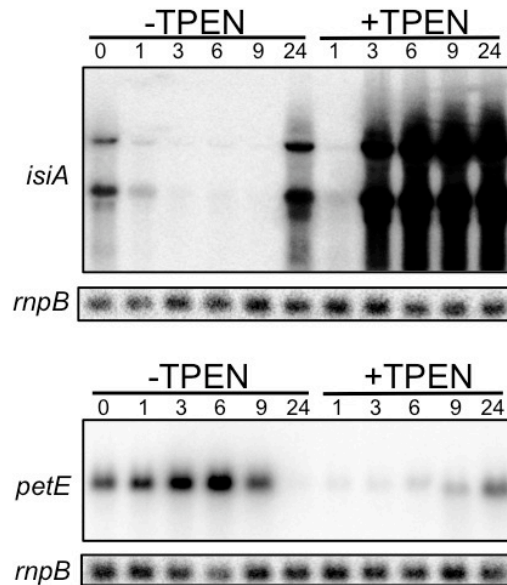


Figura 3.18 Respuesta de *isiA* y *petE* al TPEN. Células de *Anabaena* se cultivaron en BG11 en presencia o ausencia de 20 μ M de TPEN. Se tomaron alícuotas al tiempo indicado en horas en la parte superior de los paneles de las que se extrajo RNA que se hibridó con sondas de los genes que se indican a la izquierda. Como control de carga se hibridaron las membranas con una sonda del gen *rnpB*

3.12 Caracterización de la secuencia de unión de ZUR

La secuencia de unión de las proteínas Zur de otras bacterias es generalmente un palíndromo del tipo 7-1-7 cuya secuencia varía según la especie (Lee & Helmann, 2007). Puesto que en anteriores experimentos de EMSA habíamos comprobado que Zur era capaz de unirse a los promotores de *all4725*, *all4723* y *all4721*, decidimos comprobar si dichos promotores contenían este tipo de secuencia. En los promotores de *all4725* y *all4723* encontramos secuencias de tipo 7-1-7 imperfectas y con cierta similitud entre ambas, que podrían corresponder con el sitio de unión de Zur. En el promotor de *all4721* no se encontraron tales secuencias (Fig. 3.21).

Para caracterizar empíricamente la secuencia de unión de Zur del promotor de *all4725* se realizaron ensayos de retardo en gel (EMSA) utilizando un fragmento de DNA con la secuencia silvestre y otros con mutaciones en nucleótidos de la hipotética secuencia de unión de Zur. Estos fragmentos de DNA se obtuvieron mediante el alineamiento de oligonucleótidos parcialmente solapantes que se rellenaron con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa en presencia de α - 32 P-dCTP. Cantidades de 0.1 a 0.5 fmol de fragmentos de DNA marcado se incubaron durante 15 minutos a 25°C en presencia de concentraciones crecientes de proteína recombinante Strep-Zur que oscilaban entre un mínimo de 0.33 nM hasta un máximo de 0.75 μ M. Las reacciones se resolvieron en geles de acrilamida nativos, y las bandas retrasadas y no retrasadas se cuantificaron por autorradiografía electrónica con un aparato “*Cyclon Plus Storage phosphor system*” (Perkin Elmer) (apartado 2.3.7). De esta forma fue posible calcular en cada calle el porcentaje de radiactividad correspondiente a la banda retrasada, que se representó en función de la concentración de proteína y se ajustó a una versión simplificada de la ecuación de Hill, lo que nos permitió determinar la constante de afinidad (K_d) de Zur para cada fragmento. La K_d de Zur para el fragmento silvestre del promotor de *all4725* es de 2.5×10^{-9} M (Fig. 3.20A). Este valor se encuentra en el mismo orden de magnitud de los valores que otros miembros de la familia FUR presentan para sus secuencias dianas (Gabriel et al, 2008), (Lee & Helmann, 2007). También se calcularon los valores de K_d de las versiones mutadas del promotor de *all4725*, que contienen de uno a cuatro nucleótidos mutados (Fig. 3.20B-L). Excepto la mutación en posición 1R, que hace la secuencia de unión perfectamente simétrica y no altera significativamente la K_d , respecto a la observada para el fragmento silvestre, todas las demás mutaciones tuvieron

Resultados

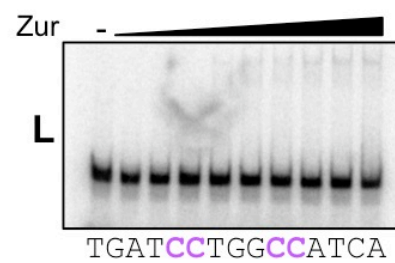
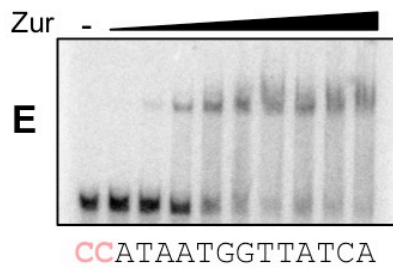
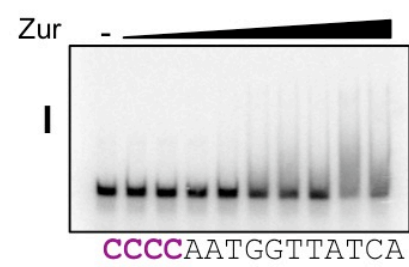
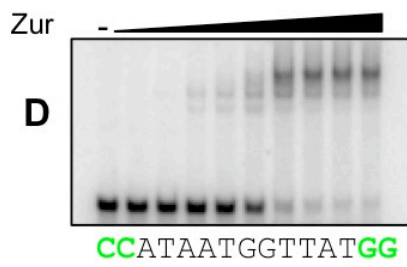
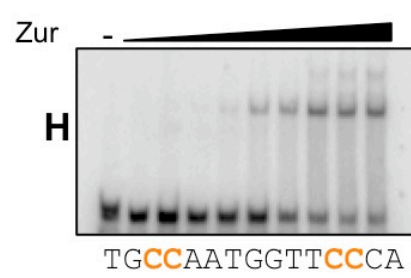
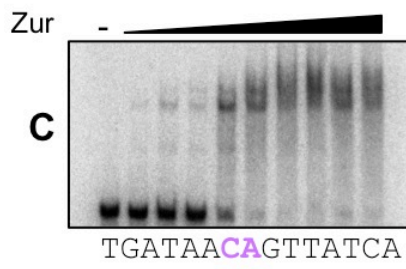
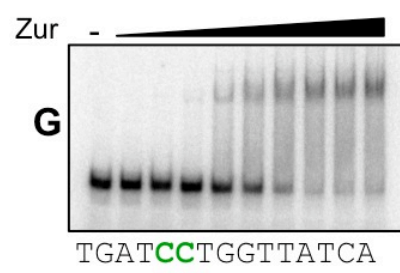
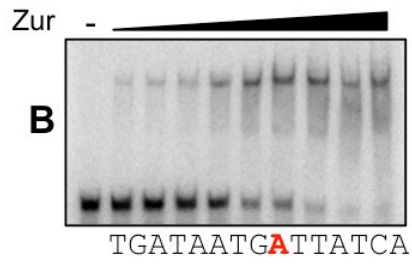
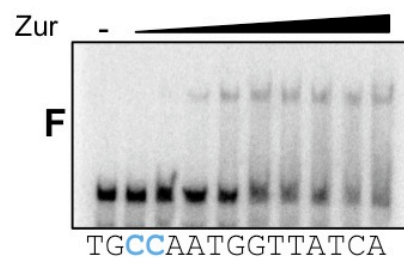
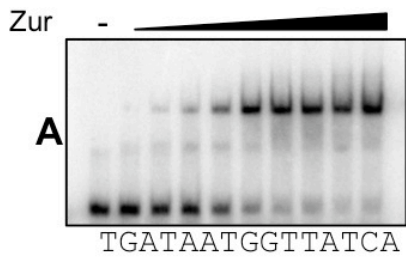
un fuerte impacto negativo sobre la afinidad de Zur por el fragmento de DNA, lo que indica que Zur es una proteína con una alta especificidad de secuencia. Las mutaciones en las posiciones 0-1 disminuyen alrededor de veinte veces la afinidad de Zur. La mutación de los nucleótidos en las posiciones 2-3, 4-5 y 6-7 aumentan la K_d en dos órdenes de magnitud, aunque la mutación de los nucleótidos en las posiciones 6-7 muestran repetitivamente un efecto menor que las otras. La mutación de nucleótidos en posición simétrica muestran un efecto aditivo, excepto la mutación de los nucleótidos situados en las posiciones 6-7. Aunque en algunos casos no se pudo calcular la K_d debido a la baja afinidad de Zur por el fragmento mutado, el impacto de la mutación se puede estimar del desplazamiento de la gráfica hacia la derecha (Fig. 3.20M). Por otra parte, se analizó la contribución de las secuencias flanqueantes del palíndromo a la unión de Zur. Para ello se produjo una versión del fragmento del promotor de *all4725*, mediante alineamiento de oligonucleótidos parcialmente solapantes, en los que se habían mutado los 4 nucleótidos aguas arriba y los 4 nucleótidos aguas abajo de la secuencia 7-1-7 (Fig. 3.21). Estas mutaciones disminuyen la K_d de Zur por el fragmento alrededor de 20 veces, lo que indica que las secuencias flanqueantes del palíndromo 7-1-7 son importantes para la unión de Zur al DNA (Fig. 3.21).

De acuerdo con los resultados descritos se pudo deducir la secuencia consenso de unión de Zur en *Anabaena* 7120 que es la que se muestra en la Fig 3.21. Una vez conocida la secuencia de unión de Zur al DNA se pudo localizar ésta en los promotores a los que se une Zur. En los promotores de *all4725* y *all4723* encontramos respectivamente las secuencias TGATAATGGTTATCA y TGATAACGATTCTCA solapando con la posible caja -10 y con el tsp, lo que resulta ser una posición compatible con un papel represor de Zur. En el caso de *all4721* no se encontraron secuencias que se ajusten al consenso, lo cual es compatible con la débil unión de Zur al fragmento de este promotor observada en EMSA. En un esfuerzo por detectar secuencias con una cierta similitud a la secuencia consenso se pudieron señalar dos secuencias parcialmente solapantes que solapan a su vez con la posible caja -10 y el tsp de *all4721*, TGATTAAGAAGTGTT y TAAGAAGTGTTAAGT. Se realizaron experimentos para determinar los valores de K_d de Zur por los fragmentos de los promotores de *all4723* y *all4721* utilizando de 0.1 a 0.5 fmol de fragmentos marcados de los promotores de *all4723* y *all4721* y concentraciones de Strep-ZUR de 33 pM a 1.6 μ M. La K_d de Zur por el fragmento del promotor de *all4723* es de 6.95 nM (media de dos experimentos independientes), lo que

Resultados

resulta consistente con las desviaciones de esta secuencia respecto al consenso. Para el fragmento del promotor de *all4721*, no fue posible calcular la K_d a pesar de haber utilizado grandes cantidades de proteína debido a la escasa afinidad de Zur para dicho promotor. (Fig. 3.22 A y B). La ausencia de secuencias con alta similitud al consenso de unión de Zur en el fragmento de DNA del promotor de *all4721* y las altas concentraciones de proteína Zur necesarias para observar *in vitro* su unión al fragmento del promotor no permiten descartar que dicha interacción no sea un artefacto de la experimentación, por lo que se debe ser cauto en la interpretación de los resultados.

Resultados



Resultados

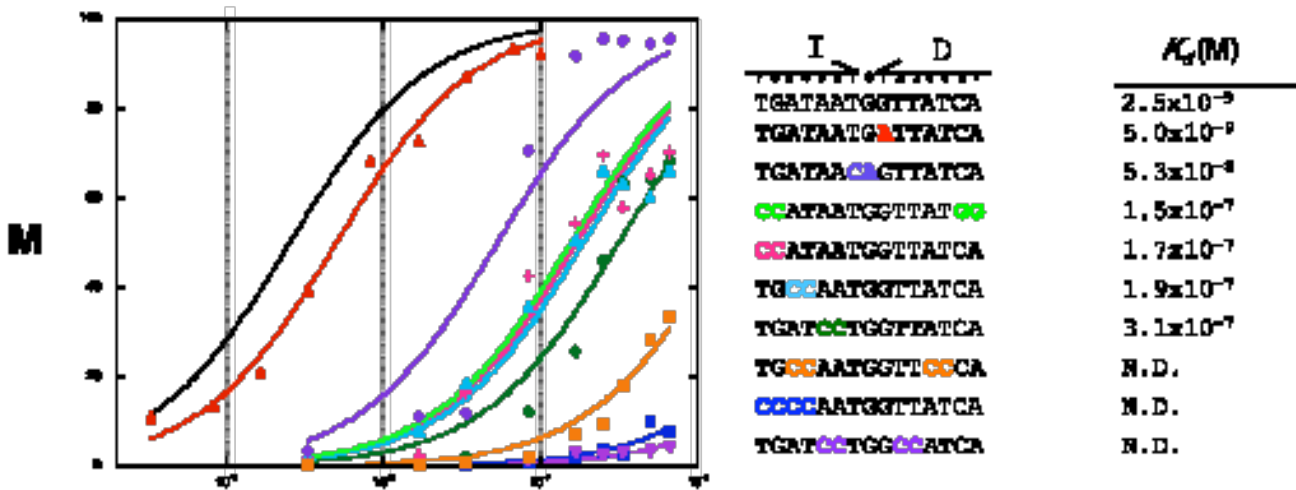


Figura 3.20 Caracterización de la secuencia de unión de Zur mediante ensayos EMSA. De 0.1 a 0.5 fmol de DNA marcado se incubaron 15 minutos a 25 °C en presencia de concentraciones crecientes de Zur en un volumen final de 15 μ l. – indica el control sin proteína. (A y B) calle 2, 0.33 nM Zur, calle 3, 0.8 nM Zur, calle 4, 1.66 nM Zur, calle 5, 3.33 nM Zur, calle 6, 8 nM Zur calle 7, 16.5 nM Zur, calle 8, 33nM Zur, calle 9, 65 nM Zur, calle 10, 100nM Zur. (C,D,E,F,G,H,I,L) calle 2, 3.33 nM Zur, calle 3, 16.5 nM Zur, calle 4, 33 nM Zur, calle 5, 83 nM Zur, calle 6, 165 nM Zur calle 7, 250 nM Zur, calle 8, 350 nM Zur, calle 9, 0.5 μ M Zur, calle 10, 0.65 μ M Zur. (M) Gráfico obtenido ajustando el porcentaje de señal correspondiente a la banda retrasada a una versión simplificada de la ecuación de Hill. En la parte derecha del panel se indican los valores calculados de K_d y sus respectivas secuencias.

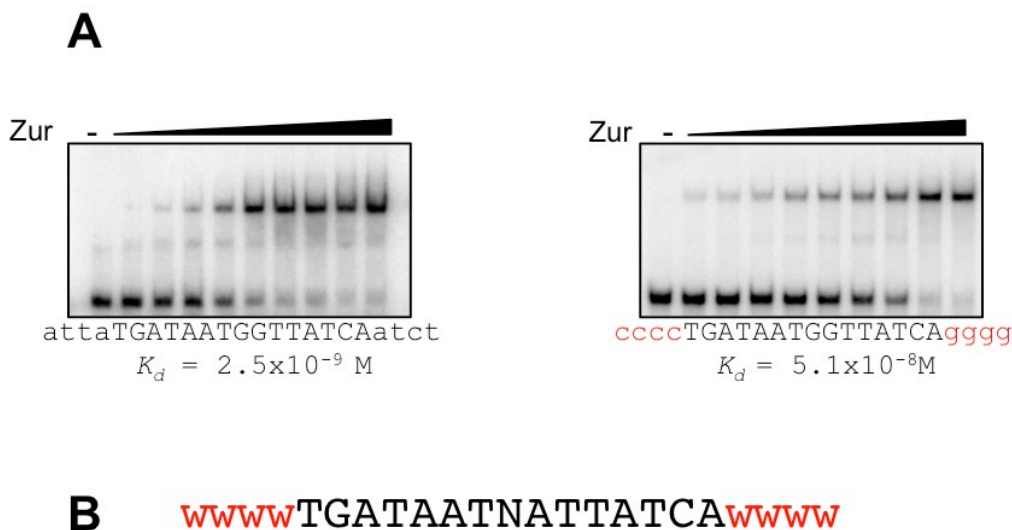


Figura 3.21 Ensayos de EMSA para determinar la contribución relativa de las secuencias flanqueantes al sitio de unión de ZUR. (A) De 0.1 a 0.5 fmol de DNA marcado se incubaron 15 minutos a 25 °C en presencia de concentraciones crecientes de Zur en un volumen final de 15 μ l. – indica el control sin proteína. Panel de la izquierda: calle 2, 0.33 nM Zur, calle 3, 0.8 nM Zur, calle 4, 1.66 nM Zur, calle 5, 3.33 nM Zur, calle 6, 8 nM Zur, calle 7, 16.5 nM, calle 8, 33nM Zur, calle 9, 65 nM Zur, calle 10, 100 nM Zur. Panel de la derecha: calle 2, 1.66 nM Zur, calle 3, 3.33 nM Zur, calle 4, 16 nM Zur, calle 5, 25 nM Zur, calle 6, 33 nM Zur, calle 7, 83 nM Zur, calle 8, 166 nM Zur, calle 9, 250 nM Zur, calle 10, 333 nM Zur. Debajo de cada panel se indican las secuencias de DNA utilizadas y los valores de K_d obtenidos. (B) Secuencia consenso de unión de Zur determinada empíricamente. w indica A o T. N indica cualquier nucleótido.

Resultados

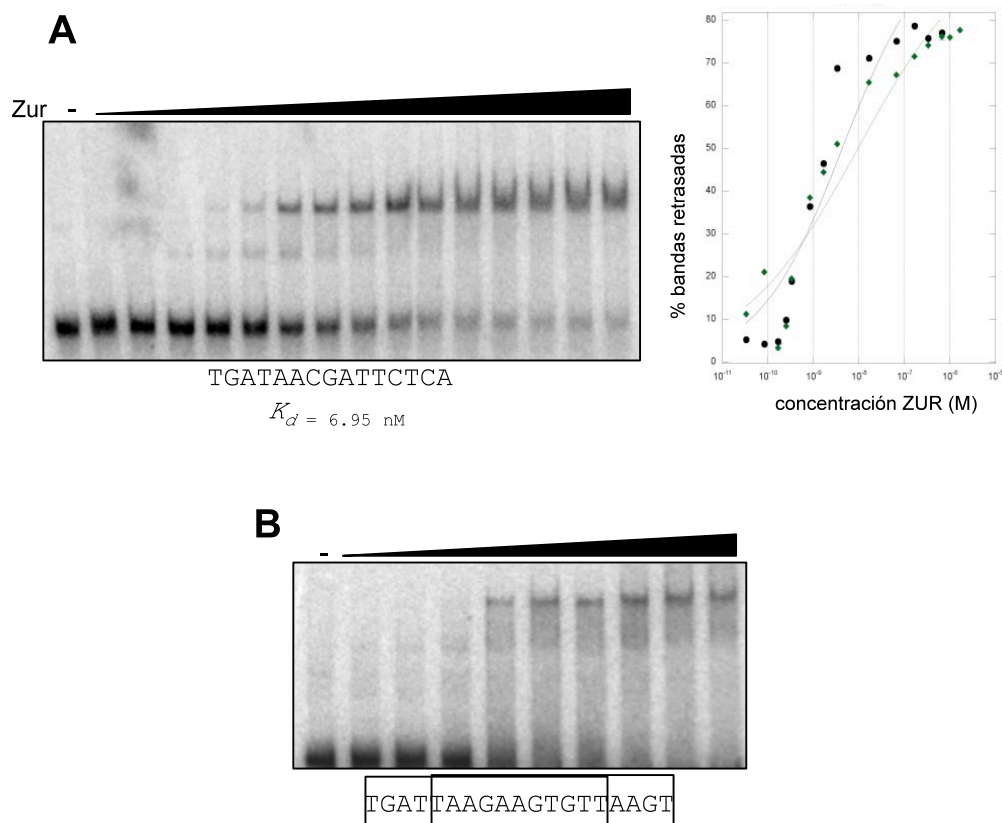


Figura 3.22 Determinación de la K_d de Zur para los promotores de *all4723* y *all4721*.(A) Determinación de la K_d de Zur para el promotor de *all4723* por EMSA. De 0.1 a 0.5 fmol de DNA marcado se incubaron 15 minutos a 25 °C en presencia de concentraciones crecientes de Zur en un volumen final de 15 μ l. – indica el control sin proteína. Panel de la izquierda: calle 2, 0.033 nM Zur, calle 3, 0.083 nM Zur, calle 4, 0.16 nM Zur, calle 5, 0.25 nM Zur, calle 6, 0.33 nM Zur, calle 7, 0.83 nM Zur, calle 8, 1.6 nM ZUR, calle 9, 3.33 nM ZUR, calle 10, 16 nM ZUR, calle 11, 66 nM ZUR, calle 12, 166 nM ZUR, calle 13, 333nM Zur, calle 14, 666 nM Zur, calle 15 1.0 μ M Zur, calle 16, 1.6 μ M. Debajo del panel se muestra la secuencia de DNA utilizado en el experimento y el valor de K_d obtenido. En el panel de la derecha se muestra el grafico obtenido ajustando los porcentajes de bandas retrasadas a una versión simplificada de la ecuación de Hill. (B) Ensayos de EMSA para determinar la K_d de Zur para el promotor de *all4721*. De 0.1 a 0.5 fmol de DNA marcado se incubaron 15 minutos a 25 °C en presencia de concentraciones crecientes de ZUR en un volumen final de 15 μ l. – indica el control sin proteína. calle 2, 3.3 nM Zur, calle 3, 16 nM Zur, calle 4, 33 nM Zur, calle 5, 83 nM Zur, calle 6, 166 nM Zur, calle 7, 333 nM Zur, calle 8, 666 nM Zur, calle 9, 1 μ M Zur, calle 10, 1.6 μ M Zur. Debajo de los paneles se indican las dos secuencias imperfectas y parcialmente solapantes que se incluyen en el fragmento ensayado y que podrían corresponder con dianas de unión de Zur.

Resultados

3.13 Caracterización funcional de los promotores del operón

Los resultados obtenidos sobre la regulación del operón *all4725-all4721* indican que:

- a. La expresión de los genes del operón se induce por deficiencia de zinc que se puede mimetizar mediante adición de TPEN a los cultivos.
- b. El operón contiene 4 promotores, uno se encuentra delante del primer gen (*all4725*) y los tres promotores internos se encuentran delante de los genes *all4723*, *all4722* y *all4721*. A partir de este punto denominaremos a estos promotores P5, P3, P2 y P1 respectivamente.
- c. La proteína reguladora Zur se une con alta afinidad y de manera dependiente de zinc a P5 y P3 y podría unirse con muy baja afinidad al promotor P1.

Estos resultados permiten diseñar un esquema general sobre la regulación del operón *all4725-all4721*, según el cual Zur reprimiría la expresión del operón en condiciones de suficiencia de zinc uniéndose sobre los promotores P5 y P3. En condiciones de deficiencia de zinc (adición de TPEN), Zur se disociaría permitiendo el acceso de la polimerasa a estos promotores y el inicio de la transcripción desde ellos. Entre los múltiples aspectos por aclarar se encuentran cómo se regula el promotor P2 y si realmente Zur regula el promotor P1. Para obtener información detallada sobre cuál es la contribución individual de cada promotor a la expresión del operón se decidió analizar la actividad de los promotores mediante la técnica de extensión del cebador (*primer extension*). En primer lugar se analizó si los promotores P2 y P1, a los que no se une Zur o lo hace con muy baja afinidad, responden a la deficiencia de zinc (que mimetizamos mediante la adición de TPEN al medio). Para ello, RNA de *Anabaena* 7120 cultivada a 30°C durante 24 horas en medio BG11 suplementado o no con 20 µM TPEN se alineó con los oligonucleótidos 22R o 21R marcados con ³²P, que alinean respectivamente con las regiones 5' de los genes *all4722* y *all4721*, y se sometió a retrotranscripción. Los productos de la reacción se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-urea. En figura 3.23B se muestran señalados con una flecha los productos de extensión localizados en las posiciones correspondientes a los tsps de P2 y P1 previamente identificados en los experimentos de 5'-RACE. La intensidad de las bandas es notablemente menor en las calles correspondientes a las muestras no tratadas y aumenta en las muestras incubadas con TPEN. Esto indica que estos dos promotores se inducen por la deficiencia de cationes divalentes provocada por el efecto

Resultados

quelante del TPEN y sugieren la implicación de algún regulador (Fig. 3.23). Para comprobar si Zur pudiera estar involucrado directa o indirectamente en la regulación de estos promotores se realizaron experimentos de extensión del cebador en los que se utilizó, RNA de células de *Anabaena* y del mutante *zur* (MN38, que se describe en 3.10) cultivadas en presencia o ausencia de 20 μ M TPEN durante 24 horas. El RNA aislado se sometió a análisis de extensión del cebador utilizando los oligonucleótidos 25R, 23R, 22R y 21R que alinean respectivamente con *all4725*, *all4723*, *all4722* y *all4721*. Los productos de las reacciones se resolvieron en un gel de poliacrilamida-urea que se muestra en figura 3.24B. Como cabía esperar, los productos de extensión correspondientes a los promotores P5 y P3, que unen Zur con alta afinidad, son muy abundantes en el silvestre sólo en condiciones de inducción mientras que en el mutante *zur* (MN38) son constitutivamente muy elevados (similares a los del silvestre en condiciones de inducción) (Fig. 3.24B, calles 1-8). Estos resultados corroboran resultados anteriores que indican un papel represor de Zur en estos promotores. Para nuestra sorpresa, los productos de extensión correspondientes a los promotores P2 y P1 mostraban un comportamiento similar (Fig. 3.24B, calles 9-16). Este resultado induce a pensar en la implicación de Zur en la regulación de estos promotores, lo que contrasta con la baja o nula afinidad de la proteína por el DNA de estos promotores que sugiere a su vez que, de estar involucrado, Zur probablemente actuaría de forma indirecta sobre ellos.

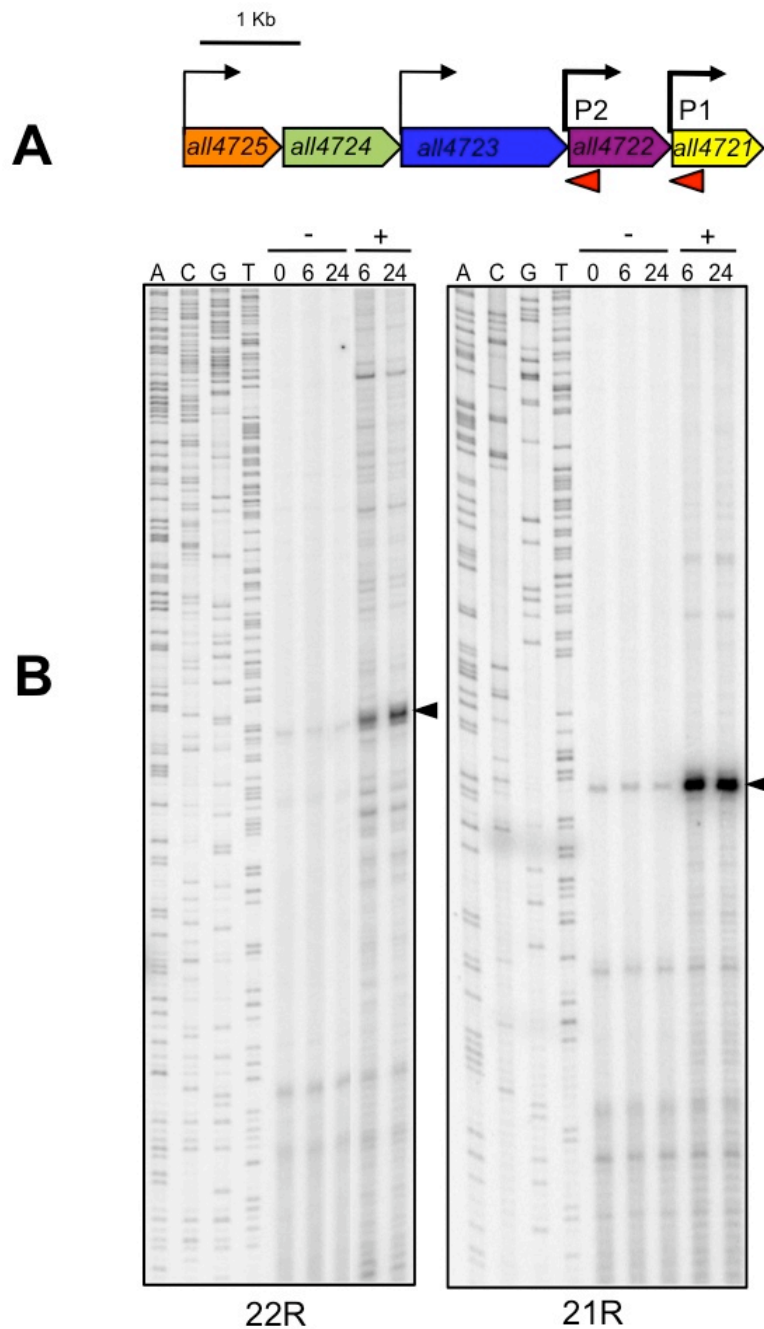


Figura 3.23 Análisis de extensión del cebador de los promotores P2 y P1 en condiciones de deficiencia de cationes divalentes (A) Representación esquemática del operón *all4725-all4721*. Las flechas en ángulo recto señalan los promotores mapeados por 5'-RACE. Las que están en trazo más grueso indican los promotores analizados en B. Las flechas rojas indican los oligonucleótidos utilizados para el experimento. (B) RNA aislado de células de *Anabaena* 7120 cultivadas en medio BG11 suplementado o no con TPEN 20 μ M durante el periodo de tiempo que se indica en la parte superior del panel se sometió a análisis de primer extension utilizando los oligonucleótidos 22R (panel de la izquierda) y 21R (panel de la derecha). Las flechas negras indican la posición esperada para productos de extensión de los transcritos que se inician en los promotores P2 y P1. En la parte izquierda de cada panel se muestran las reacciones de secuenciación obtenidas con los mismos oligonucleótidos utilizados para los ensayos de extensión del cebador.

Resultados

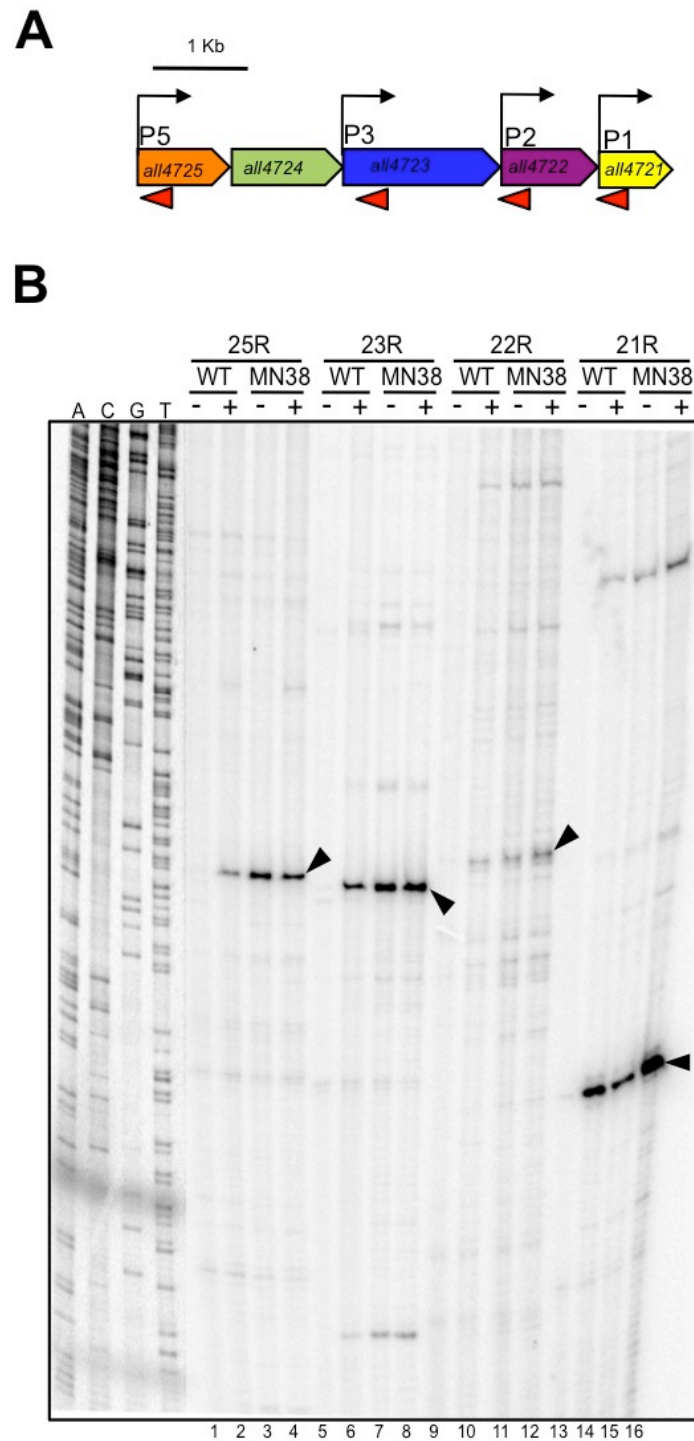


Figura 3.24 Análisis de los promotores del operón *all4725-all4721* en un mutante *zur* mediante ensayos de extensión del cebador. (A) Representación esquemática del operón *all4725-all4721*. Las flechas en ángulo recto indican los promotores analizados. Las flechas rojas indican los oligonucleótidos utilizados en los ensayos. (B) RNA aislado de células de *Anabaena* y del mutante MN38 cultivadas a 30°C durante 24 horas en medio BG11 suplementado o no con TPEN 20 μ M se sometió a ensayos de extensión del cebador con los oligonucleótidos que se indican en la parte superior del panel. Las flechas negras indican la posición esperada para productos de extensión de los transcritos que se inician en los promotores P5, P3, P2 y P1. En la parte izquierda del panel se muestra una reacción de secuenciación realizada con el oligonucleótido 21R.

Resultados

3.15 La inserción de una cassette de resistencia a antibióticos suprime la inducción de los promotores de *all4722* y *all4721*.

Para indagar en la regulación de los promotores P2 y P1 se analizó su funcionamiento en el mutante MN8 que lleva una cassette de resistencia a antibióticos insertada en el gen *all4723* (*thrS2*) (ver detalles de la construcción en el apartado 3.4.). En primer lugar se realizó un experimento de Northern blot con RNA de células de *Anabaena* 7120 o del mutante MN8 cultivadas a 30°C durante 24 horas en medio BG11 suplementado o no con 20 µM TPEN. Como se observa en la figura 3.25, la hibridación con una sonda específica del gen *all4724*, situado aguas arriba de la inserción muestra que la expresión del gen en el mutante es similar a la que se observa en el silvestre, esto es, baja en ausencia y alta en presencia de TPEN. Por el contrario, las hibridaciones con las sondas de *all4722* y *all4721*, situados aguas abajo de la inserción, muestran que en el mutante la expresión es siempre baja, incluso en presencia de TPEN (Fig. 3.25B).

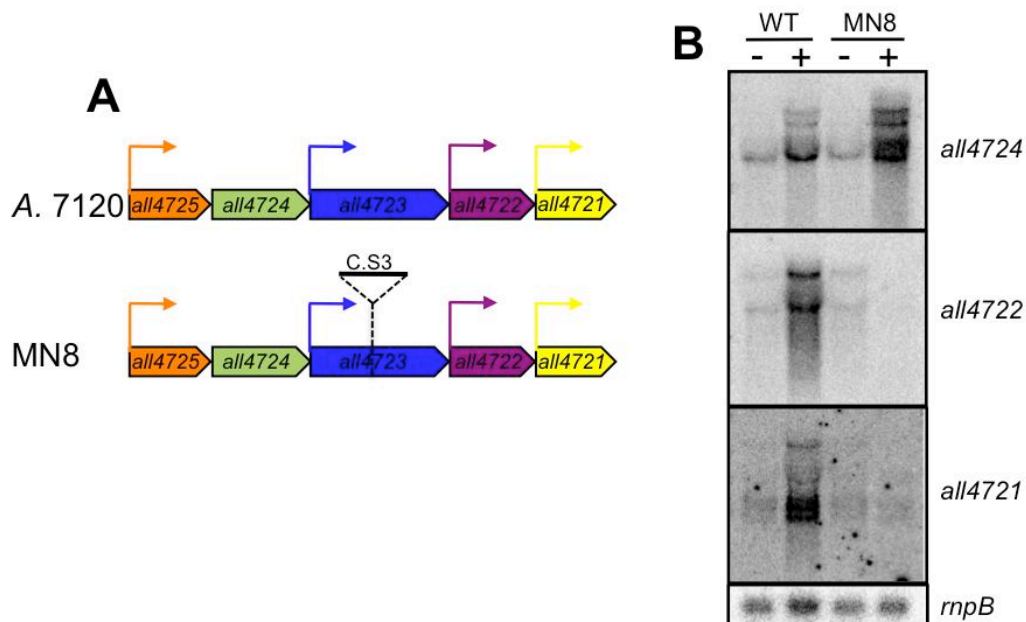


Figura 3.25 Análisis mediante Northern blot de la expresión de genes del operón *all4725-all4721* en el mutante insercional MN8. (A) Representación esquemática del operón *all4725-all4721* en *Anabaena* silvestre y en la estirpe MN8. Las flechas en ángulo recto representan los promotores del operón. Cada promotor y el gen situado inmediatamente aguas abajo se representan con el mismo color. (B) RNA aislado de células de *Anabaena* silvestre (WT) y de la estirpe MN8 se cultivaron durante 24 horas en medio BG11 suplementado (+) o no (-) con TPEN se hibridó mediante Northern blot con sondas de los genes que se indican a la derecha del panel. En la parte inferior se muestra la hibridación con el gen *rnpB* utilizado como control de carga.

3.16 La inducción de *all4722* y *all4721* no depende de *All4723*

La falta de inducción de *all4722* y *all4721* en el mutante MN8 podría explicarse si el producto del gen *all4723*, inactivado en el mutante, fuese necesario para la activación de los promotores P2 y P1. Esta hipótesis no carecía de sentido ya que como se ha descrito con anterioridad el producto proteico de *all4723* es una treonil tRNA-sintetasa y muchas proteínas de esta familia son consideradas proteínas de función múltiple (*moonlight proteins*), es decir, proteínas que, además de desempeñar su papel canónico en la producción de tRNAs cargados, realizan otras funciones, entre las que se incluye la activación de la transcripción (Guo et al, 2010a). Además se ha descrito que la ThrRS de *E. coli* es una proteína moonlight que autorregula su expresión controlando la traducción de su propio mRNA (Caillet et al, 2003). Para verificar esta hipótesis se generó una estirpe mutante que se denominó MN42 en la que la ORF *all4723* se eliminó por delección. Para ello se amplificó a partir de DNA genómico de *Anabaena*, utilizando los oligonucleótidos 24STREP-1F y 22DEL-1R, un fragmento de DNA de 3.5 Kb que contenía la región 3' de *all4724*, la ORF *all4723* y la región 5' de *all4722*. Este fragmento se clonó en el vector de clonación pBluescript SK+ digerido con *XhoI* y *BamHI* produciendo el plásmido pCMN32. Este plásmido se utilizó como molde de una reacción de PCR con los oligonucleótidos divergentes 22DEL-1F y 24DEL-1R, con la que se generó un producto lineal en el que se había delecionado la ORF *all4723*. Tras fosforilar sus extremos 5', el producto de amplificación se religó produciendo el plásmido pCMN41. El inserto de pCMN41 se transfirió al plásmido conjugativo pRL278 cortado con *BamHI* y *XhoI*, obteniendo el plásmido pCMN42 que se introdujo en *Anabaena* mediante conjugación triparental. Las colonias ex-conjugantes que habían integrado el plásmido en el cromosoma por recombinación simple se seleccionaron en medio BG11 sólido suplementado con estreptomomicina y espectinomicina que son los marcadores de resistencia de plásmido, se cultivaron en medio BG11 líquido y se sometieron a varios ciclos de fragmentación por sonicación y crecimiento en medio líquido. Tras esta fase de segregación durante varias generaciones se procedió a la extracción de DNA genómico y se comprobó la estructura genómica de los clones ex-conjugantes por PCR. Algunas colonias ex-conjugantes segregadas portadoras de la inserción se sometieron a fragmentación por sonicación y se sembraron en medio con sacarosa al 5%, lo que permite la contraselección del marcador *sacB* del plásmido y la selección de clones que han integrado la mutación de delección de *all4723*. La

Resultados

segregación de estas colonias se comprobó mediante PCR utilizando dos diferentes parejas de oligonucleótidos (Fig. 3.26). En la que se denomina PCR 1 se utilizaron los oligonucleótidos ALL4724-2F y ALL4723-5R que deben producir un fragmento de 414 bp en la estirpe silvestre y ningún producto de amplificación en el mutante, ya que en éste la secuencia con la que aparece ALL4723-5R ha sido eliminada. En la PCR 2 se utilizaron los oligonucleótidos ALL4724-2F y ALL4722-6F que deben producir un fragmento de 2379 bp en la estirpe silvestre y de 541 en el mutante. Para algunos clones se observaron los productos de PCR esperados, con lo que pudimos concluir que en tales colonias la mutación estaba segregada. (Fig. 3.26). Una de estas estirpes se denominó MN42 y se utilizó, junto con *Anabaena* 7120, en un experimento de Northern blot similar al descrito previamente. Como se muestra en figura 3.27B los niveles de transcrito en presencia y ausencia de TPEN de los genes *all4724*, *all4722* y *all4721* son similares a los observados en el silvestre, si bien, en el caso de *all4721*, los niveles de transcrito en presencia de TPEN en el mutante son más altos que en el silvestre. Este resultado demuestra que la integridad de la ORF *all4723* no es necesaria para la expresión de los genes situados aguas abajo y descarta una implicación de su producto en la activación de los promotores de dichos genes.

Para completar el estudio de la regulación de *all4722* y *all4721* en los mutantes MN8 y MN42 se decidió analizar el funcionamiento de los promotores P2 y P1 mediante experimentos de extensión del cebador. RNA de *Anabaena* y de los mutantes MN8 y MN42 cultivados durante 24 horas en presencia o ausencia de 20 μ M TPEN, se alineó y retrotranscribió con los oligonucleótidos 22R y 21R y los productos de extensión se resolvieron en geles de poliacrilamida-urea. En figura 3.28B se muestra que en la estirpe MN8, a diferencia del silvestre, los niveles de los transcritos que se inician en los promotores P2 y P1 son basales tanto en ausencia como en presencia de TPEN, lo cual es compatible con lo observado por Northern e indica que en dicho mutante estos promotores no se inducen. Es importante destacar que este resultado indica que el promotor P1 no está regulado directamente por Zur, ya que de ser así habríamos esperado ver inducción en el mutante.

Por otro lado, en el mutante MN42 no pudimos analizar el funcionamiento del promotor P2 ya que al encontrarse localizado dentro de la ORF *all4723* había sido eliminado en la deleción. Sin embargo sí se pudo analizar el funcionamiento del promotor P1. En la Figura 3.28B se observa como los transcritos que se inician en este promotor muestran

Resultados

niveles similares en el mutante MN42 y en el silvestre en ausencia y presencia de TPEN. Esto indica que la integridad de la ORF *all4723* no es necesaria para el correcto funcionamiento del promotor P1, lo que descarta cualquier papel de su producto como activador de este promotor. En su conjunto, los resultados anteriores sugieren que el funcionamiento de los promotores P2 y P1 puede estar influenciado por la transcripción de promotores situados aguas arriba, P5 y P3. Esta afirmación se sustenta en las siguientes observaciones: (1) el patrón de regulación de los promotores P2 y P1 es similar al de los promotores P5 y P3 en *Anabaena*, esto es, responden a la adición de TPEN y se muestran constitutivamente desreprimidos en un mutante *zur* (MN38) (Fig. 3.23y 3.24), si bien Zur no parece unirse de forma directa a estos dos últimos promotores; (2) la inserción de una cassette con un terminador de la transcripción en la zona central del operón desacopla el funcionamiento de los promotores P2 y P1 (que quedan aguas abajo de la inserción) del funcionamiento de P5 y P3 que quedan aguas arriba (Fig. 3.28); (Liang et al) La delección del gen *all4723* (*thrS2*) destruido por la inserción no tiene el mismo efecto desacoplante (Fig. 3.28).

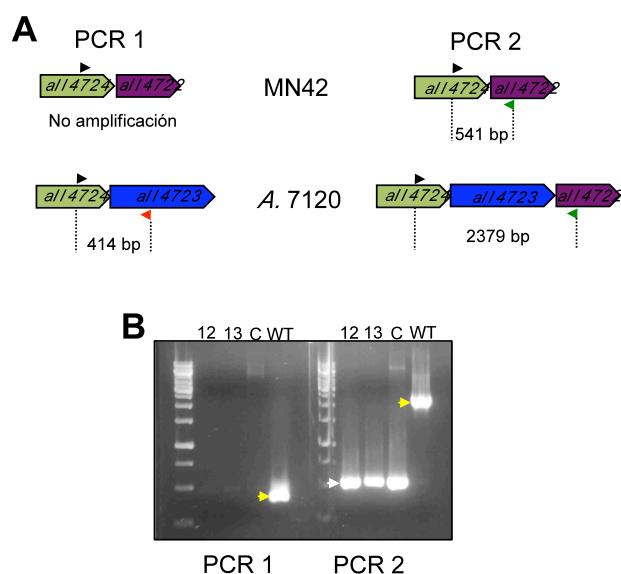


Figura 3.26 Comprobación de la estructura cromosómica del mutante MN42. (A) Diagrama explicativo de las reacciones de PCR realizadas. En la parte superior se representa un esquema de la estructura genómica del mutante MN42, en la parte inferior se representa un esquema de la estructura genómica de la estirpe silvestre. Las flechas negras indican el oligonucleótido *all4724*-2F; las flechas rojas indican el oligonucleótido *all4723*-5R; las flechas verdes indican el oligonucleótido *all4722*-6R. (B) DNA genómico de dos colonias mutantes (12 y 13), DNA plasmídico del pCMN42 y DNA genómico de *Anabaena* 7120 (WT) se utilizaron como molde para dos reacciones de amplificación independientes utilizando los oligonucleótidos que se representan en A. Las flechas amarillas indican las bandas silvestres; la flecha blanca indica las bandas mutantes

Resultados

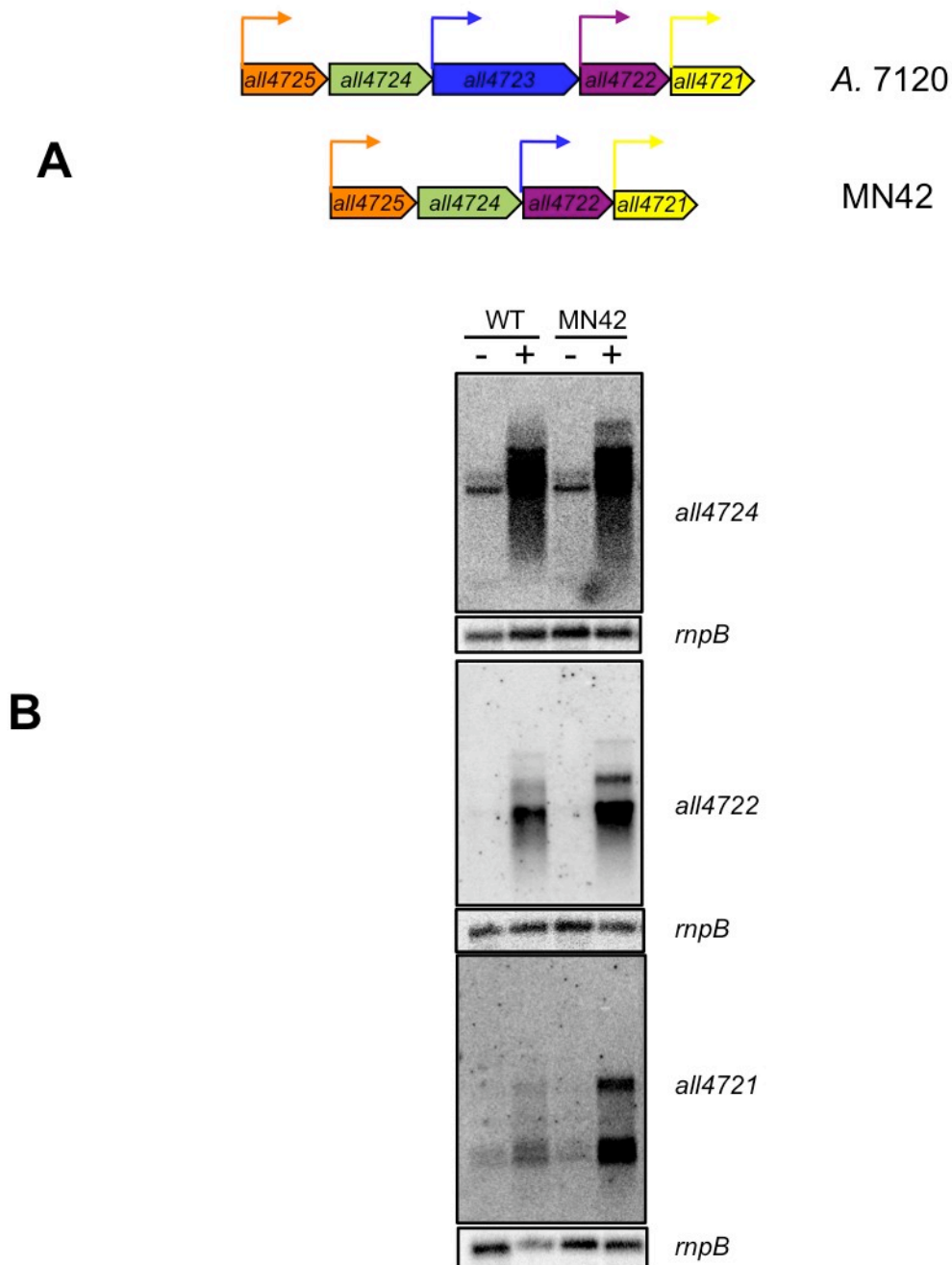


Figura 3.27 Análisis por Northern blot de la expresión de genes del operón *all4725-all4721* en el mutante MN42 . (A) Representación esquemática del operón *all4725-all4721* en *Anabaena silvestre* y en la estirpe MN42. Las flechas en ángulo recto representan los promotores del operón. Cada promotor se muestra en el mismo color que el gen situado inmediatamente aguas abajo en el silvestre. En la estirpe MN42 *all4722* se encuentra aguas abajo del promotor P3 (flecha azul). (B) RNA de células de *Anabaena silvestre* (WT) y de la estirpe MN42 cultivadas durante 24 horas en medio BG11 suplementado (+) o no (-) con TPEN se hibridó con sondas de los genes que se indican a la derecha del panel. Bajo cada panel se muestran las hibridaciones con el gen *rnpB* utilizado como control de carga.

Resultados

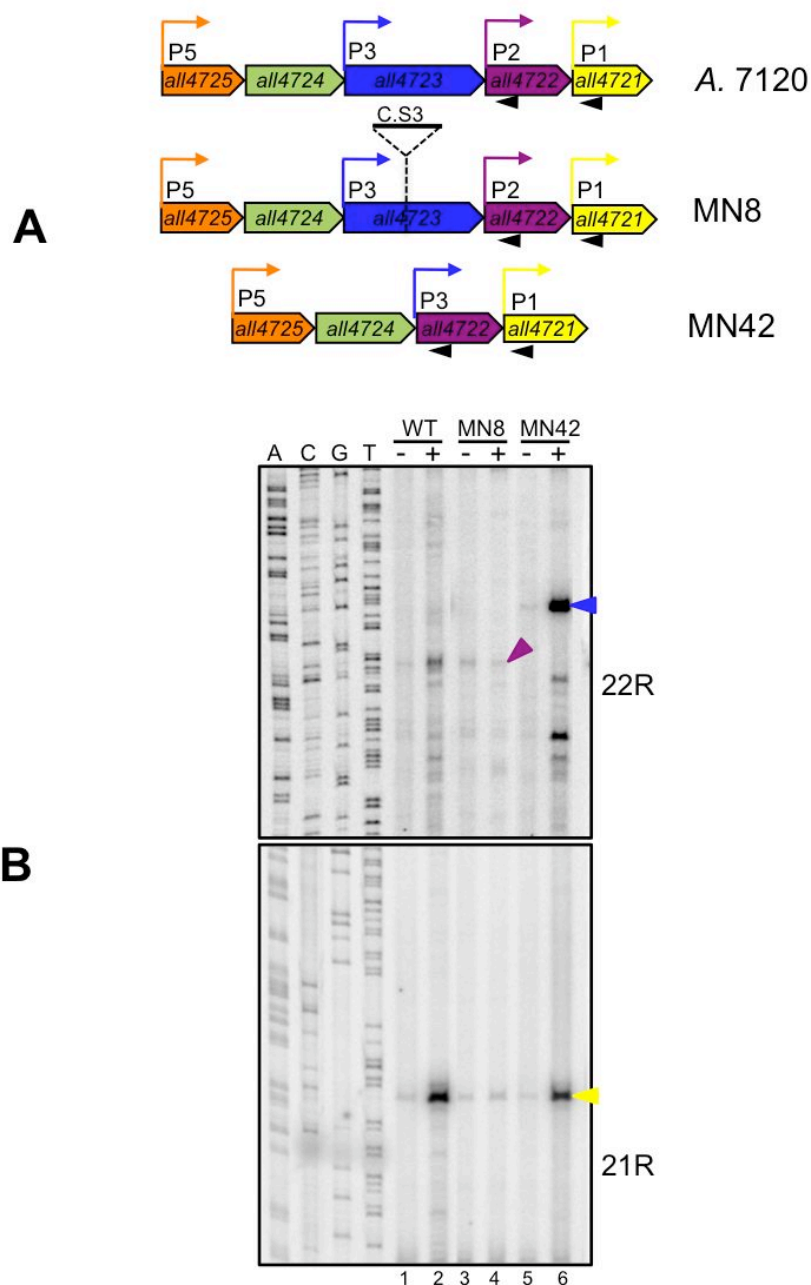


Figura 3.28 Análisis mediante ensayos de extensión del cebador de la regulación de los promotores P2 y P1 en los mutantes MN8 y MN42. (A) Representación esquemática del operón *all4725-all4721* en *Anabaena* 7120 y en las estirpes MN8 y MN42. Las flechas en ángulo recto representan los promotores del operón. Cada promotor se representa en el mismo color que el gen situado inmediatamente aguas abajo en la estirpe silvestre. En la estirpe MN42, *all4722* se encuentra aguas abajo del promotor P3 (flecha azul). Las flechas negras indican los oligonucleótidos utilizados como cebadores en B. (B) RNA extraído de células de *Anabaena* silvestre (WT) y de las estirpes MN8 y MN42 tratadas (+) o no tratadas con TPEN (-) se sometió a ensayos de extensión de cebador utilizando los oligonucleótidos 21R y 22R. Las flechas indican las posiciones esperadas para productos de extensión correspondientes a transcritos que se inician en el promotor P1 (flecha amarilla), P2 (flecha morada) y P3 (flecha azul). En la parte izquierda de cada panel se muestran las reacciones de secuenciación generadas con los mismos oligonucleótidos utilizados para los ensayos de extensión del cebador.

Resultados

3.17 Los promotores de *all4722* y *all4721* adoptan el patrón de regulación de un promotor insertado aguas arriba

Para verificar la hipótesis que se expone arriba, se generó la estirpe mutante MN52, en la cual el promotor P3 se sustituyó por el promotor *nir* (*Pnir*) del operón *nirA*, *nrtABCD*, *narB* de *Anabaena* 7120. El promotor *nir* responde a la fuente de nitrógeno disponible en el medio, siendo su actividad transcripcional más alta en medios que contienen nitrato que en medios que contienen amonio (Frias et al, 2000). Para la construcción de la estirpe MN52 se amplificó a partir de DNA genómico de *Anabaena*, utilizando los oligonucleótidos A7120THRS2-1F y A7120THRS2-1R, un fragmento de DNA de 1.8 kb correspondiente a la ORF *all4723* (*thrS2*), que posteriormente se clonó en el plásmido pCMN28b cortado con *NdeI* y *XhoI*, generando el plásmido pCMN20. Posteriormente, un fragmento de DNA de 144 pb correspondiente a una porción del promotor *nir*, obtenido por PCR utilizando los oligonucleótidos NIR-2F y NIR-1R, se clonó en los sitios *BglII* y *NcoI* del pCMN20, generando el plásmido pCMN49. El inserto del pCMN49 se transfirió al pRL278 digerido con *BamHI* y *XhoI*, produciendo el plásmido pCMN52 que se introdujo en *Anabaena* 7120 por conjugación triparental. Se seleccionaron clones que hubieran integrado el plásmido por recombinación simple y su estructura cromosómica se confirmó por PCR. Uno de estos clones se seleccionó para futuros análisis y se denominó MN52.

En primer lugar, se analizó la expresión de los genes del operón *all4725-all4721* en *Anabaena* 7120 y el mutante MN52 mediante Northern blot utilizando RNA de células de *Anabaena* y de MN52 cultivadas durante 24 horas en medio BG11 (que contiene NaNO_3) o en medio BG11₀ suplementado con 5 mM NH_4Cl /TES. Como control, una de las membranas se hibridó con una sonda específica del gen *nirA* que informa del patrón de regulación esperado para el promotor de dicho gen tanto en la estirpe silvestre como en MN52. Como se observa en la figura 3.29B, *nirA* muestra un nivel de transcrito más elevado en medio con nitrato que en medio con amonio. Por otra parte, se observa que en la estirpe silvestre el nivel de expresión de los genes del operón es basal independientemente de la fuente de nitrógeno. Lo mismo ocurre en la estirpe MN52 para los genes situados aguas arriba del *Pnir*, *all4725* y *all4724*, en cambio, los genes situados aguas abajo de este promotor, mostraban un patrón de regulación similar al de

Resultados

nirA, si bien en nivel de transcritos de estos genes en amonio era algo superior al observado para *nirA*.

La actividad de los promotores P2 y P1 y del promotor *Pnir* insertado aguas arriba de *all4723* (*thrS2*) se analizó también mediante ensayos de extensión del cebador. Para el experimento se utilizó RNA aislado de células de *Anabaena* y MN52 cultivadas durante 24 horas en medio con nitrato o amonio. Para el análisis de P2 y P1 se utilizaron los oligonucleótidos 22R y 21R respectivamente. Para el estudio del *Pnir* se utilizó el oligonucleótido 23R. Los productos de extensión se resolvieron en un gel de poliacrilamida-urea. En Figura 3.29C se muestra el resultado de la electroforesis. En la estirpe silvestre la intensidad de los productos de extensión obtenidos con 23R y con 22R es muy baja, casi indetectable, y no varía según la fuente de nitrógeno utilizada. En esta misma estirpe, los productos de extensión aparecen algo más intensos cuando se utiliza 21R pero no se observan importantes diferencias de intensidad según la fuente de nitrógeno. En las calles correspondientes al mutante MN52 se ve que los productos de extensión obtenidos con 23R y 22R son más intensos en las muestras incubadas con nitrato que en las incubadas con amonio. Las bandas correspondientes a los productos de extensión obtenidos con 21R son más intensas en el mutante MN52 con respecto a las del silvestre, pero de forma repetitiva mostraban una intensidad similar fuera cual fuese la fuente de nitrógeno. Estos resultados indican que la inserción de *Pnir* tiene un impacto notable sobre el funcionamiento de los promotores P2 y P1 y sugieren que estos se ven de alguna forma influenciados en su patrón de expresión por la regulación de los promotores situados aguas arriba.

Resultados

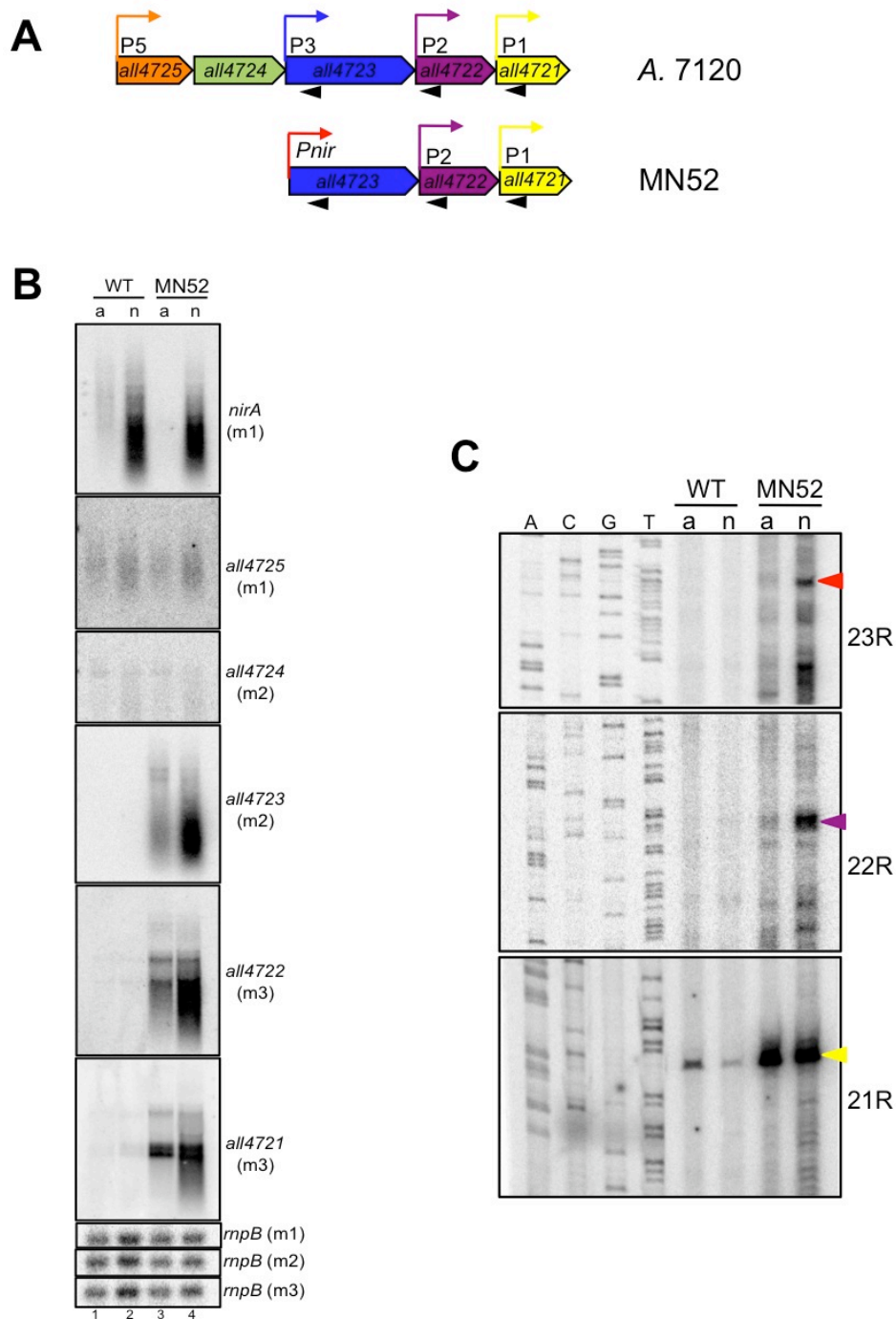


Figura 3.29 Análisis de la regulación de los promotores P2 y P1 en el mutante MN52. (A) Representación esquemática del operón *all4725-all4721* en *Anabaena* 7120 y en MN52. Las flechas en ángulo recto indican los promotores del operón y se representan con el mismo color que el gen situado inmediatamente aguas abajo en la estirpe silvestre. En MN52, *all4723* se encuentra inmediatamente aguas abajo de *Pnir* (flecha roja). Las flechas negras indican los oligonucleótidos que se utilizaron como cebadores en C. (B) RNA de células de *Anabaena* 7120 (WT) y de MN52 cultivadas en medio con nitrato (n) o amonio (a) se hibridó mediante Northern blot con sondas de los genes que se indican a la derecha de cada panel. En la parte inferior se muestran las hibridaciones con el gen *rnpB* utilizado como control de carga. (C) RNA extraído de células de *Anabaena* 7120 (WT) y de MN52 cultivadas en medio con nitrato (n) o amonio (a) se sometió a análisis de extensión del cebador utilizando los oligonucleótidos 21R, 22R y 23R. Las flechas indican las posiciones esperadas para productos de extensión correspondientes a transcritos que inician en P1 (flecha amarilla), P2 (flecha morada) y *Pnir* (flecha roja).

Resultados

3.18 La actividad de los promotores P2 y P1 puede estar controlada por un represor.

Los promotores P2 y P1 contienen secuencias -10 y -35 con un alta similitud a las secuencias consenso de los promotores dependientes del factor sigma-70 (σ^{70}) de la RNA polimerasa de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas (Gruber & Gross, 2003). Las secuencias de P2 son las más similares a las secuencias consenso, presentando un sólo nucleótido distinto en la secuencia de la caja -35. Las secuencias P1 presentan dos diferencias respecto al consenso en la caja -35 y uno en la caja -10 (Fig. 3.30A). En ambos promotores las cajas -35 y -10 están separadas por 17 nucleótidos, que es la distancia óptima descrita para los promotores regulados por σ^{70} . En cianobacterias, los promotores que se ajustan al consenso descrito arriba son reconocidos por la RNA polimerasa con una alta eficacia y presentan un nivel de expresión muy alto (Elhai, 1993), (Huang et al, 2010), (Ferino & Chauvat, 1989). Sin embargo, nuestras observaciones experimentales indicaban que el nivel de los transcritos que se inician en los promotores P2 y P1 era muy bajo en condiciones estándar de cultivo en *Anabaena* 7120. Esta observación nos llevó a formular la hipótesis de que el nivel de expresión de estos dos promotores podría mantenerse a niveles basales en *Anabaena* 7120 mediante represión. Para comprobar esto, fragmentos conteniendo ambos promotores se clonaron en el vector pSB377_1 que contiene los genes *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens* que cifran la enzima luciferasa y las enzimas necesarias para fabricar su sustrato (Winson et al, 1998b). Los fragmentos de los promotores P2 y P1 se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de *Anabaena* 7120, utilizando los oligonucleótidos 4722LUX-1F y 4722LUX-1R o ALL4721-3F y ALL4721-4R. Los plásmidos resultantes, pCMN53 y pCi6 contienen los promotores P2 y P1, respectivamente en la misma orientación de los genes *lux* de forma que la expresión de estos genes se encuentra bajo el control de cada promotor de *Anabaena*. Los plásmidos pCMN53 y pCi6, junto con el plásmido vacío pSB377_1, se transfirieron a *E. coli* DH5 α por transformación. Las tres estirpes generadas se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio LB sólido suplementado con ampicilina y se incubaron 16-24 horas a 37°C, tras lo que se registró la bioluminiscencia como se describe en el apartado 2.8. A diferencia de la estirpe que lleva el plásmido vacío, las dos estirpes que contienen los promotores P2 o P1 mostraban una elevada bioluminiscencia que refleja una alta actividad de estos promotores en *E. coli* (Fig. 3.30B). Este resultado contrasta con la baja actividad basal

Resultados

de P2 y P1 observada en *Anabaena* 7120 sugiere que el supuesto represor que regula su expresión en *Anabaena* 7120 no existe en *E. coli*. Otro indicio a favor de un control por represión del promotor P2 es la presencia de una hipotética secuencia de unión de proteínas cuya localización, solapando parcialmente con la caja -35, sería compatible con un papel represor. Esta secuencia es un palíndromo tipo 7-1-7 casi perfecto que hemos comprobado que *in vitro* no une la proteína Zur (Fig. 3.15).

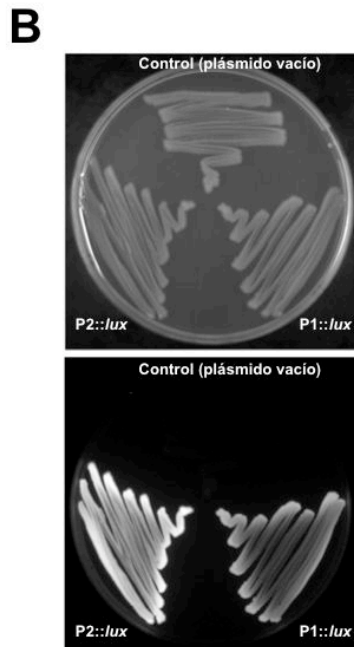
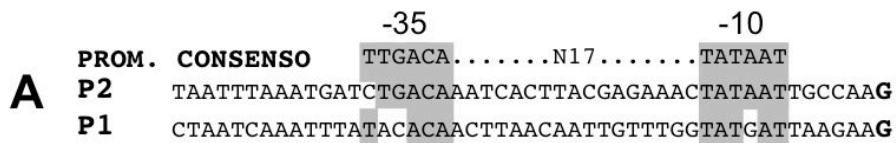


Figura 3.30 Análisis de la actividad de los promotores de *Anabaena* P2 y P1 en *E. coli* (A) Secuencias de los promotores P2 y P1. Los nucleótidos de las cajas -35 y -10 conservados aparecen sombreados. Los puntos de inicio de transcripción se representan en negrita. (B) Una placa de Petri con *E. coli* DH5 α conteniendo el plásmido pSB377_1 (control), o el plásmido pCMN53 (P2) o el plásmido pCi6 (P1) se fotografió con luz blanca (panel de arriba) o en oscuridad (panel de abajo).

3.19 Análisis del funcionamiento del sistema ThrRS1-ThrRS2

Los resultados anteriores indican que *Anabaena* 7120 cuenta con dos genes *thrS*, uno de los cuales sólo se expresa en condiciones de deficiencia de zinc, lo que sugiere que probablemente sirve para facilitar la adaptación de esta cianobacteria a condiciones limitantes de zinc. Estos resultados también sugieren que durante el proceso de adaptación a condiciones de deficiencia de zinc la enzima ThrRS2 podría reemplazar a la enzima *housekeeping* ThrRS1. No obstante, quedan por esclarecer numerosos aspectos del funcionamiento de este sistema constituido por las dos ThrRS. Desde el punto de vista estructural, las aminoacil tRNA-sintetasas de clase II actúan normalmente en forma de dímeros o tetrámeros (Cusack, 1997). Varios grupos han demostrado que ThrRSs procedentes de diferentes organismos son dímeros (Sankaranarayanan et al, 1999), (Shimizu et al, 2009), (Cura et al, 2000), (Zheltonosova et al, 1994), (Torres-Larios et al, 2003), (Ling et al, 2012). Para determinar la estructura cuaternaria de ThrRS1 y ThrRS2 utilizamos la técnica de la cromatografía de exclusión molecular que permite la separación de diferentes moléculas en función de su radio hidrodinámico, que guarda una relación con su peso molecular (apartado 2.4.8). Utilizando los plásmidos pCMN21 y pCMN20 respectivamente, cuya construcción se describe en el apartado 3.3, se sobreexpresaron las proteínas recombinantes Strep::*ThrRS1* y Strep::*ThrRS2* en *E. coli* BL21(DE3), que se purificaron en columnas de estreptavidina como se describe en el apartado 2.4.2. Para los ensayos de filtración en gel se utilizaron 100 µl de una preparación de Strep::*ThrRS1* ($1 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) purificada y 100 µl de una preparación de Strep::*ThrRS2* ($2.8 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) purificada. La actividad ThrRS de las fracciones de elución se determinó en ensayos de aminoacilación con treonina marcada radiactivamente para monitorizar la elución de ThrRS. El volumen de elución de la proteína Strep::*ThrRS1* fue de 11.91 ml que corresponde a un peso molecular aproximado de 176.3 kDa, y que es indicativo de una conformación dimerica (El peso molecular teórico de un dímero de Strep::*ThrRS1* es de 143 kDa) (fig. R27B). Strep::*ThrRS2* eluyó a un volumen de 12.07 ml, que corresponde a un peso molecular aproximado de 163.7 kDa y también es compatible con una estructura dimerica (El peso molecular teórico de un dímero de Strep::*ThrRS2* es de 142.2 kDa) (fig. R27B). Como se muestra en la figura R27 en ambas filtraciones se obtuvieron también dos picos de elución secundarios. En el caso de la filtración de Strep::*ThrRS1* se obtuvo un pico secundario a un volumen de 13.35 ml que corresponde a un peso molecular de alrededor

Resultados

de 89 kDa, compatible con una forma monomérica de la proteína. En el caso de Strep::*ThrRS2* se obtuvo un pico secundario a un volumen de 15.45 ml que corresponde a un peso molecular de 33.5 kDa que se comprobó que correspondía a un producto proteolítico de Strep::*ThrRS2*. Como se observa en la figura 3.31 los valores de actividad treonil-tRNA sintetasa correlacionaban perfectamente con los picos de elución de las formas diméricas de ambas proteínas.

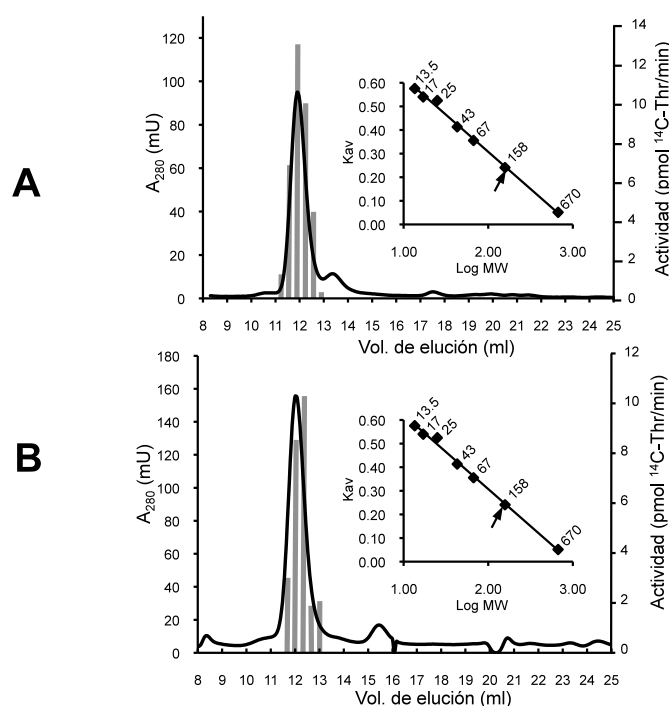


Figura 3.31 Cromatografía de exclusión molecular. Preparaciones purificadas de Strep::*ThrRS1* (A) o Strep::*ThrRS2* (B) se sometieron a filtración en gel. La actividad treonil-tRNA sintetasa de 48 μ l (Strep::*ThrRS1*) o de 24 μ l (Strep::*ThrRS2*) de cada fracción de elución se midió en ensayos de aminoacilación con ¹⁴C-L-treonina y se representa como un histograma. La absorbancia a 280 nm se representa como una línea continua. En los recuadros se muestran las K_{av} representadas en función del logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas patrón utilizadas para la calibración de la columna. $K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$, donde V_0 es el volumen vacío, V_e es el volumen de elución de la muestra y V_t es el volumen total de la columna. Las flechas negras indican las posiciones en las rectas de regresión correspondientes a los picos de elución observados para Strep::*ThrRS1* o Strep::*ThrRS2*.

En experimentos anteriores se observó que en *Anabaena* 7120, *thrS1* y *thrS2* se transcriben de forma diferencial, pero al menos durante el período de adaptación a deficiencia de zinc los dos genes se expresan simultáneamente y durante una parte de este período lo hacen a niveles comparables (Fig.3.7). Por tanto es razonable pensar que durante la adaptación a la limitación de zinc las dos proteínas coexisten en el citoplasma

Resultados

de *Anabaena* 7120. Ello planteó la necesidad de investigar la posibilidad de que ThrRS1 y ThrRS2 puedan formar heterodímeros. En una primera aproximación se expresaron estas proteínas en un sistema heterólogo, células de *E.coli*. Para la realización de este experimento se utilizaron tres estirpes derivadas de *E. coli* BL21(DE3) que contienen sendos plásmidos de expresión en los que las proteínas de interés se transcriben desde un promotor del bacteriófago T7:

- Estirpe 1: BL21(DE3, pCMN1) que expresa una versión de ThrRS2 fusionada en el extremo N terminal con una cola de hexahistidina (His::ThrRS2)
- Estirpe 2: BL21(DE3, pCMN21) que expresa una versión de ThrRS1 fusionada en el extremo N terminal con una cola Strep-tagII (Strep::ThrRS1)
- Estirpe 3: BL21(DE3, pCMN30) que expresa ambas proteínas recombinantes, His::ThrRS2 y Strep::ThrRS1

Las tres estirpes se cultivaron en presencia de 1 mM IPTG para inducir la sobreexpresión de las proteínas recombinantes (apartados 2.4.1 y 2.4.2). Se prepararon extractos crudos mediante sonicación de las suspensiones celulares y tras separar por centrifugación la fracción particulada del sobrenadante (al que nos referiremos como “extracto clarificado”), éste se sometió a cromatografía de afinidad en columnas de estreptavidina. Los perfiles de elución se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizaron por tinción con azul de Coomassie o mediante inmunodetección utilizando anticuerpos comerciales anti-His. Los resultados se muestran en la figura 3.32^a. En la cromatografía con extractos de la estirpe 1, que expresa Strep::ThrRS1, se observa esta proteína en las fracciones de elución del gel teñido con azul de coomassie pero no se observa señal con los anticuerpos anti-His (panel 1); en la de la estirpe 2, que expresa His::ThrRS2, no se observa ninguna proteína en la tinción con azul de coomassie ni señal en el Western (panel 2); en cambio, en la cromatografía de extractos de la estirpe 3, que expresa Strep::ThrRS1 y His::ThrRS2, se observa un doblete de en torno a 75 KDa en las calles correspondientes a las fracciones de elución del gel teñido con azul de coomassie y una señal prominente de tales fracciones en el western con anticuerpos anti-His (panel 3). Por tanto, parece que al hacer pasar los extractos de la estirpe 3 por la columna de estreptavidina, la adsorción de la proteína Strep::ThrRS1 hace que también se retenga la proteína His::ThrRS2, que no tiene afinidad inespecífica por la matriz (Fig. 3.32, panel 2). La señal observada en el Western del panel 3 es sólo atribuible a

Resultados

His::ThrRS2, ya que Strep::ThrRS1 no parece reaccionar con el anticuerpo utilizado (Fig. 3.32A, panel 1).

Para corroborar estos resultados se realizó el experimento recíproco en el cual los extractos clarificados de las tres estirpes de *E. coli* se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de níquel-nitrilotetraacético (Ni-NTA) y las fracciones obtenidas se analizaron mediante western blot con anticuerpos anti-Strep. Como se observa en figura 3.32B, en las fracciones de elución de la cromatografía con extractos de la estirpe 3 se observan en las calles correspondientes a las fracciones de elución bandas de unos 70 KDa en la tinción con coomassie y señal de hibridación Western con los anticuerpos anti-Strep (Fig. 3.32B, panel 3), indicando que la adsorción de His::ThrRS2 a la matriz de Ni-NTA provoca la retención de Strep::ThrRS1 que carece de afinidad inespecífica por la matriz (Fig. 3.32B, panel 2). La señal con los anticuerpos anti-Strep sólo es atribuible a la proteína Strep::ThrRS1 ya que His::ThrRS2 no parece reaccionar con ellos (Fig. 3.32B, panel 1).

Los resultados de estos experimentos indican que ThrRS1 y ThrRS2 forman heterodímeros cuando se coexpresan en *E. coli*.

- **ThrRS1 y ThrRS2 forman heterodímeros en *Anabaena* 7120**

Los experimentos anteriores muestran que cuando forzamos la coexpresión de ThrRS1 y ThrRS2 en *E. coli* pueden formar heterodímeros, lo que indica que no sólo no existen impedimentos estructurales para la interacción, sino que la afinidad de cualquiera de estas proteínas por la otra no debe ser órdenes de magnitud menor que la afinidad por sí misma. No obstante ello no significa necesariamente que existan heterodímeros ThrRS1-ThrRS2 en *Anabaena*. Aunque es cierto que durante algunas etapas del proceso de adaptación a condiciones de deficiencia de zinc, los genes *thrS1* y *thrS2* se expresan a niveles similares, indicando que ambas proteínas pueden coexistir a concentraciones comparables, ello no es suficiente para afirmar que existen heterodímeros en *Anabaena*, ya que su formación se podría evitar por algún mecanismo como la interacción con otras proteínas o una distribución diferencial de ambas proteínas en la célula. Para indagar sobre la existencia de heterodímeros ThrRS1-ThrRS2 en *Anabaena* se generó una estirpe que denominamos MN31, que expresa la proteína de fusión Strep-tagII::ThrRS2. Para la generación dicha estirpe se amplificó un fragmento de 1.5 kb que contiene la región 3' de *all4724* y la región 5' de *all4723*, usando DNA genómico de

Resultados

Anabaena 7120 como molde y como cebadores los oligonucleótidos 24STREP-1F y 23STREP-1R. El fragmento amplificado se clonó en pBluescript SK+ digerido con *XhoI* y *BamHI*, generando el plásmido pCMN29. Este plásmido se utilizó como molde para una PCR con los oligonucleótidos divergentes 23STREP-2F y 23STREP-2R. El producto de amplificación se ligó con un fragmento corto de DNA de doble cadena que denominamos “linker strep”, obtenido mediante el alineamiento de los oligonucleótidos parcialmente solapantes Strep-tag-1F y Strep-tag-1R. La ligación dio lugar al plásmido pCMN58 cuyo inserto se transfirió al plásmido conjugativo pRL278 digerido con *XhoI* y *BamHI*, produciendo el plásmido pCMN31, que se envió a *Anabaena* 7120 por conjugación triparental. Los pasos sucesivos a la conjugación se realizaron según se describe en 3.16. Tras la identificación de colonias ex-conjugantes que hubieran integrado el plásmido por recombinación simple, se seleccionaron clones segregados mediante fragmentación de los filamentos y cultivo en medio con neomicina (que es el marcador de resistencia del plásmido). Posteriormente algunos de estos clones se sometieron a fragmentación de los filamentos por sonicación y cultivo en medio con sacarosa que contraselecciona el marcador *sacB* del plásmido, con lo que se seleccionaban los clones que hubieran perdido este marcador por escisión del plásmido mediante un segundo evento de recombinación. En algunas de estas colonias el segundo evento de recombinación habrá ocurrido en el flanco opuesto a aquél en el que ocurrió el primero respecto a la secuencia que cifra Strep-tagII, con lo que está quedará integrada en el cromosoma. Estos clones serán resistentes a sacarosa y sensibles a neomicina. Se aisló el DNA genómico de tres de estos clones y su estructura genómica se analizó por PCR con los oligonucleótidos ALL4724-2F y A7120THRS2-2R. El tamaño esperado del fragmento silvestre es de 537 pb en la estirpe silvestre y el del fragmento que hubiese integrado la secuencia que cifra la cola Strep-Tag II de 603 pb. Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa al 1% (figura 3.33B). En las calles correspondientes a los tres clones seleccionados (C1, C2 y C3) sólo aparece la banda mutante de 603 bp y no hay rastro de banda silvestre (537 bp). Una de estas colonias se seleccionó para estudios posteriores y se denominó MN31. Se cultivaron células de MN31 a 30°C en medio BG11 suplementado con 20 µM TPEN durante 24 horas, que se recogieron por filtración y se preparó un extracto crudo mediante rotura con una prensa de French. El extracto crudo se sometió a una centrifugación a baja velocidad (32.000 x g durante 10 minutos) y una a alta velocidad (100.000 x g durante 1 hora). La fracción soluble, se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de

Resultados

estreptavidina según se describe en 2.4.2. Las fracciones de elución de la columna se precipitaron con acetona y se sometieron a SDS-PAGE. En las calles F1-F5 de la figura 3.34, correspondientes a las fracciones de elución, se observan dos bandas intensas del tamaño esperado para Strep::ThrRS2. Estas dos bandas se escindieron del gel y se identificaron por MALDI-TOF. La banda inferior y más abundante corresponde a Strep::ThrRS2, mientras que la banda superior y menos abundante fue identificada como ThrRS1. Esto indica fuertemente que tras el tratamiento con TPEN, existen heterodímeros de ThrRS1 y ThrRS2 en células de *Anabaena*, lo que sugiere que estos podrían formarse de manera natural durante el período de adaptación a condiciones limitantes de zinc.

Resultados

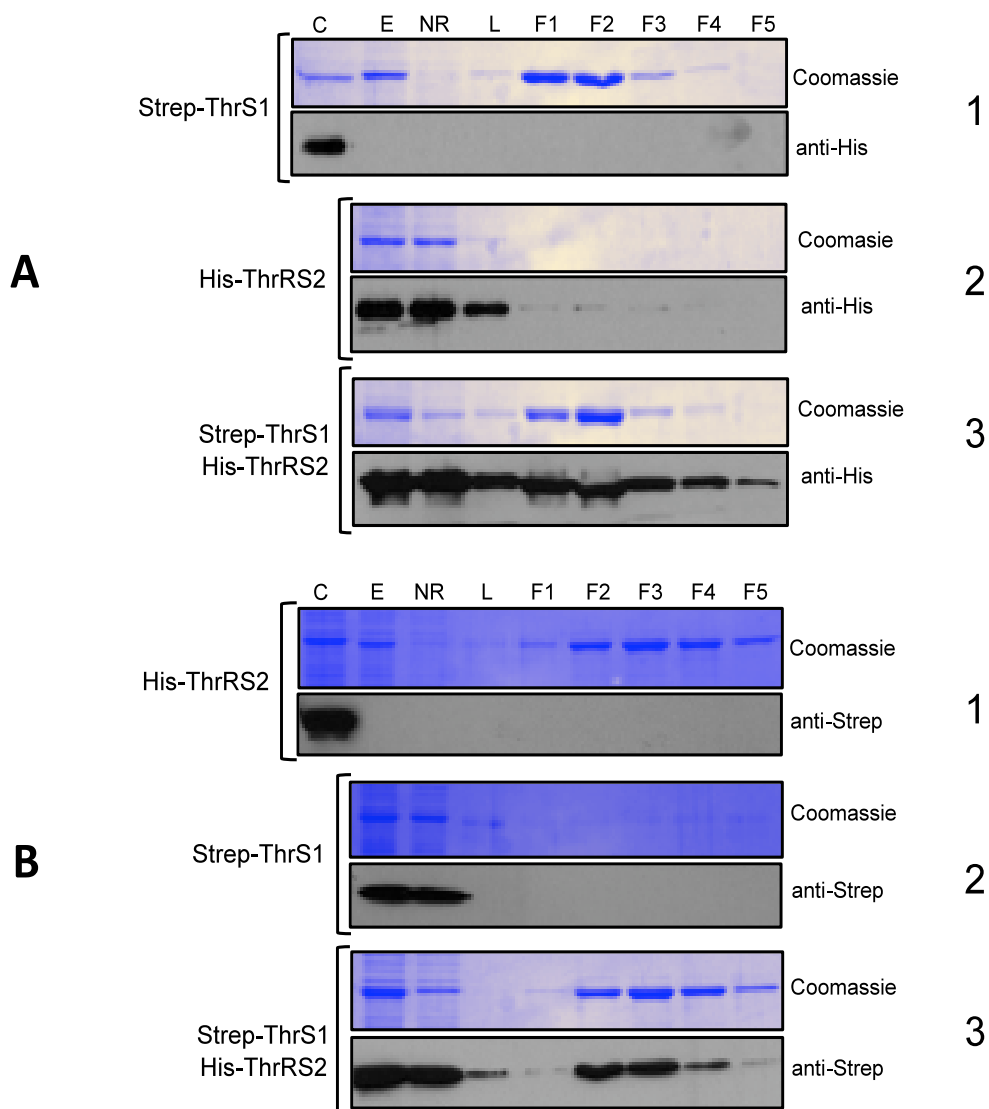


Figura 3.32 Copurificación de ThrRS1 y ThrRS2 de células de *E. coli* . 1.5 ml de extractos clarificados de *E. coli* BL21(DE3) que sobreexpresan las proteínas que se indican en la parte izquierda de los paneles se sometieron a cromatografía de afinidad en columnas de estreptavidina (A) o en columnas de Ni-nitrilotetraacético (B). La calle “C” contiene proteína His::ThrS2 o Strep::ThrRS1 purificada que se incluyó como control positivo de los western blots; E indica el extracto clarificado; NR indica la fracción no retenida; L indica la fracción de lavado de la columna; F1-F5 indican las fracciones de elución. Coomassie indica tinción con azul de coomassie; anti-His, indica los western blots con anticuerpos que reconocen el epítipo de hexahistidina; anti-Strep, indica los western blots con anticuerpos que reconocen el epítipo Strep-tag II

Resultados

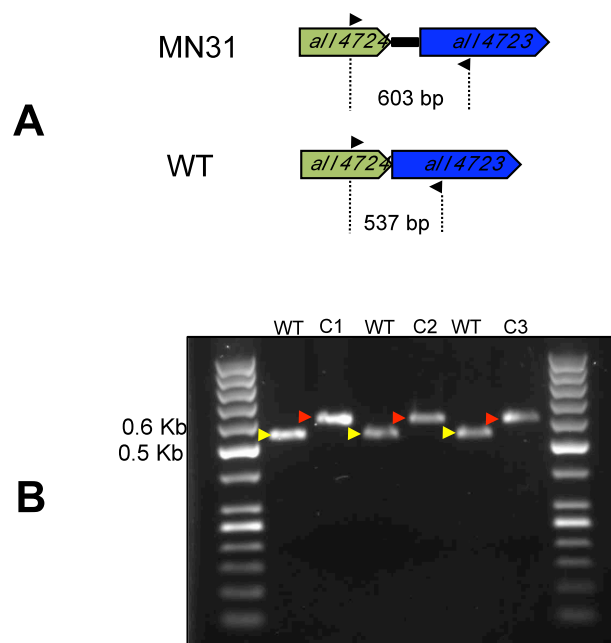


Figura 3.33 Comprobación de la estructura genómica del mutante MN31 (A) Representación esquemática de la estructura genómica de *Anabaena* 7120 (WT) y del mutante MN31. Las flechas negras representan los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR. (B) 20 ng de DNA genómico de *Anabaena* silvestre (WT) y de tres exconjugantes (C1, C2 y C3) se utilizaron como molde para una PCR con los oligonucleótidos all4724-2F y A7120thrS2-2R. Las flechas rojas indican las bandas que han integrado la secuencia que cifra Strep-TagII. Las flechas amarillas indican las bandas silvestres.

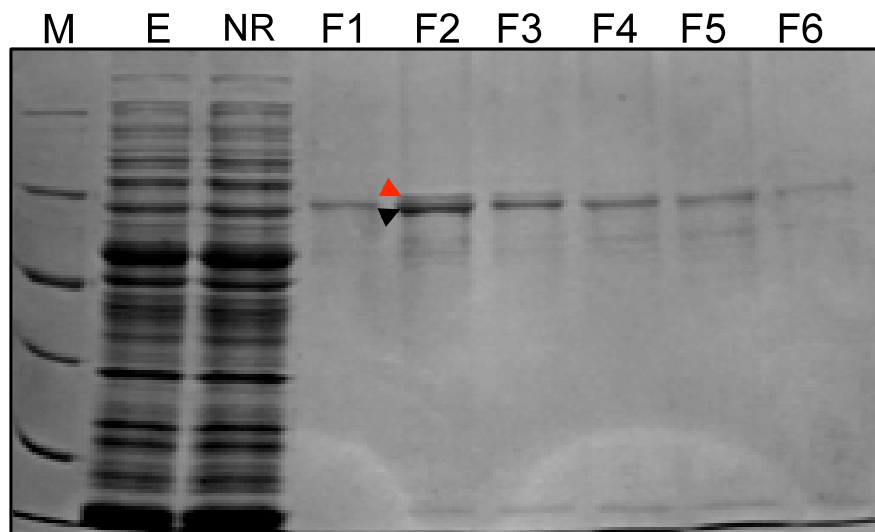


Figura 3.34 Copurificación de ThrRS1 y ThrRS2. 9 ml de extracto clarificado de la estirpe MN31 se sometieron a purificación por cromatografía de afinidad en una columna de estreptavidina. M indica el marcador de peso molecular; E indica el extracto clarificado; NR indica la fracción no retenida por la columna; F1 – F5 son las fracciones de elución. La flecha roja señala ThrRS1. La flecha negra señala ThrRS2.

Resultados

3.20 Análisis de los perfiles de expresión de los tRNAs^{Thr} de *Anabaena* 7120

En experimentos anteriores de Northern blot se observó que *thrS1* (*alr0335*) y *thrS2* (*all4723*) muestran perfiles diferenciales de expresión. El genoma de *Anabaena* contiene 4 genes *trnT* que cifran tRNA^{Thr} isoaceptores, *trnT-CGU*, *trnT-GGU*, *trnT-UGU1* de localización cromosómica y *trnT-UGU2* localizado en un agrupamiento de genes que cifran tRNAs en el plásmido delta (Puerto-Galan & Vioque). Se analizó la expresión de estos genes, en células de *Anabaena* y del mutante MN38 cultivadas en presencia o ausencia de TPEN durante 24 h. En la figura 3.35 se muestra que los 3 genes *trnT* del cromosoma, presentan un perfil de expresión similar en la estirpe silvestre y el mutante MN38, lo que indica que su expresión no está regulada por Zur. Por otra parte, se observa que los niveles de sus transcritos decrecen ligeramente tras la adición de TPEN. Un resultado interesante es que el nivel de transcrito de *trnT-UGU2* aumenta al cuádruple tras 24 h de incubación en presencia de TPEN, lo que recuerda el perfil de expresión de *thrS2*. La inducción de *trnT-UGU2* no parece estar afectada en el mutante MN38, de lo que se deduce que probablemente Zur no está implicado en su regulación.

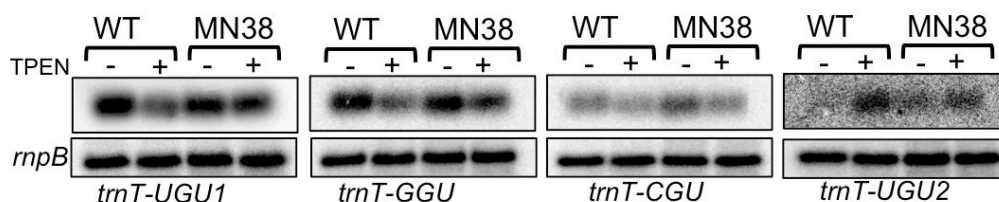


Figura 3.35. Análisis de la expresión de los genes *trnT* en *Anabaena* y en MN38. RNA de células de *Anabaena* silvestre o del mutante MN38 cultivadas a 30°C durante 24 horas en BG11 suplementado (+) o no suplementado (-) con 20 μ M de TPEN se hibridó con sondas radiactivas de los genes *trnT-CGU*, *trnT-GGU*, *trnT-UGU1* y *trnT-UGU2*. Debajo de cada panel se muestran las hibridaciones con el gen *rnpB* usado como control de carga.

3.21 Análisis de la función del producto del gen *all4722*

El gen *all4722* cifra una proteína hipotética de la familia COG0523 (Haas et al, 2009) con un dominio GTPasa N-terminal y un dominio C-terminal con una región rica en histidinas que incluye 19 residuos de este aminoácido. Entre las proteínas de la familia COG0523 se encuentran algunas proteínas con actividad metalochaperona-insertasa que

Resultados

asisten a otras proteínas en la captura de cofactores metálicos, como UreG y UreE e HypB que participan en la maduración de la ureasa y la hidrogenasa, respectivamente, dos enzimas que usan níquel como cofactor (Haas et al, 2009). Una hipótesis atractiva es que la proteína hipotética All4722 pudiera estar implicada en la maduración el cofactor metálico de ThrRS2. Para comprobar esta hipótesis se generó un mutante de delección del gen *all4722* como se describe a continuación. Se amplificó un fragmento de 2.5 kb que contenía la región C terminal de *all4723* (*thrS2*), la ORF *all4722* y la región N terminal de *all4721* usando como molde DNA genómico de *Anabaena* 7120 y como cebadores los oligonucleótidos 23DEL-1F y 21DEL-1R. El producto de amplificación se clonó en pBluescript SK+ digerido con *XhoI* y *BamHI* generando el plásmido pCMN33, que se utilizó a su vez como molde en una reacción de PCR con los oligonucleótidos divergentes 23DEL-1R y 21DEL-1F que flanquean la ORF *all4722*. El producto de amplificación se purificó y religó dando lugar al plásmido pCMN40. El inserto de pCMN40 se transfirió al plásmido conjugativo pRL278 digerido con *BamHI* y *XhoI*, produciendo el plásmido pCMN43 que se introdujo en *Anabaena* mediante conjugación triparental. Las fases posteriores a la conjugación se realizaron como se describe en 3.16. En la figura 3.36 se muestra el análisis de la estructura genómica de dos de las colonias seleccionadas. Como control del alelo silvestre se utilizó DNA genómico de *Anabaena* silvestre y como control del alelo mutante el plásmido pCMN43. Como se ilustra en figura 3.36 se realizaron dos amplificaciones independientes utilizando dos parejas diferentes de oligonucleótidos. En la que se denomina PCR 1 se utilizaron los oligonucleótidos A7120THRS2-3F y ALL4722-2R que producen un fragmento de 977 bp en la estirpe silvestre y no deben generar ningún producto en el mutante, ya que en éste la secuencia de apareamiento de ALL4722-2R ha sido eliminada. En la PCR 2 se utilizaron los oligonucleótidos A7120THRS2-3F y ALL4721-1R que producen un fragmento de 1689 bp en la estirpe silvestre y de 626 en el mutante. En ambos casos se obtuvieron los productos de amplificación esperados, con lo cual pudimos concluir que el alelo mutante estaba segregado en las colonias seleccionadas. La estirpe generada se denominó MN43. Durante la realización de esta tesis no se han realizado otros experimentos para la caracterización de la estirpe MN43.

Resultados

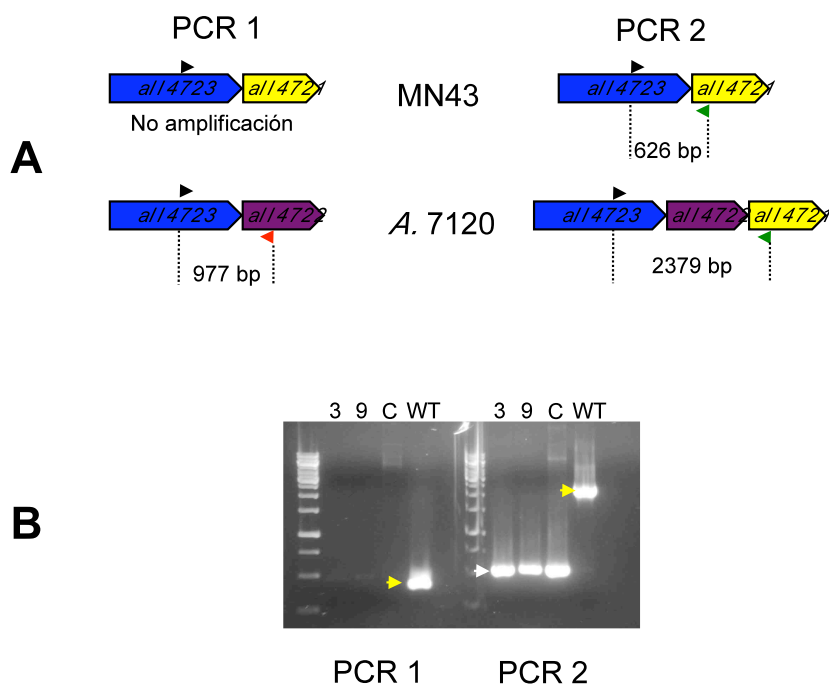


Figura 3.36 Comprobación de la estructura cromosómica del mutante MN43. (A) Diagrama explicativo de las reacciones de PCR realizadas. En la parte superior se representa un esquema de la estructura genómica del mutante MN43, en la parte inferior se representa un esquema de la estructura genómica de la estirpe silvestre. Las flechas negras indican el oligonucleótido A7120thrS2-3F; la flecha roja indica el oligonucleótido all4722-2R; las flechas verdes indican el oligonucleótido all4721-1R. (B) DNA genómico de dos posibles colonias mutantes (3 y 9), DNA del plásmido pCMN42 y DNA genómico de *Anabaena* silvestre (WT) se utilizaron como molde para dos reacciones de amplificación independientes utilizando los oligonucleótidos que se representan en A. Las flechas amarillas indican las bandas silvestres; la flecha blanca indica las bandas mutantes.

3.22 Análisis de la expresión de los genes *cysS* y *alr1093*

ThrRS no es la única AaRS que contiene zinc. Se ha descrito la presencia de átomos de zinc en la estructura de varias enzimas de esta familia, incluyendo LeuRS, IleRS o CysRS. De todas las AaRSs que contienen zinc, ThrRS y CysRS son las dos únicas en las que el átomo de zinc está en el sitio activo coordinado por tres residuos de la proteína. Una observación muy interesante es que la ORF situada aguas arriba de forma divergente al gen *cysS* de *Anabaena 7120*, *alr1093* cifra un proteína hipotética de la familia COG0523 y homóloga por tanto al producto hipotético de *al14722*. Alr1093 tendría un dominio N-terminal GTPasa y un dominio C-terminal con un segmento que incluye 21 residuos de histidina. En el contexto del análisis de la posible función de las proteínas de la familia COG0523 en la maduración de cofactores metálicos de aaRSs, se

Resultados

consideró interesante analizar la expresión de estos dos genes en las mismas condiciones en las que se había examinado la expresión de *thrS2* y *all4722* (ausencia o presencia de TPEN). En la figura 3.37 se muestra que ambos genes se transcriben constitutivamente, sin que su expresión se vea influida por la presencia de TPEN en el medio salvo un descenso transitorio una hora después de añadir el TPEN, que se observa en todos los genes analizados y podría ser atribuible a un efecto general inespecífico del TPEN sobre la transcripción. Por tanto, no se observa una regulación de estos genes similar a la observada para los genes *all4723* (*thrS2*) y *all4722*. Es de destacar, no obstante que el gen *cysS* no se encuentra duplicado en la cianobacteria *Anabaena* 7120.

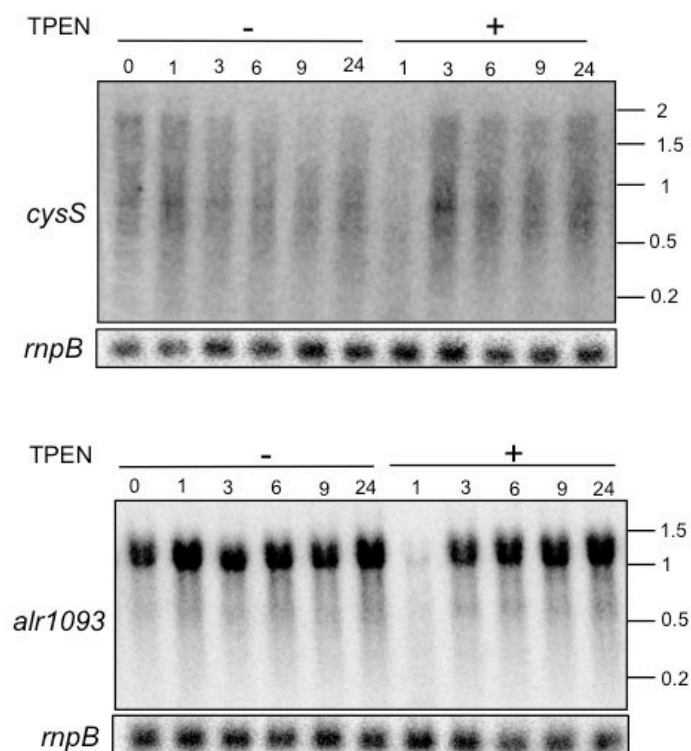


Figura 3.37 Análisis de la expresión de los genes *cysS* y *alr1093*. RNA de células de *Anabaena* 7120 cultivadas a 30°C durante distintos tiempos en BG11 suplementado o no con TPEN 20 μ M se hibridó mediante Northern blot con sondas de *cysS* y *alr1093*. Los números a la derecha indican las posiciones de los marcadores de peso molecular de RNA. Debajo de cada membrana se muestran las hibridaciones con el gen *rnpB* usado como control de carga.

Discusión

4.Discusión

Discusión

En esta tesis se ha realizado una caracterización de los genes *thrS1* y *thrS2* de la cianobacteria modelo *Anabaena* sp. PCC 7120. Ambos genes son funcionales en *Anabaena*, siendo *thrS1* el gen de mantenimiento (*housekeeping*) y *thrS2* un gen alternativo que se expresa en condiciones de deficiencia de zinc. *thrS2* forma parte de un operón de genes alternativos de regulación compleja, que cuenta con promotores regulados por el represor Zur y promotores internos probablemente controlados por un represor desconocido. A pesar de esta regulación diferencial, los productos de *thrS1* y *thrS2* coexisten en algunas condiciones en *Anabaena* pudiendo formar homodímeros y heterodímeros. A continuación se discuten algunos aspectos de la evolución de los genes *thrS1* y *thrS2*, de la regulación del operón de *thrS2*, del funcionamiento del sistema formado por *thrS1* y *thrS2* y de su importancia en la respuesta adaptativa de algunas cianobacterias.

4.1 La duplicación de los genes *thrS*

La presencia de genes redundantes en un genoma puede ser el resultado de dos fenómenos distintos, la adquisición de uno de ellos por transferencia horizontal o la duplicación de un gen. Se ha propuesto que los genes *thrS1* y *thrS2* se originaron por un evento de duplicación génica ocurrido de forma temprana en el phylum de las cianobacterias (Luque et al, 2008). La conservación de genes duplicados es un fenómeno poco frecuente en la evolución, siendo mucho más probable la pseudogenización y pérdida de uno de ellos (Krakauer & Nowak, 1999). Sin embargo, algunas veces la duplicación puede fijarse en la población y la divergencia de ambos genes puede permitir la innovación de nuevas funciones. En algunos casos, el aumento de la dosis génica asociado a la duplicación puede conferir una ventaja selectiva que favorezca su fijación en la población, por ejemplo en aquellos casos en los que el producto del gen participa en un paso limitante del metabolismo. En estadios posteriores, una relajación de la presión selectiva que habría favorecido la conservación de la duplicación, puede posibilitar la divergencia de una de las dos copias (Bergthorsson et al, 2007). En la mayor parte de los casos esto conduce a una subfuncionalización, es decir, a la división entre las dos copias de la función que en origen era realizada por un único gen. En este caso, las dos copias poseen actividades independientes que en conjunto realizan la función del gen original. Esto puede ir asociado a la adopción de distintos perfiles de expresión, de modo que cada gen realiza

Discusión

la función en condiciones específicas. Existen dos modelos teóricos que explican como puede ocurrir la subfuncionalización. Según el modelo DDC (*Duplication, Degeneration, Complementation*) la división de la función original ocurre mediante la acumulación de mutaciones que eliminan sólo una parte de la actividad original. En este caso las mutaciones son neutras porque la parte de función perdida es realizada por la otra copia del gen. Según el otro modelo, EAC, (*Escape from Adaptive Conflict*) la subfuncionalización ocurre cuando el gen original posee dos funciones y tras la duplicación, las copias acumulan mutaciones adaptativas que determinan su especialización en una de las funciones originales (Conant & Wolfe, 2008). De acuerdo con los resultados de este trabajo, *thrS1* y *thrS2* comparten la tarea de treonilación del tRNA^{Thr}, lo que correspondería a una subfuncionalización. La divergencia prolongada de una de las copias puede desembocar en la innovación de una nueva función (Bergthorsson et al, 2007) de modo que uno de los genes se encarga de mantener la función original y el otro adquiere una nueva función inexistente antes de la duplicación, por lo que ambos genes se catalogan como parálogos. Aunque hay numerosos casos de parálogos de genes de aaRSs (Sissler et al, 1999), (Roy et al, 2003), (Mocibob et al, 2010), (Navarre et al, 2010), (Yanagisawa et al, 2010), éste no parece ser el caso de *thrS1* y *thrS2* al menos que una de ellas haya adquirido una función críptica que no hemos descubierto aún.

De acuerdo con datos publicados anteriormente (Luque et al, 2008) y con el árbol filogenético de la Fig. 4.1, el evento de duplicación génica que generó *thrS1* y *thrS2*, ocurrió de forma temprana en el phylum, tras la divergencia de *Gloeobacter violaceus* y de los *Synechococcus* termófilos de Yellowstone. El nodo en el que se señala el evento coincide con un notable incremento en la tasa de diversificación de las cianobacterias que según estimaciones ocurrió 2700-2500 millones de años atrás, de forma previa al gran evento de oxigenación de la atmósfera (Schirromeister et al, 2013). Aún si tomamos esta estimación con cierta precaución, parece cierto que los genes *thrS1* y *thrS2* habrían coexistido en algunos genomas cianobacterianos durante miles de millones de años, un periodo considerablemente largo incluso en términos evolutivos. En las especies actuales de cianobacterias encontramos distintas situaciones: especies que sólo contienen *thrS1* (42%), especies que sólo contienen *thrS2* (18%), especies que contienen ambos (28%) y el género *Prochlorococcus* que carece de estos genes y ha adquirido un gen *thrS* foráneo probablemente por transferencia horizontal (Luque et al,

Discusión

2008), (Zhaxybayeva et al, 2006). Dos especies de *Cyanothece* contienen un gen *thrS1* y dos genes *thrS2*, que probablemente se han generado por una segunda duplicación más reciente de este gen. En algunas especies se detectan genes *thrS* truncados que podrían ser reliquias evolutivas de la presencia de un gen completo. Los productos de los genes *thrS1* y *thrS2* comparten en torno a un 50 % de identidades de secuencia y se diferencian por tres indels diagnóstico que se describen en la sección 3.1 del capítulo de Resultados y cuya localización se representa en la Figura 4.2. En la Fig. 4.1 se observa que las especies que divergen primero en la radiación de las cianobacterias (*Gloeobacter violaceus*, *Synechococcus* sp. PCC 7336, *Synechococcus* sp. JA-2-3B y *Synechococcus* sp. JA-3-3Ab) sólo contienen un gen *thrS*, cuyo producto es más parecido a las ThrRS1 que a las ThrRS2 y presenta las secuencias extra de los indels 2 y 3 propias de ThrRS1. Esto sugiere que el gen *thrS* previo a la duplicación era más parecido a *thrS1* que a *thrS2*, lo que a su vez implica que *thrS1* ha estado más restringido en su evolución que *thrS2*, y ello es consistente con el papel de mantenimiento del primer gen y el papel alternativo del segundo que observamos en *Anabaena*. Un aspecto interesante concierne a la evolución de los indels. Si se acepta que la ThrRS de las cianobacterias de diversificación temprana (*Gloeobacter violaceus* y los *Synechococcus* termófilos de Yellowstone) es más parecida a la ThrRS original previa a la duplicación, se deduce que las secuencias extra de ThrRS1 en los indels 2 y 3 habrían estado presentes en la ThrRS original y habrían sufrido una delección temprana en las ThrRS2. El indel 1 por su parte, aparece como una secuencia extra en algunas ThrRS2 y corresponde probablemente a una inserción en algún momento intermedio de la diversificación de las ThrRS2. Una observación muy interesante es la correlación entre la longitud de esta inserción de ThrRS2 y la coexistencia con ThrRS1. Como se observa en figura 4.3 en aquellas cianobacterias que sólo contienen ThrRS2, no existe dicha inserción (*Synechococcus marinos* y *Cyanobium*) o tiene una longitud máxima de 8 aminoácidos (*Pseudoanabaena* y *Synechococcus* sp. PCC 7502). En cambio, en las ThrRS2 que coexisten con ThrRS1, la inserción tiene una longitud de entre 15 y 32 aminoácidos. Esta secuencia se localiza en el dominio N2, muy cerca del sitio de edición en la estructura tridimensional. El hecho de que en aquellas cianobacterias que sólo tienen ThrRS2 la inserción esté ausente o sea corta sugiere que una secuencia larga en esta posición podría tener un efecto deletéreo (por ejemplo en la actividad de edición) que sólo sería tolerable en presencia de ThrRS1 (ver más adelante).

Discusión

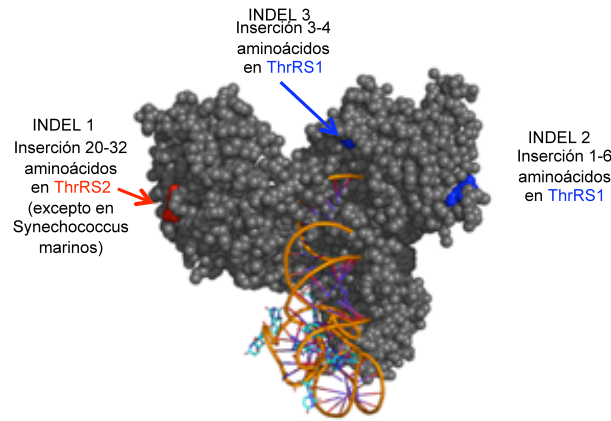


Fig. 4.2 Estructura de ThrRS de *E. coli* acomplejada con el tRNA^{Thr}. En la superficie de la proteína se muestran los residuos que forman el indel 1, en rojo, y los indel 2 y 3 en azul.

Cyanot51142	ESIPETESITRYFIGSPDGGGRNI-----PEQPSLINPVLVP-----PDCWWDLC	206
Cyanot51472	ESIPETESITRYFIGSPDGGGRNI-----PEQPSLINPVLVP-----PDCWWDLC	177
Mic_aerNIES-843	ERIPPEETITRYFIGSPDAGR-----SDREPSLIDGAVSP-----PEEFWWDLC	158
Synechocyc6308	DSIPENETITRYFIGFPDYQP-----PDQTP-----LK-----PLNSWWDLC	146
ThrS2_7120	DRIPPEETITRYFIGSPDTSTP-----ESSLFVADVKP-----ASNYWWDLC	154
Nostoc7524	ERIPPEQTITRYFIGSPEIGKP-----EASLFITDVQP-----ASHYWWDLC	154
A_var29413	DRIPEGETITRYFIGSPDTGKP-----ESSLFITDIQP-----ASNYWWDLC	154
Calot_7103	NRIPDGEIITRYYIGSPEGRRV-----DASLFIAETLP-----PKESWWDLC	152
Rivularia7116	ERIPDQEIITRYFIGSPDAGNR-----ESSLLAVDNTNNTKLNQANSYWWDLC	160
Calothrix6303	DSIPEVEVITRYFIGSPDVGKLTNT-----DVQIEPSLLEPVIIP-----PKIYWWDLC	161
bCyanot51142	DSIPEGETITRYYIGSPDGGRLPDVGEKLTALPEPSLIKPKVKIP-----ATVSWWDLC	184
bCyanot51472	DSIPEGETITRYYIGSPDGGRLPDVGEKLTALPEPSLIKPKVKIP-----ATVSWWDLC	182
CyanotCCY0110	DSIPAGETITRYYIGSPDGGRLPNVGEKLGALPEPSLIKPKVKIP-----ATVSWWDLC	182
C_watsonii8501	DSIPEGETITRYYIGSPDGGRLPNVGEKLGALPEPSLIKPKVKIP-----STVSWWDLC	182
Chroococ6712	DSIPEGEIITRYYIGSPDGGRLPNLGEKLAALPEPSLIKPKVKIP-----ATVSWWDLC	179
Pleurocapsa7319	DSISEGETITRYYIGSPDGGRLPNVGEKLSALPEPSLIKPKVKIP-----ATVSWWDLC	172
Pleuroc7327	DSIPEGETITRYYIGSPDGGRLPNLGEKLAALPEPSLIKPKVKIP-----ATVSWWDLC	168
Chrooc_ther7203	DSIPTGETISRYFIGNPDAGRG-----TSEIECSLFDPATLP-----PSEFWWDLC	157
Microcol7113	DSIPDGETITRYFIGNPDHGKGVID-----ANQSEPTLFEQVTIP-----PEAYWWDLC	163
Leptol6306	DRIPAGEPITRYFIGNPDSGRA-----TQIEPSLIDAIALP-----PDEYWWDLC	159
Ac_marMBIC11017	AQIPAGETITRYFIGSPDTGRTQHP-----EAEASLIEPLVA-----PNEFWWDLC	156
AcarCCME5410	AQIPAGETITRYFIGSPDTGRTQHP-----EAEASLIEPLVA-----PNEFWWDLC	156
Art_maxCS-328	DSIPETETITRYFIGSPDMGRTNHP-----EVEPSLISP--VVIPTQ-----EFWWDLC	161
Art_platC1	DSIPETETITRYFIGSPDMGRTNHP-----EVEPSLISP--VVIPTQ-----EFWWDLC	161
Arthrosp8005	DSIPETETITRYFIGSPDMGRTNHP-----EVEPSLISP--VVIPTQ-----EFWWDLC	161
Art_platNIES-39	DSIPETETITRYFIGSPDMGRAVHP-----EVEPSLMEP--VVIPTQ-----EFWWDLC	161
Cy_stan7202	DNIPEDETITRYFIGSPDVGKTNHP-----EVEPSLIES--VPIPPQ-----EYWWDLC	161
Leptol7375	DSIPPEPITRYYIGCPD---LLPA-----TAEPSLFDSPSAKPSDSD---QATCWWDLC	161
Leptol6406	DRIPPAEPITRYYIGCPDGG-VPLG-----TTDPSLFDAPSAPISP---MPCWWDLC	163
Pseuda6802	DAIPEGQIITRYTIGDPAKIEN-----PWWDLCL	142
Syn7502	DAIPEGEIITRYTIGDPEKIEN-----PWWDLCL	151
Pseudan7429	AAIPEGQNISRYFIGDPAKFEKQ-----PWWDLCL	146
Pseuda7367	ASIPEGEPITRYYLGDPKLEK-----PWWDLCL	141
SynWH7805	EGLQ--EPITLYTLG-----EDWWDLC	146
SynWH7803	EGLQ--EPITLYTLG-----EDWWDLC	146
SynWH8102	EGLQ--DPITLYTLG-----EDWWDLC	146
SynCC9605	QGLH--EPITLYTLG-----EDWWDLC	146
SynWH8109	EGLQ--EPITVYTLG-----EDWWDLC	146
SynCC9902	ERLQ--EPITLYTLG-----DQWWDLC	146
SynBL107	ERLQ--EPITLYTLG-----DQWWDLC	146
SynCC9311	ERLV--EPITLYTLG-----EQWWDLC	146
Syn8016	ERLV--EPITLYTLG-----EQWWDLC	146
SynRS9917	AGLQ--EPITLYTLG-----EQWWDLC	146
SynRS9916	SGIQ--EPITLYTLG-----EEWWDLC	146
SynCC9616	DGLQ--EPITLYTLG-----DQWWDLC	143
SynRCC307	EGLQ--EPITLYTLG-----EKWWDLC	143
SynCB0101	AGIN--EPITLYTLG-----EEWWDLC	106
SynCB0205	AGIQ--EPISLYTLG-----EDWWDLC	124
Cyanob7001	AGIT--EPITLYTLG-----EEWWDLC	106
SynWH5701	AGIQ--EPITLYTLG-----DEWWDLC	133
Cyanob_grac6307	EGLS--EPITLYTLG-----DQWWDLC	151
bphyscomit_patens	EGIKT-EPITTYKIG-----EEWWDLC	154
bphyscomit_patens	EGIKS-EPITTYRIG-----EDWWDLC	156
ThrRS1_7120	ADIKS-EPITTYHLG-----NEWWDLC	146
	: : : * * *	*****

Fig. 4.3 Alineamiento de secuencias de ThrRS2 de cianobacterias. Las proteínas de los *Synechococcus marinos* se encuentran en la parte inferior del panel, las del resto de las cianobacterias en la parte superior. Al fondo del alineamiento se indica en rojo ThrRS1 de *Anabaena 7120*.

Discusión

La duplicación de genes que cifran aminoacil-tRNA sintetasas en genomas bacterianos es un fenómeno bastante bien documentado. En algunos casos solo se han observado diferencias en los perfiles de expresión de los dos genes. Por ejemplo, los genes *thrS* y *thrZ* de *B. Subtilis* se regulan por un ribointerruptor, pero *thrS* es el gen de mantenimiento en condiciones estándar mientras que *thrZ* es un gen auxiliar que se induce con concentraciones elevadas de tRNA^{Thr} descargado (Putzer et al, 1990), (Putzer et al, 1992). Hay otros ejemplos en los cuales el gen duplicado realiza una función relacionada con la función original pero distinta de aquella. Es el caso de las aminoacil-tRNA sintetasas discriminatorias y no discriminatorias presentes en algunas bacterias. En *T. termophilus* y *D. Radiodurans*, AspRS1 es una aspartil-tRNA sintetasa discriminatoria que sintetiza Asp-tRNA^{Asp}, mientras que AspRS2 es una enzima no discriminatoria, probablemente adquirida por transferencia horizontal, que participa en la síntesis de Asn-tRNA^{Asn} ((Becker & Kern, 1998), (Becker et al, 2000). Un caso similar es del de las enzimas GluRS1 y GluRS2 de *H. pylori* (Skouloubris et al, 2003). En otros casos, una de las enzimas duplicadas confiere resistencia a moléculas potencialmente dañinas. Por ejemplo, una de las dos LysRS de *E. coli*, LysU, confiere resistencia a cadaverina (Brevet et al, 1995). Otros ejemplos son SerRS2 de *Streptomyces* ATCC 700974 que es insensible a la acción inhibitoria del antibiótico albonmicina al que SerRS1 es sensible (Zeng et al, 2009), o TrpRS1 de *S. coelicolor* que confiere resistencia al antibiótico indolmicina que inhibe a TrpRS2 (Vecchione & Sello, 2008). En estos casos resulta evidente que la duplicación proporciona una ventaja selectiva al organismo. También son numerosos los casos de paralogía en los que uno de los genes mantiene la función original y el otro adopta una función totalmente distinta (Sissler et al, 1999), (Roy et al, 2003), (Mocibob et al, 2010), (Navarre et al, 2010), (Yanagisawa et al, 2010).

Un objetivo principal de este trabajo ha sido analizar las características diferenciales de *thrS1* y *thrS2* intentando aportar datos que permitan comprender la conservación de ambos genes en el genoma de muchas cianobacterias durante miles de millones de años. Nuestros primeros resultados experimentales mediante acercamientos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que ambos genes son funcionales y cifran proteínas con actividad de treonilación del tRNA^{Thr}. Sin embargo, las dos enzimas muestran diferencias que sugieren una diferente especificidad para los tRNAs^{Thr}. El hecho de que ThrRS1 necesite coexpresarse con un tRNA^{Thr} de *Anabaena* para complementar un mutante

Discusión

condicional de *E. coli* (apartado 3.2) indica que ThrRS1 es una enzima de especificidad estricta, mientras que ThrRS2 presenta una especificidad más relajada pudiendo reconocer y aminoacilar tRNAs^{Thr} de *E. coli* y *Anabaena*. La comparación de las secuencias de los tRNAs^{Thr} de *E. coli* y de cianobacterias (Fig.4.4) ha puesto de manifiesto que en los primeros, la base discriminatoria N73 es siempre una A, mientras que en los de *cianobacterias*, como en *T. termophilus*, es siempre una U (Nameki et al, 1996), (Hasegawa et al, 1992). Una excepción interesante son los tRNAs^{Thr} del género *Prochlorococcus* cuya base discriminatoria es una A como en *E. coli*, lo que es consistente con la propuesta de que *Prochlorococcus* habría adquirido un gen *thrS* de origen proteobacteriano por transferencia horizontal, que habría desplazado al (los) gen(es) *thrS* residente(s) (Zhaxybayeva et al, 2006), (Luque et al, 2008) y sugiere una evolución adaptativa de los tRNAs^{Thr} de *Prochlorococcus* para optimizar su reconocimiento por una ThrRS foránea. En la literatura se describen casos similares de coevolución de tRNAs y aaRSs (Salazar et al, 2003).

7120	CGU	GC	CGAUGUGGCUCAG-UGGUAGAGCAGCUGAUUCG	AAUCAGCAGGCCGUGGGUUCAAAUCCCAUCAUCG	---	72
7120	GGU	GC	CCGUGUGGCUCAG-UGGUAGAGCACACCCUUGG	AAGGGUGAGGUCACGAGUUCAAUCCUCGUCACGG	---	72
7120	UGU	GC	CAGCAUAGCACAG-UGGUAGUGCAUCCGACUUG	AAUCGGAAGGUCGUCGGUUCAAAUCCGACUCUG	---	72
7120	UGU2	GC	UGGUGUGGCUCAA-CGGCAGAGCAAUCGCCUUG	AAGCGAUCGGUUGCGGGUUCAAUCUCCUUCACCA	---	72
SyRS9916	CGU	GC	CGAUGUAGCUCAGCUGGUAGAGCAACCGUUUC	AAAGCGUGGGUCGCGUUCGAAUCCGAGGUCAUCC	---	73
SyWH7803	UGU	GC	CGGCUUAGCUCAG-UGGUAGAGCAGCGCUUUUG	AAAGCGAAGGCCGUCGGUUCAAAUCCGUCACGGC	---	72
SYWH8102	GGU	GC	CCUUGUAGCUCAG-CGGUAGAGCACUCCUUGG	AAAGGAGAGGUCUCGAGUUCAGUCCGUCACCCG	---	72
Gleob7421	UGU	GC	UGGCGUGGCGCAA-CGGUAGCGCAACAGUUUUG	AAACUGUCGGUUAAGGGUUCGAAUCCUUCGCCA	---	72
Syn7942	GGU	GC	CCUUAUAGCUCAG-CGGUAGAGCACUCCUUGG	AAAGGAGAGGUCACGAGUUCAGUCCGUAAGG	---	72
Avar29413	UGU	GC	CAGCAUAGCACAG-UGGUAGUGCAUCCGACUUG	AAUCGGAAGGUCGUCGGUUCAAAUCCGACUCUG	---	72
Syn7335	GGU	GC	CCAUGUGGCUCAG-UGGUAGAGCACACCCUUGG	AAGGGUGAGGUCACGAGUUCAAUCCUCGUCAUUG	---	72
Syn.6803	GGU	GC	CGAAGUAGCUCAG-UGGUAGAGUAGCUGAUUCG	AAUCAGUUGGCCGUGGGUUCAAAUCCCAUCUUCG	---	72
Croc.wats	UGU	GC	UUCCUAGCUCAGUUGGUAGAGCAACUCACUUG	AAUGAGUAGGUCGUCGGUUCAGUCCGACAGGG	---	73
Croc.wats	CGU	GC	CACGUUAGCUCAGUUGGUAGAGCAUACACUCG	AAUGAUAGGCCCGCGAGUUCAGUCCGACGUG	---	73
Croc.wats	GGU	GC	CCGUGUGGCUCAG-UGGUAGAGCACACCCUUGG	AAGGGUGAGGUCACGAGUUCAAUCCUCGUCACGG	---	72
Ecoli	CGU	GC	CGAUUAGCUCAGUUGGUAGAGCAGCGAUUCG	AAUCGGAAGGUCGUCGGUUCAGUCCUUAUUCG	DCA	76
Ecoli	GGU	GC	UGAUUAGGCUCAGUUGGUAGAGCGCACCCUUGG	AAGGGUGAGGUCCCAGUUCGACUCUGGGUAUCA	DCA	76
Ecoli	UGU	GC	CGACUUAGCUCAGUAGGUAGAGCAACUGACUUG	AAUCAGUAGGUCACCAGUUCGAAUCCGGUAGUCG	DCA	76
Pr.9313	CGU	GC	CGGUGUAGCUCAG-GGGUAGAGCAACUGAUUCG	AAUCAGUAGGUCGAGGUUCAAUCCCGUACCCG	---	72
Pr.9313	GGU	GC	CCUUGUAGCUCAG-UGGUAGAGCACUCCUUGG	AAGGGAGAGGUCCCAGGUUCAAAUCCGGCAGGG	---	72
Pr.9313	UGU	GC	CGGCUUAGCUCAG-UGGUAGAGCAGCGCUUUUG	AAAGCGAAGGCCAUCGGUUCAAAUCCGUUAGCCG	---	72
Pr.9301	CGU	GC	CGGUUAGCUCAG-AGGUAGAGCAACUGUCUCG	AAACAGUAGGUCAUUGGUUCAAUCCAAUUAUCG	---	72
Pr.9215	GGU	GC	CCUUGUAGCUCAG-CGGUAGAGCACUCCUUGG	AAGGGAGAGGUCUCGGGUUCAGUCCCGACGAGG	---	72
Pr.9211	GGU	GC	CCUUGUAGCUCAG-CGGUAGAGCACUCCUUGG	AAGGGAGAGGUCUCGGGUUCAGUCCCGACGAGG	---	72
Pr.NATL2	CGU	GC	CGGUGUAGCUCAG-GGGUAGAGCAACUGAUUCG	AACCAGUAGGUCGGUUGGUUCAAUCCACUCAUCG	---	72
Pr.9515	UGU	GC	CGGC UUAGCUCAG-CGGUAGAGCAGCGCUUUUG	AAAGCGAAGGUCAUCAGUUCAAAUCUGUAGCCG	---	72
Pr.NATL1	GGU	GC	CCUUGUAGCUCAG-CGGUAGAGCACUCCUUGG	AAGGGAGAGGUCUCGGGUUCAGUCCCGACGAGG	---	72
Pr.9303	CGU	GC	CGGUGUAGCUCAG-GGGUAGAGCAACUGAUUCG	AAUCAGUAGGUCGAGGUUCAAUCCCGUACCCG	---	72
Pr.9202	GGU	GC	CCUUGUAGCUCAG-CGGUAGAGCACUCCUUGG	AAGGGAGAGGUCUCGGGUUCAGUCCCGACGAGG	---	72

** * . ** * . * * * * * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . * * * * * . *

Figura 4.4 Comparación entre tRNAs^{Thr} de cianobacterias y *E. coli*. Los determinantes de identidad de los tRNAs^{Thr} de *E. coli* se evidencian en rojo. La base discriminatoria U73 de cianobacterias se evidencia en verde, mientras que la A73 de *E. coli* y *Prochlorococcus* se evidencia en amarillo.

En *E. coli*, la base discriminatoria A73 no es un determinante de identidad del tRNA^{Thr}, ya que puede ser mutada sin afectar su aminoacilación, al contrario que la U73 de los

Discusión

tRNAs^{Thr} de *T. termophilus* o de arqueas que es esencial para su reconocimiento por la sintetasa (Hasegawa et al, 1992), (Nameki et al, 1996) (Ishikura et al, 2000). Esto es consistente con que la ThrRS de *E. coli* sea capaz de aminoacilar los tRNAs^{Thr} de *T. termophilus* con eficacia comparable a la enzima de *T. termophilus*, mientras que la ThrRS de *T. termophilus* aminoacila muy poco eficazmente los tRNAs^{Thr} de *E. coli* (Zheltonosova et al, 1994), lo que recuerda el comportamiento de la ThrRS1 de *Anabaena*. Aunque los determinantes de identidad de los tRNAs^{Thr} de cianobacterias aún no han sido identificados, la conservación de la U73 sugiere que, como en el caso de los tRNAs^{Thr} de *T. termophilus*, esta base podría ser fundamental para el reconocimiento, lo que explicaría la incapacidad de ThrRS1 para reconocer los tRNAs^{Thr} de *E. coli*. ThrRS2, en cambio sí puede aminoacilar tRNAs^{Thr} de *E. coli*, lo que sugiere la existencia de diferencias estructurales entre ambas enzimas en la superficie de interacción con el brazo aceptor del tRNA. En *E. coli*, el extremo CCA del tRNA^{Thr} encaja en una hendidura formada por residuos del dominio catalítico y del dominio de edición N2 (Sankaranarayanan et al, 1999). Se ha propuesto que el residuo Glu458 de la ThrRS de *E. coli* podría interactuar con A73 o C74 (Dock-Bregeon et al, 2004). Este residuo está conservado en todas las ThrRS1 mientras que en las ThrRS2 esta posición la ocupa una glicina (Fig. 4.5). Es posible que un aminoácido pequeño como la glicina permita la formación de un bolsillo más amplio capaz de acomodar no solamente el anillo pirimidínico de la U73 del tRNA^{Thr} de las cianobacterias, sino también el doble anillo purínico de la A73 del tRNA^{Thr} de *E. coli*.

Discusión

```
1AcarychlCCME5410 IGSDAEWEKSNQAIIRRAVETLGMDFEFGIGAAAFYGPKLDFIFQDVLDRWQLGTVQVDY 455
1A7120 IGSDDEVWKAEGAIIRRAVEQLGMEHFEGIGAAAFYGPKLDFIFSDALEREWQLGTVQVDY 464
1AnaVar IGSDDEVWKAEGAIIRRAVEQLGMEHFEGIGAAAFYGPKLDFIFSDALEREWQLGTVQVDY 464
1AnaVATCC29413 IGSDDEVWKAEGAIIRRAVEQLGMEHFEGIGAAAFYGPKLDFIFSDALEREWQLGTVQVDY 464
1ArthospNIES-39 IGSDQAWKAENAIIRRAVETLGMNYFEGIGAAAFYGPKLDFIVQDALEREWQLGTVQVDY 453
1CypPCC7425 IGSDQAWKAQTAIRQAVETLGMDFEFGIGAAAFYGPKLDFIFQDALEREWQLGTVQVDY 459
1CyATTC51142 IGSDQAWKAENAIIRRAVQTLMDYFEAEGAAAFYGPKLDFIFQDALEREWQLGTVQVDY 457
1CyaPCC7822 IGGDDVWKAENAIIRSAVQKMNMEHFEGIGAAAFYGPKLDFIFQDALEREWQLGTVQVDY 457
1CyanPCC8801 IGSDAEWEKAQNAIIRRAVQTLMDYFEAPGAAAFYGPKLDFIFHDVLEREWQLGTVQVDY 456
1Fisch.JSC-11 IGSDAEWKAESAIRRAVESLGMDFEFGIGAAAFYGPKLDFIVRDALEREWQLGTVQVDY 460
1GleobViolPCC7421 IGSDAAWEKAQAAILKASQDLGLKYFVAEGAAAFYGPKLDFIFRDALGREWQLGTVQVDY 476
1LyngPCC8106 IGSDQVWKAESAITKAVETLMDHFLGIGAAAFYGPKLDFIFQDVLDRWQLGTVQVDY 457
1Mic.AeruPCC9701 IGSDAEWEKAESAIRKAVQTLGMDFEAPGAAAFYGPKLDFIFQDALEREWQLGTVQVDY 448
1Mi.AeruPCC7806 IGSDAEWEKAQSAIRKAVQTLGMDFEAPGAAAFYGPKLDFIFQDALEREWQLGTVQVDY 448
1Micr.AeruPCC7941 IGSDAEWEKAQSAIRKAVQTLGMDFEAPGAAAFYGPKLDFIFQDALEREWQLGTVQVDY 448
1M.AeruPCC9806 IGSDDAWEKAQSAIRKAVQTLGMDFEAPGAAAFYGPKLDFIFQDALEREWQLGTVQVDY 448
1MAeruPCC9807 IGSDAEWEKAQSAIRKAVQTLGMDFEAPGAAAFYGPKLDFIFQDALEREWQLGTVQVDY 448
1NoAzo10708 IGGDEVWDKSEGAIRRAVQQLGMDFEFGIGAAAFYGPKLDFIFSDALDRWQLGTVQVDY 455
1NodspuCCY9414 IGSDNEVWKAEGAIIRRAVEKLMNYFEGIGAAAFYGPKLDFIFSDALEREWQLGTVQVDY 451
1NoPunc73102 IGSDDEVWKAESAIRRAVETLGMDFEFGIGAAAFYGPKLDFIFSDALDRWQLGTVQVDY 460
1OscilPCC6506 IGGDEVWDKSEGAIRRAVQQLGMDFEFGIGAAAFYGPKLDFIFSDALDRWQLGTVQVDY 455
1SynechocEloPCC7942 IGSDDVWEKAESAIQAAATLGMDFYFVGVGAAAFYGPKLDFIFQDALDRWQLGTVQVDY 452
2AcarychlCCME5410 VGSDDIWDLATQALRTALRERKGDWYLTDEGGCAFYGPKIDIKIRDAIGRLWQCSTIQVDF 465
2A7120 VGNNEVWELATSALRQALDAKGNWYIVDEGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRLWQCSTIQVDF 463
2AnaVarATCC29413 VGNDEVWELATSALRQALTKGNWYIVDEGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRLWQCSTIQVDF 463
2ArthospmaxCS-328 VGNDAVWQLATDALIAALNTKGNWYVTVDEGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRLWQCSTIQVDF 470
2ArthospNIES-39 VGNDAVWQLATDALISALNKGWYVTVDEGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRLWQCSTIQVDF 470
2CrocospWatsWH0003 VGTDEGWELATQALVEALNGKGNWYIEDKGGCAFYGPKIDIKIKDAIGRTWQCSTIQVDF 491
2CrocospWatsWH8501 VGTDEGWELATQALVEALNGKGNWYIEDKGGCAFYGPKIDIKIKDAIGRTWQCSTIQVDF 491
2CyanoATTC51142 VGSDDVWQLATEALIKALNNKQWNYLEDKGGCAFYGPKIDIKIKDAIGRLWQCSTIQVDF 515
2CyaCCY0110 VGTDEGWELATQALVEALNKSWEYIEDKGGCAFYGPKIDIKIKDAIGRTWQCSTIQVDF 491
2MAeruNIES-843 VGSDSVWELATAALIEALNAKKNWYIEDQGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRMWQCSTIQVDF 467
2MicroAeruPCC9701 VGSDSVWELATAALIEALNAKKNWYIEDQGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRMWQCSTIQVDF 467
2M.AeruPCC9717 VGSDSVWELATAALIEALNAKKNWYIEDQGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRMWQCSTIQVDF 467
2Mic.AeruPCC7806 VGSDSVWELATAALIEALNAKKNWYIEDQGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRMWQCSTIQVDF 467
2Micro.AeruPCC9806 VGSDSVWELATAALIEALNAKKNWYIEDQGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRMWQCSTIQVDF 467
2AeruPCC9808 VGSDSVWELATAALIEALNAKKNWYIEDQGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRMWQCSTIQVDF 467
2MiAeruPCC9809 VGSDSVWELATAALIEALNAKKNWYIEDQGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRMWQCSTIQVDF 467
2MicT1-4 VGSDSVWELATAALIEALNAKKNWYIEDQGGCAFYGPKIDIKIQDAIGRMWQCSTIQVDF 467
2Syn.PCC9311 IGDDAVWELATKGLIEALRKGWAYKIDEGGCAFYGPKIDIKIEDAIGRMWQCSTIQVDF 455
2SynechocRS9916 IGDDAVWDLATKGLIEALRKGWAYKVDEGGCAFYGPKIDIKIEDAIGRMWQCSTIQVDF 455
2SynWH7803 IGDDAVWDLATKGLIEALRKGWAYKIDEGGCAFYGPKIDIKIEDAIGRMWQCSTIQVDF 455
2SynWH7805 IGDDAVWDLATKGLIEALRKGWAYKIDEGGCAFYGPKIDIKIEDAIGRMWQCSTIQVDF 455
*: *: *: : * . . * .*****::: . * : * * .*:*:*::
```

Figura 4.5 Diferencias entre ThrRS1 y ThrS2 en el residuo implicado en contacto con A73 del tRNA^{Thr}. El residuo de la enzima que interacciona con A73 o C74 del tRNA es un glutamato en las ThrRS1 (en rojo) y una glicina en las ThrRS2 (en azul).

4.2 Expresión diferencial de los genes *thrS*

thrS1 y *thrS2* presentan diferentes perfiles de expresión. *thrS1* es un gen esencial que se expresa a alto nivel en condiciones estándar de cultivo, en las que la expresión de *thrS2* es apenas detectable. *thrS2* se induce unas 50-100 veces en respuesta a la deficiencia de zinc de forma concomitante a un descenso moderado de la expresión de *thrS1* que alcanza un 50% de su nivel de expresión en condiciones estándar. Resultados de PCR en tiempo real de otros miembros del grupo demuestran que *thrS2* tiene un nivel de expresión de más de 10 veces el de *thrS1* en condiciones de deficiencia de zinc.

Dado que la célula requiere este metal en cantidades traza es difícil conseguir un medio de cultivo libre de zinc, por lo que al igual que otros investigadores, nos hemos visto obligados a utilizar quelantes para inducir la deficiencia en nuestros cultivos. De los quelantes disponibles, el más ampliamente utilizado para inducir deficiencia de zinc en cultivos es el TPEN, que permea a través de las membranas celulares. Aunque en

Discusión

numerosos artículos se refiere al TPEN como un quelante específico de zinc, en otros estudios se demuestra que no es así (Blindauer et al, 2006), (Sigdel et al, 2006) y durante esta tesis se ha comprobado que en *Anabaena* puede causar también deficiencia de cobre e hierro. A pesar de ello, el uso de TPEN ha sido una herramienta útil en el análisis de la expresión del operón *all4725-all4721*. La especificidad en la respuesta al zinc se ha demostrado mediante acercamientos complementarios: en primer lugar se ha demostrado que este operón está regulado por una proteína de la familia FUR cuya unión al DNA requiere zinc, mientras que otros metales son improductivos a la hora de inducir su interacción con el DNA (Fig. 3.19); por otro lado, resultados de otros miembros del laboratorio han demostrado que un mutante de este regulador presenta una alta sensibilidad a la presencia de zinc, pero no de otros metales, en el medio de cultivo.

4.3 El operón *all4725-all4721*

thrS2 (*all4723*) se encuentra en un agrupamiento de genes con la misma orientación (*all4729-all4721*). Varias observaciones indicaban que *thrS2* podría cotranscribirse con genes adyacentes, por ejemplo la señal de hibridación en experimentos de Northern no era una banda discreta sino un barrido que abarcaba transcritos entre 0.5 y 6-7 Kb. Por otra parte, los genes *all4725*, *all4724*, *all4722* y *all4721* mostraban señales de hibridación y perfiles de regulación similares (Fig. 3.10). La existencia de transcritos largos que solapan con dos o tres ORFs contiguas se ha demostrado mediante experimentos de RT-PCR (Fig. 3.11). En estos experimentos se observó la existencia de transcritos solapantes entre ORFs adyacentes desde *all4727* a *all4721*. Algunas observaciones indican que a pesar de esto, en este agrupamiento encontramos dos unidades funcionales diferentes. Por un lado, *all4727* y *all4726* forman un operón que no se induce (o se induce levemente) en respuesta al tratamiento con TPEN y que no está regulado por Zur (*all4727* no está desreprimido en el mutante *zur*). Por otra parte, los genes *all4725-all4721* forman un operón cuya expresión se induce de 50 a 100 veces en respuesta al tratamiento con TPEN y está regulado por Zur. La existencia de transcritos solapantes entre *all4726* y *all4725* se debe probablemente a la invasión de esta última ORF por parte de complejos de RNAP provenientes del promotor que precede a *all4727*. Esto es consistente con la observación de una secuencia que podría constituir un terminador intrínseco imperfecto en el espacio intergénico entre *all4726* y *all4725*.

Discusión

En el agrupamiento *all4727-all4725* se han identificado cinco promotores mediante un acercamiento de 5'-RACE que permite distinguir inicios de la transcripción genuinos, con un grupo trifosfato en el extremo 5', de otros extremos 5' con un grupo monofosfato, generados por el procesamiento de un transcrito mayor (Fig. 3.12 y 3.13). Este procedimiento es por tanto el adecuado para identificar inicios de la transcripción internos en un operón (Bensing et al, 1996). Uno de los promotores identificados se encuentra delante de *all4727* y es el responsable de la transcripción de *all4727* y *all4726*. Los otros cuatro preceden respectivamente las ORFs *all4725*, *all4723*, *all4722* y *all4721*. Como se señala anteriormente, la señal de hibridación que se obtiene con sondas de estos genes en experimentos de Northern es un barrido amplio al que se superponen algunas bandas discretas de mayor intensidad. Estas bandas podrían ser productos de procesamiento de transcritos largos o podrían corresponder a transcritos que se inician en los promotores internos que se han identificado.

Un carácter llamativo del operón *all4725-all4721* es que al menos tres de sus genes están relacionados con funciones de mantenimiento esenciales. *all4725* cifra una hipotética porfobilinógeno sintasa (PBGs), también conocida como deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico (ALA). Las PBGs catalizan la condensación de dos moléculas de ácido δ -aminolevulínico para formar porfobilinógeno, que es el precursor de todos los tetrapirroles, como la vitamina B12, la clorofila o el grupo hemo (Jaffe, 2004). *all4723* cifra una ThrRS cuya función se describe con detalle en apartados anteriores, y *all4721* cifra una GTP ciclohidrolasa (GCYH), la (Bensing et al, 1996) en mamíferos, en cambio, cataliza la síntesis de bipterina. El tetrahidrofolato funciona como cofactor en muchas reacciones de intercambio de un átomo de carbono e interviene en la biosíntesis de purinas, timidilato, pantotenato, o de algunos aminoácidos como glicina, serina y metionina y también en la síntesis del tRNA iniciador fmet-tRNA (Auerbach et al, 2000). Los cinco genes del operón cuentan con homólogos en el genoma de *Anabaena*. Los homólogos de los genes mencionados que participan en rutas esenciales se expresan en condiciones estándar de cultivo y son probablemente los genes *housekeeping*.

Otro aspecto interesante es que los genes que constituyen el operón no muestran una relación funcional aparente, de lo que se deduce que su expresión coordinada responde a la necesidad de una regulación común. En consonancia con la regulación por zinc que se describe en este trabajo, se ha observado que al menos 4 de los 5 supuestos productos

Discusión

proteicos utilizarían un cofactor metálico en el sitio activo. Por ejemplo, todas las porfobilinógeno sintasas utilizan un cofactor metálico que se encuentra en el sitio activo y está implicado en la actividad catalítica (Jaffe, 2004). Se ha observado una correlación entre la secuencia de aminoácidos del sitio activo y la naturaleza del cofactor metálico. Las PBGS con una secuencia rica en cisteína, (DXCXCX(Y/F)X₃G(H/Q)CG) en el sitio activo unen zinc, mientras que las que portan una secuencia rica en aspartato (DXALDX(Y/F)X₃G(H/Q)DG) utilizan magnesio o potasio (Jaffe, 2003). *Anabaena* posee ambos tipos de PBGS, la dependiente de zinc, cifrada por *alr4380*, y la que utiliza Mg o K cifrada por el gen *all4725* del operón. Esto sugiere que en condiciones de deficiencia de zinc, en las que el producto de *alr4380* es probablemente inactivo, *Anabaena* utilizaría la enzima paróloga (All4725) independiente de zinc. Hemos observado que la presencia de los dos tipos de PBGS no es infrecuente en los genomas cianobacterianos y está a menudo asociada a la duplicación de los genes *thrS* (Fig. 4.6). Sería interesante investigar sobre la presencia de secuencias de unión de Zur en las proximidades de los genes que cifran PBGS independientes de zinc en las cianobacterias que presentan la duplicación.

A. 7120	D--KDDATGAWHDCGIVQKAATAVKAAPDLIVIA	DTCLCEYTSHGHC	130
A. var. 29413	D--KDDATGAWHDCGIVQKAATAVKSAPDLIVIA	DTCLCEYTSHGHC	130
A. cyl. 7122	D--KDV DATGAWHDCGIVQKAATAVKEAVPDLIVMA	DTCLCEYTNHGHC	130
Cya. 51142	E--KDTEATGAWHDHGI VQQAATAVKEAIPDLVVIV	DTCLCEYTSHGHC	131
Myc. 9701	S--KDTEATGAWHNHGI VQKAATAI KEAVPDLIVIA	DTCLCEYTNHGHC	130
Myc. 9432	S--KDTEATGAWHDHGI VQKAATAI KEAVPDLIVIA	DTCLCEYTNHGHC	130
Myc. 9808	S--KDTEATGAWHDHGI VQKAATAI KEAVPDLIVIA	DTCLCEYTNHGHC	130
Myc. NIES843	S--KDTEATGAWHDHGI VQKAATAI KEAVPDLIVIA	DTCLCEYTNHGHC	130
Myc. 9809	S--KDTEATGAWHDHGI VQKAATAI KEAVPDLIVIA	DTCLCEYTNHGHC	130
Myc. 9806	S--KDTEATGAWHDHGI VQKAATAI KEAVPDLIVIA	DTCLCEYTNHGHC	130
Acar. 5410	E--KDDATGAWHDHGI VQKASTAVKEAVPDLIVIV	DTCLCEYTOHGHC	130
Myc. T1-4	S--KDTEATGAWHDHGI VQKAATAI KEAVPDLIVIA	DTCLCEYTNHGHC	130
Cya. 0110	D--KDDATGAWHDHGI VQQAATAVKAIPDLVVIV	DTCLCEYTSHGHC	130
Acar. 11017	E--KDDATGAWHDHGI VQKASTAVKEAVPDLIVIV	DTCLCEYTOHGHC	130
A. 7120	ENKKDDIGAESYNPEGLVQQT VTKAIKQAVPDI VIT	DVALDPFTTHGHD	143
A. var. 29413	ENKKDDIGAESYNPDGLVQQT VTKAIKQAVPDI VIT	DVALDPFTTHGHD	143
A. cyl. 7122	ENKDDTGTESYNPEGLVQET VTKAIKQAVPEI I VIT	DVALDPFTTHGHD	143
Cya. 51142	DEKKDNQGTESYNPNGLVQRT VTKAIKQEI PQLIVIT	DVALDPYSYGHG	136
Myc. 9701	EDKKDNCGRESYNPDGLVPRAVKAIKKEVPEI I IIT	DVALDPFSYGHG	130
Myc. 9432	EDKKDNFGRESYNPDGLVPRAVKAIKKEVPEI I IIT	DVALDPFSYGHG	130
Myc. 9808	EDKKDNFGRESYNPDGLVPRAVKAIKKEVPEI I IIT	DVALDPFSYGHG	130
Myc. NIES843	EDKKDNFGRESYNPDGLVPRAVKAIKKEVPEI I IIT	DVALDPFSYGHG	130
Myc. 9809	EDKKDNFGRESYNPDGLVPRAVKAIKKEVPEI I IIT	DVALDPFSYGHG	130
Myc. 9806	EDKKDNFGRESYNPDG LVP GAVKAIKKEVPEI I IIT	DVALDPFSYGHG	130
Acar. 5410	PKQKDNAGTESYNPEGLVPRVTKAIKAEFPPELLVMT	DVALDPYSSAGHD	151
Myc. T1-4	EDKKDNFGRESYNPDGLVPRAVKAIKKEVPEI I IIT	DVALDPFSYGHG	130
Cya. 0110	TEKKDNAGTESYNPDGLVQHT IKAIKQEI PEMTVIT	DVALDPFSYGHG	139
Acar. 11017	AEQKDNAGTESYNPEGLVPRVTKAIKAEFPPELLVMT	DVALDPYSSAGHD	151

Figura 4.6 Comparación de sitios activos de porfobilinógeno sintasas de cianobacterias. Los motivos ricos en cisteína se representan en rojo, aquellos ricos en aspartato en amarillo.

all4722 cifra una proteína de tipo *COG0523* perteneciente a la subfamilia G3E de GTPasas relacionadas con las biosíntesis de centros catalíticos dependientes de metales. Miembros de esta familia son por ejemplo *UreG* e *HypB*, cuya función es proporcionar Ni a los centros catalíticos de la ureasa e hidrogenasa respectivamente. La primera

Discusión

proteína de tipo COG0523 descrita fue CobW en *Pseudomonas denitrificans*, que está implicada en la biosíntesis de cobalamina (también conocida como vitamina B12) (Crouzet et al, 1991). Desde entonces todas las proteínas homólogas han sido erróneamente anotadas como proteína “cobW-like” y se les ha asignado una función asociada a la biosíntesis de vitamina B₁₂. Sin embargo un reciente estudio genómico y filogenético ha clasificado las proteínas COG0523 en 15 subgrupos, de los que sólo uno incluye proteínas implicadas en la biosíntesis de cobalamina. Un subgrupo de particular interés está compuesto de proteínas cuyos genes se encuentran aguas abajo de secuencias de unión del represor Zur y por esto se propone que están implicadas en la respuesta a condiciones de deficiencia de zinc (Haas et al, 2009). Las proteínas de la familia G3E se caracterizan por poseer en la región N terminal un dominio GTPasa altamente conservado que contiene un motivo CXCC de unión a metal. Este dominio es esencial para facilitar la inserción del cofactor en el sitio catalítico de la enzima diana (función insertasa). Además de esta función otros miembros de la familia pueden funcionar como proteínas de almacenamiento de metales (función de metalochaperonas), lo que generalmente va asociado a la presencia de un dominio C terminal rico en histidinas, con elevada afinidad por los metales. Las proteínas con ambos dominios pueden presentar ambas actividades, funcionando como metalochaperonas/insertasas. Cuatro genes del genoma de *Anabaena* cifran proteínas de tipo COG0523 (Fig. 4.7). All4722 y All1093 presentan motivos constituidos por 19 y 22 histidinas, respectivamente en el dominio C terminal lo que sugiere que podrían funcionar como metalochaperonas, mientras que All1751 y All3392 sólo cuentan con 3 y 4 histidinas, respectivamente en este dominio. El perfil de regulación de *all4722* y el dominio rico en histidinas de su producto proteico, con una previsible afinidad por metales elevada, sugieren que éste podría participar en la maduración de alguna metaloproteína, capturando zinc u otro metal y facilitando su inserción en el bolsillo de coordinación de la proteína diana.

Discusión

```

all14722      MNTLTAETTNIIPEIPKRGMPVTIIITGFLGSGKTTLLNQILKNKHDLVAVLVNEFGDIN 60
alr1093      MQSAVTDNSQPM-DAPKQGMPTIIITGFLGSGKTTLLNHILSNQOGLTAVLVNEFGEIG 59
all11751     -----MMADVITDSVPVTLTGYLGAGKTTLLNHILTYEHGKKVAIVNEFGEVG 50
all13392     -----MAQKIPVTVIITGFLGSGKTSLIRHLQNNAGRRIRAVLVNEFGEIG 45
              :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
all14722      IDSQLLVS-----VDQDMLLELSNGCICCTTINDGLVDVAVRVLEREERIDYLVVIETT 111
alr1093      IDNELIVS-----TDENMVELSNGCICCTTINDGLVDVAVYKVLEREKLDYLVVETT 110
all11751     IDNQLVI-----DADEEIFEMNNGCICCTVIRGDLIRIISNLMKRRDKFDHLVIETT 101
all13392     IDGDLKSCQVCPEDDGGSNIFELTNGCICCTVQEEFLPTMQELLKRRDSIDCVIETS 105
              **:*:*
              ..*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
all14722      GVADPLPIILLTFLGTE-LRDLTNLDSILTVVDAEAFEPN-----HFSEAAA--- 156
alr1093      GLADPLPVALTFLGTE-LRDLTRLDSIITVVDAANYSLD-----LFNSQAA--- 155
all11751     GLADPAPVIQTFFVDEDMQSQLSLDAVVTLVDAKHIWQ-----HWDAAEA--- 146
all13392     GLALPKPLVKAFRWQE-IRNAATVDVAVTVVDDCAAVASGTFASDLEAIAIQRAADSLEH 164
              *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
              :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
all14722      -----LKQLTYADIILLNKTDLATSEKIQALEDYIQ-TVKDSARILHTKYGEVALPL 207
alr1093      -----YSQIAYGDVILLNKTDLVDEASLNDLERKIN-EVKEGARILRTRKRSQVPLPL 206
all11751     -----QEQIAFADVILLNKTDLVTPSELDELEKRIR-SMNAIAKIYRTRNSELAMDA 197
all13392     ETPQLQELFEDQLACADLVVLSKTDLVDAATKSQVEELVKQELPRVVKMVESDRGQLDPSI 224
              .:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
all14722      ILGVGLTPKD---DYTADDAEDAHEHNHEHHSHHEHDH-----HDHHEKHHEHHS 256
alr1093      ILSVGLFESDKYYDAADEHSHHHDHHDHDSACEHHDHHDHDSACGHHDHDEHHS-HHS 265
all11751     LLGVKAFDLDR-----ALEIDPNFLGED 220
all13392     LLGFQAAVEDN-----LDSRPSHHDTEE 247
              :*.. *
              . : . .
all14722      HHLDNDGFVSVSFQSDRPFVHKFENFLTEEMPQN---VFRAGKILWFSDEL RHIFQLS 313
alr1093      DHLENDGFTSISFQSDQPFSSIRKFQYFLDNQLSTN---IFRAGKIMWFDES PKRHIFHLC 322
all11751     AHEHDDTVFVSVALVQEGELDGEKLNAWISELLRTQGTDFRMKGILNIAGEDNRFFVQGV 280
all13392     DHHDHDDITSTHLLDRDFDEKLOQLQTLTNQQ--EIVRIKGFVAVPNKPMRLVMQGV 305
              * . * . * : : : . . * : : : : : * * * : . . * : :
all14722      GPRYN-LHADEWHTLP--KNQLVFIGRKLNTNQIYTLQNNCLV----- 353
alr1093      CKRFT-LDDEEWKGEF--KNQIVLIGQNLDRRETLTQLENCVCLPSTRGQGFVK 374
all11751     HMI F DGRPDRLWKPNEKRKNELVFIGRNLDEAQLKQDFLACFA----- 323
all13392     GNRFDKFYDRPWQPQEARQTRLVFIGRDLNSTEIESQLVAL----- 346
              :
              * :
              : : * : * : * : * : : :

```

Figura 4.7 Alineamiento de secuencias de las proteínas tipo COG0523 de *Anabena* 7120. En rojo se evidencia el motivo CXCC de unión de metal. En verde se representan los motivos ricos en histidinas.

Las GTP ciclohidasas (FolE o GCYH) también son enzimas dependientes de zinc (Auerbach et al, 2000). La enzima más extendida en bacterias es el producto del gen *folE1* y se denomina GCYH-IA. Recientemente se ha descubierto un nuevo tipo de GCYH independiente de zinc, que presenta actividad con Mn, Fe y en menor medida con Mg (El Yacoubi et al, 2006). Esta proteína, llamada FolE2 o GCYH-IB, no es homóloga a la enzima dependiente de zinc (Grochowski et al, 2007), (Sankaran et al, 2009). Algunas bacterias poseen ambas enzimas y en *B. subtilis* se ha demostrado que *folE2* está regulada por el represor Zur (Sankaran et al, 2009), (Gaballa et al, 2002). El gen *alr5287* de *Anabaena* y su homólogo del operón, *all4721*, cifran ambos hipotéticas GTP ciclohidasas. Sorprendente, ambas proteínas son de tipo GCYH-IA dependientes de zinc, lo que no parece estar en consonancia con la inducción de *all4721* en condiciones de deficiencia de zinc que observamos. Una hipótesis interesante es que All4721 podría obtener su cofactor mediante la interacción con una metalochaperona, siendo All4722 un buen candidato a investigar. Aunque quedan numerosos aspectos por investigar, el modelo de regulación del operon *all4725–all4721* y su composición génica indican que es un operón implicado en la respuesta celular a

Discusión

condiciones de deficiencia de zinc. Sus productos probablemente funcionan como proteínas alternativas que podrían sustituir a sus homólogas dependientes de zinc en condiciones de baja concentración de este metal. Estas proteínas de “emergencia” podrían bien utilizar un cofactor alternativo, como en el caso de la PBGS independiente de zinc cifrada por *all4725*; presentar una afinidad por zinc superior a la de sus homólogos *housekeeping* o adquirir el cofactor de zinc por la mediación de un intermediario como la metalochaperona/insertasa cifrada por el gen *all4722*.

Aunque en la cianobacterias el grado de organización del genoma en operones es muy bajo en comparación con otras bacterias (Wolf et al, 2001); (Koonin & Wolf, 2008), se observa que el agrupamiento *all4725-all4721* se conserva parcialmente en algunas especies (Fig. 4.8). En los agrupamientos los genes no siempre se disponen en la misma orientación y en algunos casos aparecen nuevos genes no presentes en el operón *all4725-all4721* de *Anabaena*, cuyos productos son también hipotéticas metaloproteínas dependientes de zinc como HisI o CysS. La conservación parcial de este operón en otras cianobacterias subraya el papel de estos genes en la adaptación a condiciones de limitación de zinc.

Discusión

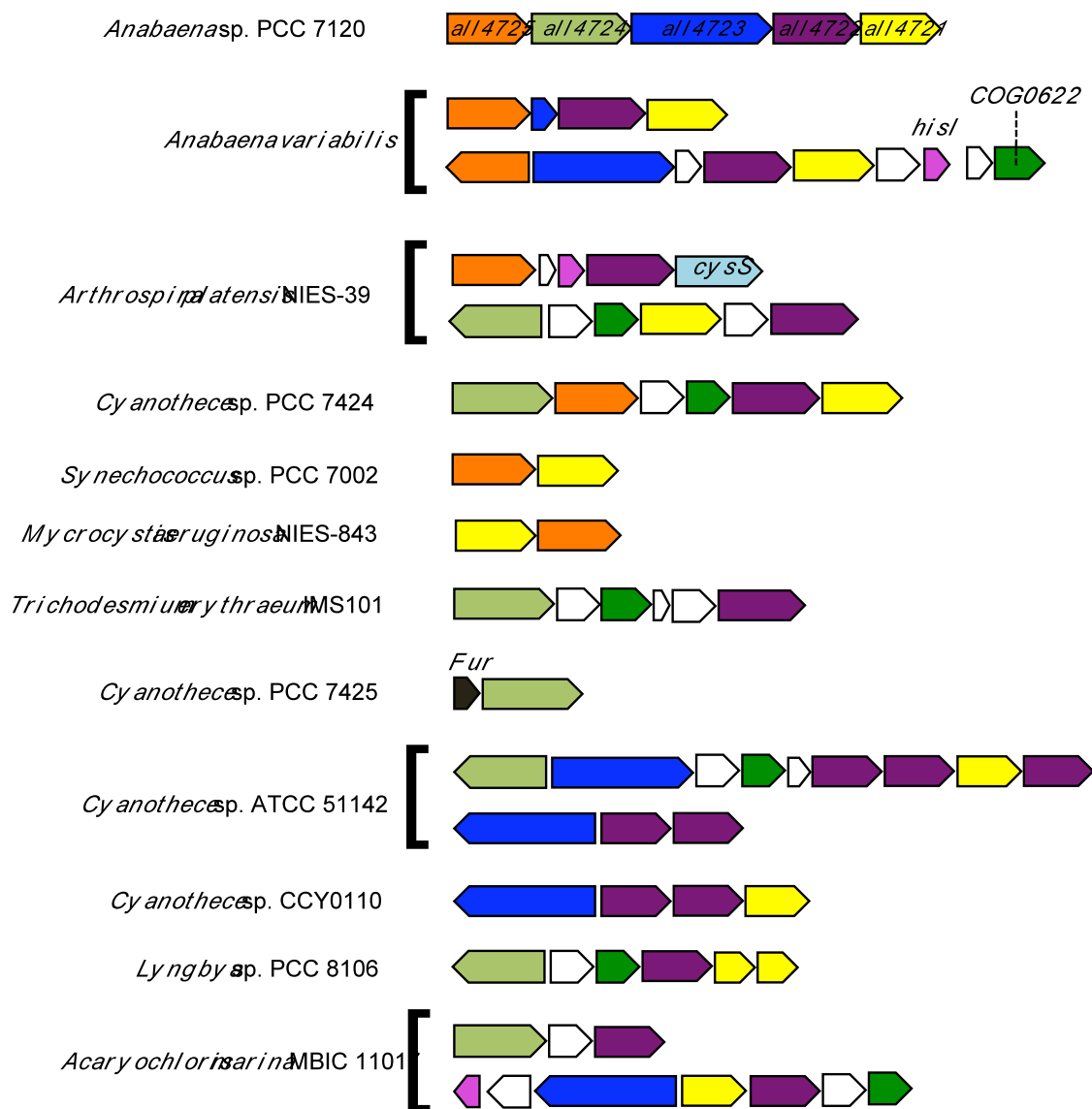


Figura 4.8 Conservación parcial del operón *all4725-all4721* en cianobacterias. Los genes del operón se representan con el mismo código de color en todos los operones. La identidad de los genes no representados en el operón *all4725-all4721* se indica.

4.4 Elementos reguladores del operón *all4725-all4721*

De las tres proteínas de la familia FUR cifradas en el genoma de *Anabaena*, All2473 se ha identificado en esta tesis como un regulador del operón *all4725-all4721*. En este trabajo se demuestra que All2473 se une al DNA de forma específicamente dependiente de zinc, por lo que la hemos denominado Zur (zinc uptake regulator) siguiendo la nomenclatura asignada a la proteína ortóloga en otros organismos (Baichoo & Helmann, 2002). Esta sería la primera proteína Zur identificada como tal y caracterizada

Discusión

empíricamente en cianobacterias. Se ha descrito que el producto del mismo gen *all2473* de *Anabaena* sp. PCC 7120 se une en condiciones de estrés oxidativo al DNA de forma inespecífica y se ha propuesto que actuaría como una protección frente a posibles daños en el DNA (Lopez-Gomollon et al, 2009). Los resultados que se presentan en esta tesis muestran que este regulador se une de forma específica a secuencias palindrómicas de DNA. El papel propuesto para Zur (llamada FurB en el trabajo de López-Gomollón en la protección contra el estrés oxidativo no es incompatible con el papel de regulador transcripcional que se le asigna en este trabajo y, de ser así, Zur sería una proteína “moonlight” que presenta multiplicidad de funciones.

Las secuencias de unión de Zur identificadas en esta tesis son palíndromos de tipo 7-1-7 como las que se han descrito para Zur en *Streptomyces coelicolor* (Shin et al, 2011) u otras proteínas de la familia FUR en distintos organismos (Baichoo & Helmann, 2002), (Lee & Helmann, 2007). Se presentan evidencias que indican que los nucleótidos que flanquean la secuencia 7-1-7 son también importantes para la unión, lo que es consistente con lo observado en otras bacterias, cuyas secuencias de unión de Zur son ligeramente más amplias, siendo palíndromos de tipo 9-1-9 (Gabriel et al, 2008), (Li et al, 2009) o 10-1-10 (Maciag et al, 2007), (Schroder et al, 2010). De los resultados que se presentan se deduce que, a diferencia de otros reguladores transcripcionales de cianobacterias como NtcA o FurA (Luque & Forchhammer, 2008), (Lopez-Gomollon et al, 2007), que pueden reconocer secuencias de DNA relativamente degeneradas, el regulador Zur de *Anabaena* es altamente específico, ya que pequeñas variaciones en la secuencia diana respecto al consenso determinan una disminución muy importante de su afinidad (que se manifiesta como un incremento de gran magnitud en la K_d).

Zur es una proteína pequeña homodimérica en la que cada monómero está constituido por un dominio N terminal de unión al DNA y otro C terminal de dimerización, unidos por un lazo conector flexible (Lucarelli et al, 2007), (Ma et al, 2011), (Shin et al, 2011). Se han identificado dos o tres sitios de coordinación de zinc por monómero. El sitio 2 localizado en el lazo conector es el sitio de regulación, cuya ocupación por parte del cofactor determina la activación de la proteína para que se una al DNA. La unión del metal a este sitio determina la inmovilización del lazo conector, fijando ambos dominios en una conformación “cerrada”, compatible con la unión a la doble hélice del DNA (Shin et al, 2011) (Fig. 4.9).

Discusión

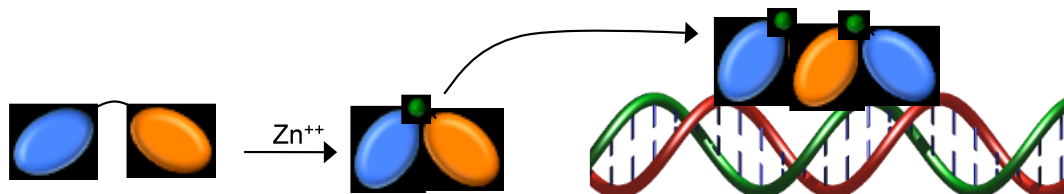


Figura 4.9 Activación de Zur. Tras la unión de un átomo de zinc en el sitio 2, el monómero de Zur adopta una conformación cerrada competente para la unión al DNA.

La función del sitio 3 es objeto de controversia. Según algunos se trata de un segundo sitio de regulación que permite una modulación sutil de la actividad del represor (Shin et al, 2011), (Ma et al, 2011)). Como se muestra en figura 4.10 el sitio 2 regulador no está conservado en la proteína que en este trabajo se ha identificado como Zur de *Anabaena*, que sólo conserva uno de los residuos de coordinación de este sitio (His78). Los sitios 1 y 3 sí están conservados, aunque los residuos en posición 75 y 96 del sitio 3 están permutados con respecto a otras proteínas Zur. Otra peculiaridad importante de la proteína Zur de *Anabaena* es que su lazo conector es más corto, por lo que probablemente limita el desplazamiento relativo de ambos dominios. La ausencia del sitio 2, plantea la cuestión de qué sitio de coordinación funciona como regulador, y sugiere la existencia de un mecanismo de acción atípico para Zur en las cianobacterias.

```

7120      MRAIR -----TRSQERILNLLQTIKQGISAQDIYVELRNRNQSMGLATVYRSL 48
BS       MNVQEALNLLKENGKYKYNKREDMLQLFADSDRYLTAKNVL SALNDDYPGLSFDTIYRNL 60
MT       MSAAG -----VRSTRQRAAISTLLETLDLDFRSAQELHDELRRRGENIGLTTVYRTL 51
SC       MTTAGPPP-----VKGRATRQRAAVSAAALQEVEEFRSAQELHDM LKHKGDAVGLTTVYRTL 55
* .           * . . . : : . : * : : : * .           : : * : * . *

7120      EALKLEGLV QVRTLPNGEALYS LAQ--CKHHLTCLQCGVSI EIHQCPVHNLEEQLQTAH 106
BS       SLYEELGIL TTELSGKELFRFK SFTHHHHHFT CLACGKTK EIESCPMDKLCDDLD--- 117
MT       QSMASGLV TLHTDTGESVYRR ES-EHHHHLVCRSCGSTIEVGDHEVEAWAAEVATKH 110
SC       QSLADAGEV VLRTAEGESVYRR STGDHHLVCRACGKAV EVEGPAVEKWAEATAAEH 115
. * : : . : . . . : * : * : : : : :

7120      KFKIFY TLEFFGLCGK CQMNHASEI 132
BS       GYQVSG KFEIYGTCPDCTAENQD-- 141
MT       GFSDVS HTIEIFGTCSDCRS----- 130
SC       GYVNVA HTVEIFGTCAD CAGASGG-- 139
: * . : : * * . *

```

Figura 4.10 Alineamiento de secuencias de proteínas Zur. Se comparan las proteínas Zur de *Anabaena* 7120 (7120), *Bacillus subtilis* (BS), *Mycobacterium tuberculosis* (MT) y *Streptomyces coelicolor* (SC). El sitio 1 (estructural) se representa en amarillo, el sitio 2 (de regulación), ausente en la proteína de *Anabaena* 7120, se representa en verde, el sitio 3 en rojo.

Discusión

De los cuatro promotores identificados en el operón *all4725-all4721*, Zur se une con alta afinidad a P₅ y P₃, no se une a P₂ y lo hace con muy baja afinidad a P₁. Es probable que la unión de Zur a éste último detectada en ensayos *in vitro* de retardo en gel sea un artefacto experimental debido a la utilización de concentraciones demasiado elevadas de esta proteína en el ensayo (probablemente por encima de los niveles celulares). Resultados experimentales de otros miembros del laboratorio así lo indican, ya que Zur no reprime la actividad de P₁ en ensayos de transcripción *in vitro*, a diferencia de lo que ocurre con P₅ y P₃. También, resultados *in vivo*, como la no inducción de P₁ en el mutante MN8 tras el tratamiento con TPEN, excluyen a Zur como regulador de este promotor. Se puede concluir pues que P₁ no es una diana directa de Zur. Por tanto, de los cuatro promotores del operón, los dos situados más a 5' (P₅ y P₃) están regulados directamente por Zur y los situados hacia 3' (P₂ y P₁) no son dianas directas de Zur. A pesar de ello, experimentos de extensión del cebador indican que estos dos promotores se inducen por la adición de TPEN y se encuentran constitutivamente inducidos en un mutante Zur, mostrando un perfil de regulación sorprendentemente similar a P₅ y P₃. El control de estos promotores por un regulador sensible a metales distinto a Zur no parece una hipótesis probable, ya que en ese caso se esperaría la inducción de ambos promotores tras el tratamiento con TPEN en el mutante insercional MN8. En dicho mutante, el efecto polar sobre la transcripción de los genes *all4722* y *all4721* provocado por la inserción de la cassette C.S3 en el gen *all4723*, fue un resultado inesperado y sorprendente. La hipótesis del requerimiento del producto del gen mutado (ThrRS2) para la activación de los promotores P₂ y P₁, aunque enormemente atractiva en virtud de las funciones *moonlighting* descritas para algunas aaRSs (que en algunos casos participan en el control de la transcripción), se descartó ya que un mutante de delección del mismo gen (MN42) presenta un perfil de regulación de P₁ similar al del silvestre. Por tanto, no es la inactivación del gen *all4723* (*thrS2*) sino la interrupción de la transcripción en el mutante MN8 lo que parece determinar la ausencia de inducción de los promotores P₂ y P₁. Parece pues que cuando la maquinaria transcripcional procedente de los promotores situados aguas arriba alcanza P₂ y P₁, estos se activan adoptando el mismo tipo de regulación que aquellos. En función de esta hipótesis se pudo predecir que la inserción de un promotor distinto aguas arriba de P₂ y P₁ determinaría que éstos adoptasen un perfil de expresión similar al del promotor insertado. Esta hipótesis se probó en la estirpe MN52 en la que se observó que P₂ adoptaba una regulación similar a la del promotor *Pnir* insertado delante de *all4723*. La

Discusión

inserción de *P_{nir}* también provocaba un cambio en el perfil de expresión de *P₁*, si bien éste no era idéntico al de *P_{nir}* y se explicará más adelante. Estos resultados indican que los complejos de transcripción procedentes desde aguas arriba influyen la actividad de *P₂* y *P₁*, un fenómeno conocido como interferencia transcripcional de promotores (Palmer et al, 2011). El caso que se presenta se podría delimitar dentro de la categoría de interferencia transcripcional de promotores en tándem, dada la disposición de éstos. Los mecanismos subyacentes a este fenómeno son variados pero generalmente implican una alteración de la accesibilidad de un promotor o del ensamblaje de la maquinaria transcripcional en éste provocada por la transcripción a partir de un promotor relativamente cercano. En algunos casos, el fenómeno de interferencia transcripcional de promotores puede ocurrir a causa de variaciones del estado de superenrollamiento del DNA. El avance de la RNAP produce superenrollamiento positivo delante del complejo transcripcional y superenrollamiento negativo detrás (Liu & Wang, 1987) y se han descrito promotores cuya actividad es sensible al grado de compactación del DNA (Rhee et al, 1999), (Niehus et al, 2008), (Lim et al, 2003). La transcripción de un promotor puede provocar alteraciones en el estado de superenrollamiento de un promotor cercano que pueden modular la actividad de éste, al variar la energía que necesita la RNAP para la desnaturalizar la doble hélice o afectar la unión de eventuales activadores o represores (Rhee et al, 1999); (Fang & Wu, 1998). La posibilidad de que la actividad transcripcional a partir de *P₂* y *P₁* sea sensible al grado de superenrollamiento del DNA no ha sido objeto de estudio en esta tesis.

En otros casos, el fenómeno de interferencia transcripcional de promotores puede ocurrir mediante el desalojo de factores de transcripción. Algunas observaciones y algunos resultados obtenidos en esta tesis sugieren que en *Anabaena* los promotores *P₂* y *P₁* se mantienen a nivel basal por represión. Por ejemplo, el promotor *P₂* es muy similar al promotor consenso de *E. coli* (con una sola diferencia en la caja -35 y un espaciamiento óptimo entre las cajas -35 y -10) que es reconocido con una alta eficacia por la RNAP de cianobacterias (Ferino & Chauvat, 1989), (Huang et al, 2010), (Elhai, 1993). Consistentemente con esto, resultados obtenidos por colaboradores y otros miembros del grupo muestran que la RNAP de *Anabaena* reconoce eficazmente a los promotores *P₂* y *P₁* en ensayos de transcripción *in vitro*. Por otra parte, ambos promotores mostraron una elevada actividad cuando se clonaron en un vector de *Escherichia coli* que contiene los genes de la luciferasa de *Photorhabdus luminescens*,

Discusión

lo que sugiere que el factor que mantiene reprimida la expresión de estos promotores en *Anabaena* no existe en *E. coli*.

Otros resultados muestran que la regulación de P_2 y P_1 imita a la de los promotores situados aguas arriba siempre que no se obstaculice la progresión de la RNAP a través del operón. Por ello, parece razonable pensar que la inducción de P_2 y P_1 observada en respuesta a deficiencia de cationes divalentes o a cambios en la fuente de nitrógeno pudiera ocurrir mediante el desalojo de un represor desconocido por el avance de los complejos de elongación provenientes de los promotores situados aguas arriba. En la literatura se describen casos en los que la colisión entre moléculas de RNAP y proteínas unidas al DNA tiene distintas consecuencias. En algunos casos, la colisión de la RNAP con una proteína unida delante bloquea el avance de la transcripción, lo que se conoce como “*roadblock*” (Deuschle et al, 1986), (Belitsky & Sonenshein, 2011), (Choi & Saier, 2005). En otros casos, el complejo de transcripción puede superar el obstáculo desalojando la proteína unida al DNA y continuar la transcripción de las secuencias situadas aguas abajo (Epshtein et al, 2003), (Horowitz & Platt, 1982), (Lopez et al, 1998); (Perez-Roger et al, 1995). Se ha descrito que las moléculas de RNAP que avanzan en tándem cooperan con la molécula líder (la que avanza en primera posición) en la superación del obstáculo proporcionándole una energía cinética suplementaria que ayuda a desplazar físicamente la proteína unida al DNA liberando el paso a la transcripción (Epshtein et al, 2003), (Epshtein & Nudler, 2003). Recientemente se ha demostrado que los ribosomas que traducen la molécula de RNA naciente interactúan con la RNAP que la produce a través del factor de transcripción NusG y la proteína ribosómica NusE (Burmam et al, 2010) y que contribuyen asimismo a la superación de obstáculos en el DNA aportando una energía de empuje complementaria a la RNAP (Proshkin et al, 2010). En el caso de los promotores P_2 y P_1 , ambos fenómenos podrían contribuir a la dislocación del represor ya que por un lado es esperable la llegada a estos promotores de múltiples complejos de elongación en tándem procedentes de los promotores aguas arriba y por otro lado, el avance de los ribosomas puede asimismo contribuir ya que las secuencias de P_2 y P_1 solapan (aunque parcialmente en el caso de P_1) con las ORFs de *all4723* y *all4722*, respectivamente. La dislocación del hipotético represor de P_2 y P_1 liberaría estos promotores permitiendo el reclutamiento de moléculas de RNAP a estos promotores y la transcripción a partir de ellos. Este modelo es consistente con los resultados que se presentan en este trabajo y explicaría cómo P_2 y

Discusión

P_1 imitan la regulación de los promotores situados aguas arriba. A pesar de la consistencia del modelo, no es fácil de entender intuitivamente la necesidad de varios promotores en tándem con una misma regulación en un operón. Una posibilidad es que se necesiten varios promotores con una misma regulación para contrarrestar la polaridad natural del operón y asegurar que cada producto génico se sintetiza de acuerdo a las necesidades de la célula. Otra posibilidad es que esta forma de control se haya seleccionado por aportar una regulación más versátil a los genes del operón. Por ejemplo, es posible que el represor hipotético que regula P_2 y P_1 sea sensible a algún estímulo que determinaría su disociación del DNA y permitiría una regulación diferencial de los genes *all4722* y *all4721* respecto a los otros genes del operón. Este modelo de regulación se ilustra en la figura 4.11A. Según el modelo, en condiciones de suficiencia de zinc, los cuatro promotores estarían apagados, P_5 y P_3 reprimidos por Zur y P_2 y P_1 por un represor desconocido (represor A en Fig. 4.11A). En condiciones de deficiencia de zinc, se inducirían los 4 promotores: P_5 y P_3 directamente gracias a la disociación de Zur y P_2 y P_1 por el desalojo del represor A causado por el avance de la RNAP. Si como se ha mencionado, el represor A es sensible a un determinado estímulo (estímulo A en la figura 4.11A.), la percepción de éste permitiría la inducción de estos promotores incluso en condiciones de suficiencia de zinc en las que P_5 y P_3 estarían reprimidos por Zur.

Hasta el momento se ha mencionado un único represor que controla P_2 y P_1 pero no existen razones para suponer que ambos promotores estén controlados por el mismo represor. De ser así, existe la posibilidad de que *all4721* pueda ser inducido autónomamente si el represor de P_1 (represor B en Fig. 4.11B) responde a un estímulo distinto (estímulo B en Fig. 4.11B).

El modelo de regulación que se presenta en la figura es un modelo novedoso de regulación de promotores en los operones bacterianos. Este modo de regulación se asemeja a un efecto dominó, según el cual la inducción de un promotor determinaría la inducción de los promotores situados aguas abajo en el operón. De acuerdo con este modelo, los genes en los operones bacterianos podrían estar sometidos a una regulación jerárquica dependiente de su posición y de la localización y características de los promotores internos, de modo que los genes en la región 5' serían inducidos junto con el resto de genes, mientras que los de la región 3' podrían tener una regulación

Discusión

específica. Por lo tanto, cuanto más hacia el extremo 3' se encuentra un promotor, mayor es el abanico de estímulos al que puede responder su transcripción.

Una vez descrito este modelo, podemos interpretar el efecto de la inserción de *Pnir* sobre el promotor P_1 en la estirpe MN52. En experimentos de extensión del cebador se observa que P_1 tiene un nivel de expresión similar en amonio y nitrato, que no concuerda con la regulación diferencial de *Pnir*. Una interpretación compatible con el modelo presentado es que el nivel de expresión de *Pnir* en amonio (que es muy superior al nivel basal de cualquiera de los promotores del operón) sea suficiente para desalojar el represor de P_1 , con lo que un mayor nivel de expresión desde *Pnir* (en nitrato) no provoca una mayor inducción de P_1 .

Discusión

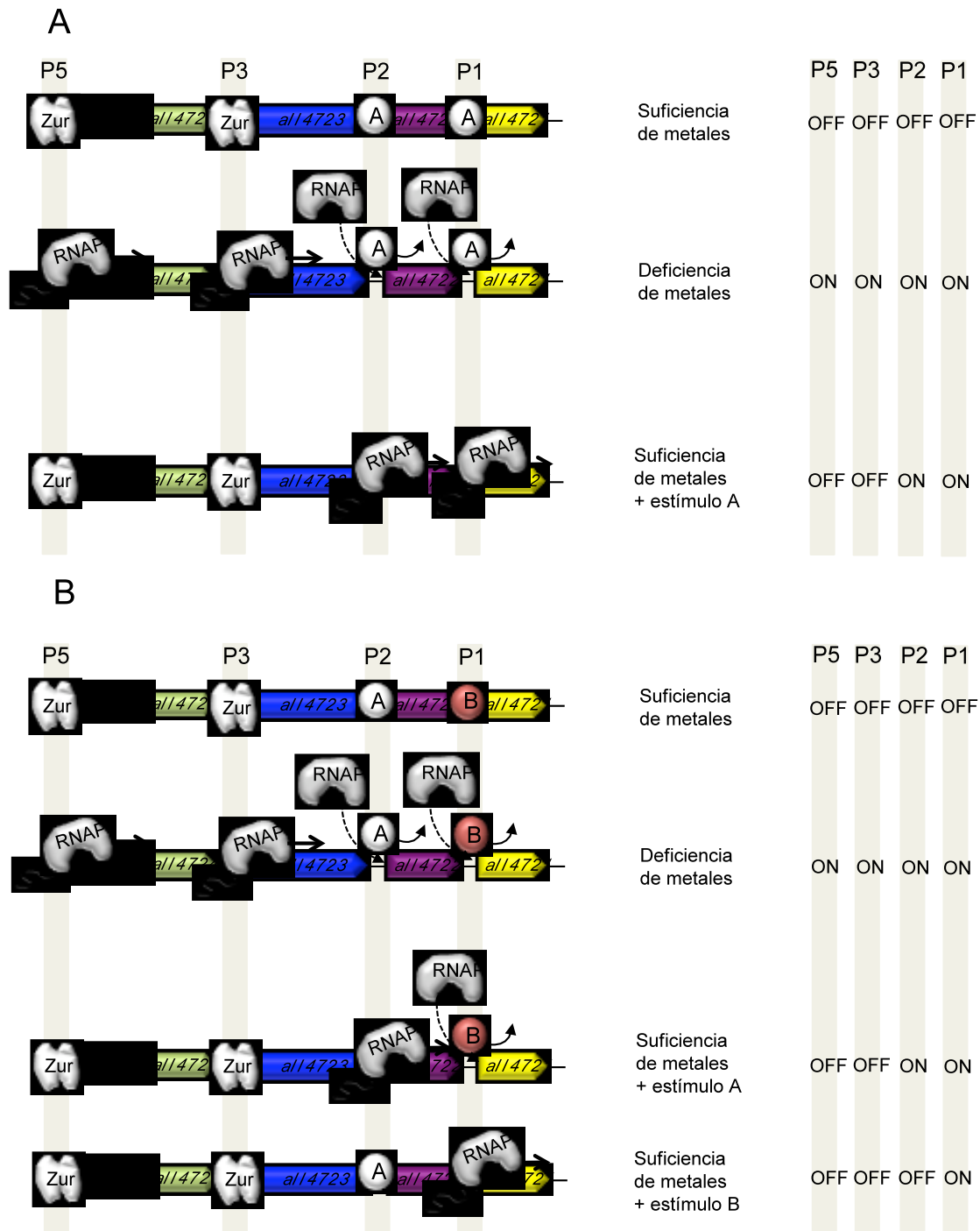


Figura 4.11. Modelo de regulación de los promotores en el operón *all4725-all4721*. Los genes del operon se representan en diferentes colores. La posición de los promotores de P₅ a P₁ es evidenciada por un fondo gris. El estado de activación o de reposo de los promotores (On/Off) es indicado en la parte derecha de la figura mientras que en la parte central se indican 4 diferentes condiciones. (A) Los promotores están regulados por Zur y un hipotético represor A. (B) Los promotores están regulados por Zur, y dos hipotéticos represores A y B.

4.5 Funcionamiento del sistema ThrRS1/ThrRS2

4.5.1 Estructura cuaternaria de las ThrRSs

Resultados que se presentan en esta tesis muestran que las proteínas recombinantes ThrRS1 y ThrRS2 pueden formar homodímeros y heterodímeros cuando se sobreexpresan en *E. coli*. La formación de dímeros o tetrámeros es una característica de las aminoacil-tRNA sintetasas de clase II (Ibba & Soll, 2000). Las treonil-tRNA sintetasas caracterizadas hasta el momento en distintos organismos se han descrito como proteínas diméricas (Sankaranarayanan et al, 1999), (Torres-Larios et al, 2003), (Shimizu et al, 2009), (Ling et al, 2012). La existencia de heterodímeros ThrRS1-ThrRS2 se ha confirmado en células de *Anabaena* cultivadas en presencia de TPEN. Por el momento no existen en la literatura evidencias sobre la existencia de ThrRS heterodiméricas, por lo que los heterodímeros de *Anabaena* serían la primera ThrRS caracterizada constituida por subunidades distintas.

Probablemente, en condiciones de cultivo estándar la mayoría de los dímeros de ThrRS deben estar constituidos por ThrRS1 ya que en estas condiciones es *thrS1* el gen que se expresa a mayor nivel, mientras que nivel de expresión de *thrS2* es muy bajo. En estas condiciones, los transcritos de *thrS2* sólo se detectan con una técnica tan sensible como la PCR en tiempo real (qRT-PCR) (resultados no publicados del grupo). Durante el periodo de adaptación a las condiciones de deficiencia de zinc el nivel de expresión de *thrS1* sufre un leve descenso manteniéndose a un 50% a las 24h del tratamiento de los cultivos con TPEN. La expresión de *thrS2* se induce notablemente en estas condiciones hasta alcanzar niveles que superan en 4-10 veces a los observados para *thrS1*. En el periodo de adaptación a la deficiencia de zinc, *Anabaena* atraviesa fases en las que los dos genes *thrS* se expresan a niveles comparables. Es probable que sea en estas fases en las que la formación de heterodímeros se vea más favorecida, aunque probablemente los homodímeros de cada proteína sean las formas dominantes en las condiciones extremas de suficiencia o deficiencia de zinc. La proporción de heterodímeros y homodímeros en cada momento estará dictada por el nivel de expresión de cada uno de los genes y por la afinidad relativa de los monómeros. La composición de los dímeros podría afectar a la función de ambas subunidades puesto que en las ThrRSs, a diferencia de otras aaRSs dimericas, ambas subunidades interaccionan con cada tRNA^{Thr}. En *E.coli*, el 16,5% de la superficie del tRNA interacciona con un monómero, mientras que el 3,6% establece

Discusión

contactos con el otro (Sankaranarayanan et al, 1999). Por esta razón los heterodímeros podrían tener propiedades catalíticas, como la afinidad por los tRNAs^{Thr}, ligeramente diferentes de las de los homodímeros. La función de los heterodímeros no se ha investigado en esta tesis pero podría ser importante en el proceso de adaptación a condiciones de deficiencia de zinc .

4.5.2 El papel de ThrRS1 y ThrRS2 en la adaptación de *Anabaena* a las condiciones ambientales de disponibilidad de zinc

En esta tesis se ha llevado a cabo una caracterización funcional de genes *thrS* duplicados en *Anabaena* con el objeto de arrojar alguna luz sobre las razones que justifican su conservación a lo largo de la evolución. Se ha comprobado que el gen *thrS1* es esencial y funciona como el gen de mantenimiento mientras que *thrS2* es un gen alternativo que sólo se expresa en condiciones de deficiencia de zinc. Todas las ThrRS cristalizadas hasta el momento contienen un átomo de zinc en el sitio activo, que juega un papel esencial en la catálisis y está coordinado por residuos estrictamente conservados diméricas (Sankaranarayanan et al, 1999), (Torres-Larios et al, 2003), (Shimizu et al, 2009), (Ling et al, 2012). Dado su perfil de expresión, es razonable pensar que ThrRS2 podría funcionar utilizando como cofactor un metal alternativo al zinc. La utilización de enzimas homólogas que utilizan cofactores alternativos es una de las estrategias que los microorganismos adoptan para enfrentarse a condiciones de limitación de metales (Merchant & Helmann, 2012), (Blaby-Haas et al, 2011), (Jaffe, 2003), (Sankaran et al, 2009), (Duran et al, 2004). Resultados preliminares de otros miembros de nuestro grupo sugieren que ThrRS2 podría utilizar metales alternativos pero se necesitan experimentos adicionales para su confirmación.

Los residuos de coordinación del zinc descritos para las ThrRS de otros organismos están conservados en ThrRS1 y ThrRS2 de *Anabaena* (Fig. 4.12). Resultados de nuestro laboratorio obtenidos en colaboración con el grupo del Dr. Nigel Robinson (Universidad de Durham, Reino Unido), apuntan a que ambas enzimas son activas cuando contienen zinc en cantidades equimolares (un átomo de zinc por monómero). Esto indica que tanto ThrRS1 como ThrRS2 pueden funcionar utilizando zinc como cofactor, lo que resulta paradójico ya que *thrS2* sólo se transcribe en condiciones de

Discusión

ciertas peculiaridades. Por ejemplo los nucleótidos 3, 15, 19 y 69 son distintos a los que se encuentran conservados en la mayoría de los tRNAs^{Thr} de *Anabaena* u otras cianobacterias. La expresión de ambos genes se induce en condiciones de deficiencia de metales inducida por TPEN. En estas mismas condiciones, la expresión de los otros tres tRNAs^{Thr} sufre un ligero descenso. A pesar de que el tRNA^{Thr}_{UGU2} es un tRNA atípico, se ha demostrado que se aminoacila en *Anabaena in vivo* (Puerto-Galan & Vioque, 2012). La correlación en la expresión de ThrRS2 y este tRNA sugiere que éste podría ser un sustrato preferencial para dicha enzima. Actualmente se están llevando a cabo acercamientos experimentales en nuestro laboratorio para probar esta posibilidad.

7120	CGU	GC	GAUGUGGCUCAG	-UGG	A	GAGCAGCUGAUUCGUA	AUCAGCAGGCCGUGGGUUC	AAA	CCCAUCAUC	AGCU	---	72	
7120	GGU	GC	CGUGUGGCUCAG	-UGG	A	GAGCAGCAGCCUUGGUA	AAGGGUGAGGUCACGAGUUC	AAU	UCCUGUCACG	AGCU	---	72	
7120	UGU	GC	AGCAUAGCACA	-UGG	A	GUGCAUCCGACUUGUA	UAAUCGGAAGGUCGUCGGUU	CAA	UCCGACUCG	AGCU	---	72	
7120	UGU2	GC	UGUGUGGCUCAG	-CGG	A	GAGCAAUCGCCUUGUA	AAGCGAUCGGUUGCGGGUUC	AAU	UCCUGUCACG	AGCU	---	72	
SyRS9916	CGU	GC	GAUGUAGCUCAG	-UGG	A	GAGCAACGCUUUCGUA	AAGCGUGGGUCGCCU	GUU	CAAGUCAGGUC	AUC	AGCU	---	73
SyWH7803	UGU	GC	GGCUUAGCUCAG	-UGG	A	GAGCAGCGCUUUGUA	AAGCGAAGGCCGUCGGUUC	AAA	UCCGUCAGCC	AGCU	---	72	
SYWH8102	GGU	GC	CUUUGUAGCUCAG	-CGG	A	GAGCAGCUCUUGGUA	AAGGGAGAGGUCUCGAGUUC	AAU	UCCGUCAGCC	AGCU	---	72	
Gleob7421	UGU	GC	UGGUGUGGCUCAG	-CGG	A	GAGCAACAGUUUUGUA	AACUGUCGGUUAAGGGUU	CAA	UCCGUCAGCC	AGCU	---	72	
Syn7942	GGU	GC	CUUUGUAGCUCAG	-CGG	A	GAGCAGCUCUUGGUA	AAGGGAGAGGUCACGAGUUC	AAU	UCCGUCAGCC	AGCU	---	72	
Avar29413	UGU	GC	AGCAUAGCACA	-UGG	A	GUGCAUCCGACUUGUA	UAAUCGGAAGGUCGUCGGUUC	AAU	UCCGACUCG	AGCU	---	72	
Syn7335	GGU	GC	CAUGUGGCUCAG	-UGG	A	GAGCAGCAGCCUUGGUA	AAGGGUGAGGUCACGAGUUC	AAU	UCCGUCAGCC	AGCU	---	72	
Syn. 6803	GGU	GC	GAAGUAGCUCAG	-UGG	A	GAGUAGCUGAUUCGUA	AUCAGUUGGCCGUGGGUUC	AAU	UCCGUCAGCC	AGCU	---	72	
Croc.wats	UGU	GC	UCCUAGCUCAG	-UUG	A	GAGCAACUCACUUGUA	AUGAGUAGGUCGUCGGUUC	AAU	UCCGACAGG	AGCU	---	73	
Croc.wats	CGU	GC	ACGUUAGCUCAG	-UUG	A	GAGCAACUCACUUGUA	AUGAUAAGCCGCGAGUUC	AAU	UCCGACAGG	AGCU	---	73	
Croc.wats	GGU	GC	CGUGUGGCUCAG	-UGG	A	GAGCAGCAGCCUUGGUA	AAGGGUGAGGUCACGAGUUC	AAU	UCCGUCACG	AGCU	---	72	
Pr. 9313	CGU	GC	CGUAGCUCUCAG	-GGG	A	GAGCAACUGAUUCGUA	AUCAGUAGGUCGAGGUUC	AAU	UCCGUCACG	AGCU	---	72	
Pr. 9313	GGU	GC	CUUUGUAGCUCAG	-UGG	A	GAGCAGCUCUUGGUA	AAGGGAGAGGUCUCCGGUU	CAA	UCCGGCAGG	AGCU	---	72	
Pr. 9313	UGU	GC	GGCUUAGCUCAG	-UGG	A	GAGCAGCGCUUUGUA	AAGCGAAGGCCAUCGGUUC	AAU	UCCGUUAGCC	AGCU	---	72	
Pr. 9301	CGU	GC	CGUAGCUCUCAG	-AGG	A	GAGCAACUGUCUCGUA	AACAGUAGGUCUUGGUUC	AAU	UCCAAUUAUC	AGCU	---	72	
Pr. 9215	GGU	GC	CUUUGUAGCUCAG	-CGG	A	GAGCAGCUCUUGGUA	AAGGGAGAGGUCUCGGUU	CAA	UCCGACGAG	AGCU	---	72	
Pr. 9211	GGU	GC	CUUUGUAGCUCAG	-CGG	A	GAGCAGCUCUUGGUA	AAGGGAGAGGUCUCGGUU	CAA	UCCGACGAG	AGCU	---	72	
Pr. NATL2	CGU	GC	GGUAGCUCUCAG	-GGG	A	GAGCAACUGAUUCGUA	AACCAGUAGGUCGGUUC	AAU	UCCACUCAG	AGCU	---	72	
Pr. 9515	UGU	GC	GGCUUAGCUCAG	-CGG	A	GAGCAGCGCUUUGUA	AAGCGAAGGUCUACAGUUC	AAU	UCCGUUAGCC	AGCU	---	72	
Pr. NATL1	GGU	GC	CUUUGUAGCUCAG	-CGG	A	GAGCAGCUCUUGGUA	AAGGGAGAGGUCUCGGUU	CAA	UCCGACGAG	AGCU	---	72	
Pr. 9303	CGU	GC	GGUAGCUCUCAG	-GGG	A	GAGCAACUGAUUCGUA	AUCAGUAGGUCGAGGUUC	AAU	UCCGUCACG	AGCU	---	72	
Pr. 9202	GGU	GC	CUUUGUAGCUCAG	-CGG	A	GAGCAGCUCUUGGUA	AAGGGAGAGGUCUCGGUU	CAA	UCCGACGAGG	AGCU	---	72	

** * . * * * * * * * * * * * * * * . * * * * * * * . * * * * * * * . * * *

Figura 4.13 Características distintivas del tRNA^{Thr}_{UGU2} de *Anabaena* 7120. En rojo se evidencian los nucleótidos en posición 3, 15, 19 y 69 que están conservados en las cianobacterias. En amarillo se evidencian los nucleótidos en posición 15 y 69 que se encuentran en el tRNA_{UGU2} de *Anabaena* 7120, y en los tRNAs_{UGU} de *Gleobacter violaceus* y *Crocospheera watsonii*. En verde se evidencian los nucleótidos que se encuentran en el tRNA_{UGU2} de *Anabaena* 7120, y en el tRNA_{UGU} de *Gleobacter viloeaceus*. En violeta se evidencia el nucleótido que se encuentra únicamente en el tRNA_{UGU2} de *Anabaena* 7120.

Es también posible que ThrRS2 sea una enzima menos precisa, esto es, que su tasa de error sea mayor que la de ThrRS1, lo que justificaría la conservación de ThrRS1 como enzima *housekeeping*. En este sentido, es destacable que la secuencia extra de ThrRS2 que hemos denominado indel 1 se encuentra en las proximidades del sitio de edición post-transfer del dominio N2. Aunque los residuos importantes para la edición están conservados en ThrRS2, la secuencia extra podría distorsionar el bolsillo del sitio de edición y disminuir su eficacia. Es interesante destacar que en aquellas cianobacterias que sólo cuentan con ThrRS2, la secuencia extra (indel 1) no existe o es corta (8 aas)

Discusión

mientras que en las especies que contienen la duplicación, alcanza una longitud mucho mayor (15-32 aas). El sistema en *Anabaena* estaría constituido por tanto por una enzima housekeeping (ThrRS1) de alta precisión pero baja estabilidad en bajo zinc, y una enzima alternativa (ThrRS2) de alta estabilidad en bajo zinc pero con una mayor tasa de error. En este sentido, cabe destacar que en algunos organismos como *Acinetobacter baylyi* o *E. coli*, un incremento moderado de la tasa de error parece ser beneficioso para sobrevivir en algunas condiciones de estrés (Bacher et al, 2007), (Min et al, 2003), (Ruan et al, 2008). En figura 4.14 se muestra un modelo de funcionamiento del sistema ThrRS1/ThrRS2.

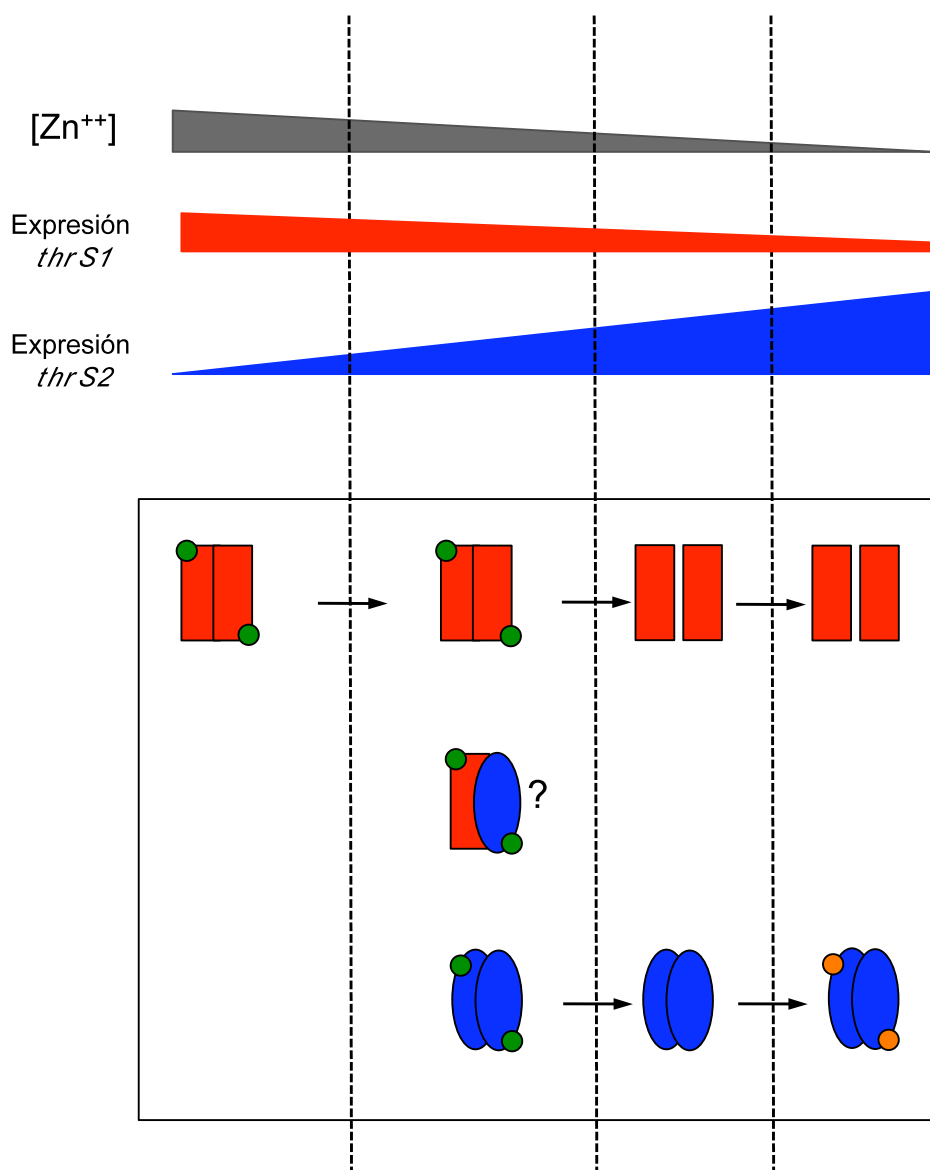


Figura 4.14 Modelo de funcionamiento del sistema ThrRS1/ThrRS2. ThrRS1 se representa con rectángulos rojos, ThrRS2 con elipsoides azules. El heterodímero se representa combinando un rectángulo rojo con un elipsoide azul. Los átomos de zinc se representan con círculos verdes, los átomos de metales alternativos con círculos naranja.

Conclusiones

5. Conclusiones

Conclusiones

En esta tesis se se presenta una caracterización funcional de genes duplicados que cifran treonil-tRNA sintetasa en el organismo modelo *Anabaena* sp. PCC 7120. El genoma de *Anabaena* 7120 contiene los genes *thrS1* y *thrS2*, denominados respectivamente *thrS1* y *thrS2*. Los acercamientos experimentales llevados a cabo durante la realización de este trabajo nos permiten presentar las siguientes conclusiones:

1. Ambos genes, *thrS1* y *thrS2*, son funcionales.
2. Sus productos proteicos presentan diferentes especificidades para los tRNAs^{Thr}.
3. *thrS1* es el gen de mantenimiento (*housekeeping*) mientras que *thrS2* es prescindible en condiciones de cultivo estándar en el laboratorio.
4. Los dos genes presentan perfiles de expresión diferenciales, siendo la expresión de *thrS1* alta en condiciones de cultivo estándar y con pocas variaciones en otras condiciones ensayadas, mientras que *thrS2* muestra un bajo nivel de expresión en condiciones estándar y se induce en deficiencia de cationes divalentes.
5. El gen *thrS2* se encuentra en un agrupamiento génico constituido por las ORFs que van de *all4729* a *all4721*.
6. En este agrupamiento génico se han identificado dos unidades transcripcionales. Una constituida por los genes *all4727* y *all476*, la otra formada por *all4725*-*all4721*
7. *thrS2* forma parte del segundo operón en el cual se han mapeado cuatro promotores: un promotor en 5' y tres promotores internos.
8. Se ha identificado uno de los reguladores de la transcripción del operón, que reprime la expresión de los promotores P₅ y P₁. Este regulador es Zur que se ha identificado como tal en este trabajo por primera vez en cianobacterias.
9. Se ha demostrado que la unión de Zur al DNA es dependiente de zinc y se ha definido y caracterizado empíricamente su secuencia de unión en el DNA.
10. Se presenta un modelo novedoso que podría explicar la regulación de dos promotores internos del operón *all4725*-*all4721*, que representa un modelo de regulación jerárquico que implica a varios represores y en el que la especificidad de la expresión de cada gen vendría dictada por la posición de éste en el operón.
11. Se ha analizado la expresión de los genes que cifran los 4 tRNAs^{Thr} de *Anabaena* y se ha encontrado una correlación en la expresión de uno de ellos con *thrS2*.

Conclusiones

12. Los productos de los genes *thrS1* y *thrS2* son dímeros, y pueden formar heterodímeros no sólo en condiciones de análisis experimental en *E. coli* sino también en *Anabaena*.

Bibliografía

6. Bibliografía

Bibliografía

- Ahel I, Korencic D, Ibba M, Soll D (2003) Trans-editing of mischarged tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 15422-15427
- Akanuma G, Nanamiya H, Natori Y, Nomura N, Kawamura F (2006) Liberation of zinc-containing L31 (RpmE) from ribosomes by its paralogous gene product, YtiA, in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 2715-2720
- Allen JF, Martin W (2007) Evolutionary biology: out of thin air. *Nature* **445**: 610-612
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410
- An S, Musier-Forsyth K (2004) Trans-editing of Cys-tRNA^{Pro} by *Haemophilus influenzae* YbaK protein. *J Biol Chem* **279**: 42359-42362
- Anderson SL, McIntosh L (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J Bacteriol* **173**: 2761-2767
- Andreini C, Bertini I, Rosato A (2009) Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Acc Chem Res* **42**: 1471-1479
- Arif A, Jia J, Mukhopadhyay R, Willard B, Kinter M, Fox PL (2009) Two-site phosphorylation of EPRS coordinates multimodal regulation of noncanonical translational control activity. *Mol Cell* **35**: 164-180
- Arnez JG, Moras D (1997) Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem Sci* **22**: 211-216
- Assuncao AG, Schat H, Aarts MG (2010) Regulation of the adaptation to zinc deficiency in plants. *Plant Signal Behav* **5**: 1553-1555
- Auerbach G, Herrmann A, Bracher A, Bader G, Gutlich M, Fischer M, Neukamm M, Garrido-Franco M, Richardson J, Nar H, Huber R, Bacher A (2000) Zinc plays a key role in human and bacterial GTP cyclohydrolase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13567-13572
- Auld DS (2001) Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* **14**: 271-313
- Bacher JM, Waas WF, Metzgar D, de Crecy-Lagard V, Schimmel P (2007) Genetic code ambiguity confers a selective advantage on *Acinetobacter baylyi*. *J Bacteriol* **189**: 6494-6496
- Baichoo N, Helmann JD (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**: 5826-5832
- Banerjee R, Dubois DY, Gauthier J, Lin SX, Roy S, Lapointe J (2004) The zinc-binding site of a class I aminoacyl-tRNA synthetase is a SWIM domain that modulates amino acid binding via the tRNA acceptor arm. *Eur J Biochem* **271**: 724-733
- Barnett JP, Millard A, Ksibe AZ, Scanlan DJ, Schmid R, Blindauer CA (2012) Mining genomes of marine cyanobacteria for elements of zinc homeostasis. *Frontiers in microbiology* **3**: 142
- Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 168-207
- Beck C, Knoop H, Axmann IM, Steuer R (2012) The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. *BMC Genomics* **13**: 56
- Becker HD, Kern D (1998) *Thermus thermophilus*: a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12832-12837

Bibliografía

- Becker HD, Roy H, Moulinier L, Mazauric MH, Keith G, Kern D (2000) *Thermus thermophilus* contains an eubacterial and an archaeobacterial aspartyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **39**: 3216-3230
- Beebe K, Ribas De Pouplana L, Schimmel P (2003) Elucidation of tRNA-dependent editing by a class II tRNA synthetase and significance for cell viability. *EMBO J* **22**: 668-675
- Bekker A, Holland HD, Wang PL, Rumble D, 3rd, Stein HJ, Hannah JL, Coetzee LL, Beukes NJ (2004) Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature* **427**: 117-120
- Belin P, Moutiez M, Lautru S, Seguin J, Pernodet JL, Gondry M (2012) The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Natural product reports* **29**: 961-979
- Belitsky BR, Sonenshein AL (2011) Roadblock repression of transcription by *Bacillus subtilis* CodY. *J Mol Biol* **411**: 729-743
- Bensing BA, Meyer BJ, Dunny GM (1996) Sensitive detection of bacterial transcription initiation sites and differentiation from RNA processing sites in the pheromone-induced plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7794-7799
- Berg P, Offengand EJ (1958) An Enzymatic Mechanism for Linking Amino Acids to RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**: 78-86
- Bergman B, Sandh G, Lin S, Larsson J, Carpenter EJ (2012) *Trichodesmium* - a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. *FEMS Microbiol Rev*
- Bergthorsson U, Andersson DI, Roth JR (2007) Ohno's dilemma: evolution of new genes under continuous selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 17004-17009
- Bhaskar PT, Hay N (2007) The two TORCs and Akt. *Developmental cell* **12**: 487-502
- Bilokapic S, Maier T, Ahel D, Gruic-Sovulj I, Soll D, Weygand-Durasevic I, Ban N (2006) Structure of the unusual seryl-tRNA synthetase reveals a distinct zinc-dependent mode of substrate recognition. *EMBO J* **25**: 2498-2509
- Blaby-Haas CE, Furman R, Rodionov DA, Artsimovitch I, de Crecy-Lagard V (2011) Role of a Zn-independent DksA in Zn homeostasis and stringent response. *Mol Microbiol* **79**: 700-715
- Black TA, Cai Y, Wolk CP (1993) Spatial expression and autoregulation of *hetR*, a gene involved in the control of heterocyst development in *Anabaena*. *Mol Microbiol* **9**: 77-84
- Blank CE, Sanchez-Baracaldo P (2010) Geobiology. **8**: 1-23
- Blindauer CA (2008) Zinc-handling in cyanobacteria: an update. *Chem Biodivers* **5**: 1990-2013
- Blindauer CA, Harrison MD, Robinson AK, Parkinson JA, Bowness PW, Sadler PJ, Robinson NJ (2002) Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. *Mol Microbiol* **45**: 1421-1432
- Blindauer CA, Razi MT, Parsons S, Sadler PJ (2006) Metal complexes of N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN): Variable coordination numbers and geometries. *Polyhedron* **25**: 513-520
- Boekema EJ, Hifney A, Yakushevskaya AE, Piotrowski M, Keegstra W, Berry S, Michel KP, Pistorius EK, Kruijff J (2001) A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature* **412**: 745-748
- Bonfils G, Jaquenoud M, Bontron S, Ostrowicz C, Ungermann C, De Virgilio C (2012) Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Mol Cell* **46**: 105-110

Bibliografía

- Boniecki MT, Vu MT, Betha AK, Martinis SA (2008) CP1-dependent partitioning of pretransfer and posttransfer editing in leucyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 19223-19228
- Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**: 459-472
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Braz VS, da Silva Neto JF, Italiani VC, Marques MV (2010) CztR, a LysR-type transcriptional regulator involved in zinc homeostasis and oxidative stress defense in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **192**: 5480-5488
- Brevet A, Chen J, Leveque F, Blanquet S, Plateau P (1995) Comparison of the enzymatic properties of the two *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase species. *J Biol Chem* **270**: 14439-14444
- Brock S, Szkaradkiewicz K, Sprinzl M (1998) Initiation factors of protein biosynthesis in bacteria and their structural relationship to elongation and termination factors. *Mol Microbiol* **29**: 409-417
- Brown JR, Doolittle WF (1999) Gene descent, duplication, and horizontal transfer in the evolution of glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *J Mol Evol* **49**: 485-495
- Brown JR, Robb FT, Weiss R, Doolittle WF (1997) Evidence for the early divergence of tryptophanyl- and tyrosyl-tRNA synthetases. *J Mol Evol* **45**: 9-16
- Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 145-163
- Brunel C, Caillet J, Lesage P, Graffe M, Dondon J, Moine H, Romby P, Ehresmann C, Ehresmann B, Grunberg-Manago M, et al. (1992) Domains of the *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase translational operator and their relation to threonine tRNA isoacceptors. *J Mol Biol* **227**: 621-634
- Buddha MR, Keery KM, Crane BR (2004) An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15881-15886
- Buikema WJ, Haselkorn R (2001) Expression of the *Anabaena* hetR gene from a copper-regulated promoter leads to heterocyst differentiation under repressing conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2729-2734
- Bullock WO, Fernandez J, Short JM (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with B-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**: 376-378
- Burmann BM, Schweimer K, Luo X, Wahl MC, Stitt BL, Gottesman ME, Rosch P (2010) A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science* **328**: 501-504
- Cahuzac B, Berthonneau E, Birlirakis N, Guittet E, Mirande M (2000) A recurrent RNA-binding domain is appended to eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases. *EMBO J* **19**: 445-452
- Cai YP, Wolk CP (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J Bacteriol* **172**: 3138-3145
- Caillet J, Graffe M, Eyermann F, Romby P, Springer M (2007) Mutations in residues involved in zinc binding in the catalytic site of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase confer a dominant lethal phenotype. *J Bacteriol* **189**: 6839-6848
- Caillet J, Nogueira T, Masquida B, Winter F, Graffe M, Dock-Bregeon AC, Torres-Larios A, Sankaranarayanan R, Westhof E, Ehresmann B, Ehresmann C, Romby P, Springer M (2003) The modular structure of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase as both an enzyme and a regulator of gene expression. *Mol Microbiol* **47**: 961-974

Bibliografía

- Capone DG, Zehr J, Paerl HW, Bergman B, Carpenter EJ (1997) Trichodesmium, a globally significant marine cyanobacterium. *Science* **276**: 1221-1229
- Carpenter C, Capone DG (2008) Nitrogen fixation in the marine environment. In *Nitrogen in the Marine Environment* London AP (ed), pp 141-198.
- Castresana J (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol* **17**: 540-552
- Cavet JS, Meng W, Pennella MA, Appelhoff RJ, Giedroc DP, Robinson NJ (2002) A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity. *J Biol Chem* **277**: 38441-38448
- Chen SJ, Wu YH, Huang HY, Wang CC (2012) *Saccharomyces cerevisiae* possesses a stress-inducible glycyl-tRNA synthetase gene. *PLoS One* **7**: e33363
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**: 3497-3500
- Cherniack AD, Garriga G, Kittle JD, Jr., Akins RA, Lambowitz AM (1990) Function of *Neurospora* mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing requires an idiosyncratic domain not found in other synthetases. *Cell* **62**: 745-755
- Chimienti F, Seve M, Richard S, Mathieu J, Favier A (2001) Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochem Pharmacol* **62**: 51-62
- Choi SK, Saier MH, Jr. (2005) Regulation of sigL expression by the catabolite control protein CcpA involves a roadblock mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon and nitrogen metabolism. *J Bacteriol* **187**: 6856-6861
- Clark RL, Neidhardt FC (1990) Roles of the two lysyl-tRNA synthetases of *Escherichia coli*: analysis of nucleotide sequences and mutant behavior. *J Bacteriol* **172**: 3237-3243
- Cobine P, Wickramasinghe WA, Harrison MD, Weber T, Solioz M, Dameron CT (1999) The *Enterococcus hirae* copper chaperone CopZ delivers copper(I) to the CopY repressor. *FEBS Lett* **445**: 27-30
- Coleman JE (1998) Zinc enzymes. *Current opinion in chemical biology* **2**: 222-234
- Conant GC, Wolfe KH (2008) Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions. *Nat Rev Genet* **9**: 938-950
- Crick F. (1956) On degenerate template and the adaptor hypothesis: a note for the RNA tie club.
- Crick FH (1968) The origin of the genetic code. *J Mol Biol* **38**: 367-379
- Crouzet J, Levy-Schil S, Cameron B, Cauchois L, Rigault S, Rouyez MC, Blanche F, Debussche L, Thibaut D (1991) Nucleotide sequence and genetic analysis of a 13.1-kilobase-pair *Pseudomonas denitrificans* DNA fragment containing five cob genes and identification of structural genes encoding Cob(I)alamin adenosyltransferase, cobyrinic acid synthase, and bifunctional cobinamide kinase-cobinamide phosphate guanylyltransferase. *J Bacteriol* **173**: 6074-6087
- Cura V, Moras D, Kern D (2000) Sequence analysis and modular organization of threonyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* and its interrelation with threonyl-tRNA synthetases of other origins. *Eur J Biochem* **267**: 379-393
- Curnow AW, Hong KW, Yuan R, Soll D (1997) tRNA-dependent amino acid transformations. *Nucleic Acids Symp Ser*: 2-4

Bibliografía

- Curnow AW, Ibba M, Soll D (1996) tRNA-dependent asparagine formation. *Nature* **382**: 589-590
- Curnow AW, Tumbula DL, Pelaschier JT, Min B, Soll D (1998) Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 12838-12843
- Cusack S (1997) Aminoacyl-tRNA synthetases. *Curr Opin Struct Biol* **7**: 881-889
- Cusack S, Berthet-Colominas C, Hartlein M, Nassar N, Leberman R (1990) A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* **347**: 249-255
- Dagan T, Roettger M, Stucken K, Landan G, Koch R, Major P, Gould SB, Goremykin VV, Rippka R, Tandeau de Marsac N, Gugger M, Lockhart PJ, Allen JF, Brune I, Maus I, Puhler A, Martin WF (2013) Genomes of Stigonematalean cyanobacteria (subsection V) and the evolution of oxygenic photosynthesis from prokaryotes to plastids. *Genome biology and evolution* **5**: 31-44
- Dann CE, 3rd, Wakeman CA, Sieling CL, Baker SC, Irnov I, Winkler WC (2007) Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA. *Cell* **130**: 878-892
- De Nicola R, Hazelwood LA, De Hulster EA, Walsh MC, Knijnenburg TA, Reinders MJ, Walker GM, Pronk JT, Daran JM, Daran-Lapujade P (2007) Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to zinc limitation in chemostat cultures. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7680-7692
- Delarue M, Moras D (1993) The aminoacyl-tRNA synthetase family: modules at work. *Bioessays* **15**: 675-687
- Deuschle U, Gentz R, Bujard H (1986) lac Repressor blocks transcribing RNA polymerase and terminates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4134-4137
- Dismukes GC, Klimov VV, Baranov SV, Kozlov YN, DasGupta J, Tyryshkin A (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2170-2175
- Dock-Bregeon A, Sankaranarayanan R, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, Francklyn CS, Ehresmann C, Moras D (2000) Transfer RNA-mediated editing in threonyl-tRNA synthetase. The class II solution to the double discrimination problem. *Cell* **103**: 877-884
- Dock-Bregeon AC, Rees B, Torres-Larios A, Bey G, Caillet J, Moras D (2004) Achieving error-free translation; the mechanism of proofreading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution. *Mol Cell* **16**: 375-386
- Dohm JC, Vingron M, Staub E (2006) Horizontal gene transfer in aminoacyl-tRNA synthetases including leucine-specific subtypes. *J Mol Evol* **63**: 437-447
- Doolittle RF, Handy J (1998) Evolutionary anomalies among the aminoacyl-tRNA synthetases. *Current opinion in genetics & development* **8**: 630-636
- Dufresne A, Salanoubat M, Partensky F, Artiguenave F, Axmann IM, Barbe V, Duprat S, Galperin MY, Koonin EV, Le Gall F, Makarova KS, Ostrowski M, Oztas S, Robert C, Rogozin IB, Scanlan DJ, Tandeau de Marsac N, Weissenbach J, Wincker P, Wolf YI, Hess WR (2003) Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10020-10025
- Dulic M, Cvetesic N, Perona JJ, Gruic-Sovolj I (2010) Partitioning of tRNA-dependent editing between pre- and post-transfer pathways in class I aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **285**: 23799-23809

Bibliografía

- Duran RV, Hervas M, De La Rosa MA, Navarro JA (2004) The efficient functioning of photosynthesis and respiration in *Synechocystis* sp. PCC 6803 strictly requires the presence of either cytochrome c6 or plastocyanin. *J Biol Chem* **279**: 7229-7233
- Dwivedi S, Kruparani SP, Sankaranarayanan R (2005) A D-amino acid editing module coupled to the translational apparatus in archaea. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 556-557
- Eide DJ (2009) Homeostatic and adaptive responses to zinc deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**: 18565-18569
- El Yacoubi B, Bonnett S, Anderson JN, Swairjo MA, Iwata-Reuyl D, de Crecy-Lagard V (2006) Discovery of a new prokaryotic type I GTP cyclohydrolase family. *J Biol Chem* **281**: 37586-37593
- Elhai J (1993) Strong and regulated promoters in the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett* **114**: 179-184
- Elhai J, Veprikskiy A, Muro-Pastor AM, Flores E, Wolk CP (1997) Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **179**: 1998-2005
- Elhai J, Wolk CP (1988a) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol* **167**: 747-754
- Elhai J, Wolk CP (1988b) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**: 119-138
- Epshtein V, Nudler E (2003) Cooperation between RNA polymerase molecules in transcription elongation. *Science* **300**: 801-805
- Epshtein V, Toulme F, Rahmouni AR, Borukhov S, Nudler E (2003) Transcription through the roadblocks: the role of RNA polymerase cooperation. *EMBO J* **22**: 4719-4727
- Eriani G, Delarue M, Poch O, Gangloff J, Moras D (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* **347**: 203-206
- Fang M, Wu HY (1998) A promoter relay mechanism for sequential gene activation. *J Bacteriol* **180**: 626-633
- Ferino F, Chauvat F (1989) A promoter-probe vector-host system for the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Gene* **84**: 257-266
- Ferrer M, Golyshina OV, Beloqui A, Golyshin PN, Timmis KN (2007) The cellular machinery of *Ferroplasma acidiphilum* is iron-protein-dominated. *Nature* **445**: 91-94
- Flores E, Herrero A (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat Rev Microbiol* **8**: 39-50
- Fonvielle M, Chemama M, Villet R, Lecerf M, Bouhss A, Valery JM, Etheve-Quellejeu M, Arthur M (2009) Aminoacyl-tRNA recognition by the FemXWv transferase for bacterial cell wall synthesis. *Nucleic Acids Res* **37**: 1589-1601
- Forchhammer K, Boesmiller K, Bock A (1991) The function of selenocysteine synthase and SELB in the synthesis and incorporation of selenocysteine. *Biochimie* **73**: 1481-1486
- Fournier GP, Andam CP, Alm EJ, Gogarten JP (2011) Molecular evolution of aminoacyl tRNA synthetase proteins in the early history of life. *Origins of life and evolution of the biosphere : the journal of the International Society for the Study of the Origin of Life* **41**: 621-632
- Francklyn CS (2008) DNA polymerases and aminoacyl-tRNA synthetases: shared mechanisms for ensuring the fidelity of gene expression. *Biochemistry* **47**: 11695-11703

Bibliografía

- Francklyn CS, First EA, Perona JJ, Hou YM (2008) Methods for kinetic and thermodynamic analysis of aminoacyl-tRNA synthetases. *Methods* **44**: 100-118
- Frangoul L, Quillardet P, Castets AM, Humbert JF, Matthijs HC, Cortez D, Tolonen A, Zhang CC, Gribaldo S, Kehr JC, Zilliges Y, Ziemert N, Becker S, Talla E, Latifi A, Billault A, Lepelletier A, Dittmann E, Bouchier C, de Marsac NT (2008) Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. *BMC Genomics* **9**: 274
- Frias JE, Flores E, Herrero A (2000) Activation of the *Anabaena nir* operon promoter requires both NtcA (CAP family) and NtcB (LysR family) transcription factors. *Mol Microbiol* **38**: 613-625
- Furuno T, Hirashima N, Onizawa S, Sagiya N, Nakanishi M (2001) Nuclear shuttling of mitogen-activated protein (MAP) kinase (extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2) was dynamically controlled by MAP/ERK kinase after antigen stimulation in RBL-2H3 cells. *J Immunol* **166**: 4416-4421
- Fuwa K, Wacker WE, Druyan R, Bartholomay AF, Vallee BL (1960) Nucleic Acids and Metals, Ii: Transition Metals as Determinants of the Conformation of Ribonucleic Acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **46**: 1298-1307
- Gaballa A, Helmann JD (1998) Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 5815-5821
- Gaballa A, Wang T, Ye RW, Helmann JD (2002) Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *J Bacteriol* **184**: 6508-6514
- Gabriel SE, Helmann JD (2009) Contributions of Zur-controlled ribosomal proteins to growth under zinc starvation conditions. *J Bacteriol* **191**: 6116-6122
- Gabriel SE, Miyagi F, Gaballa A, Helmann JD (2008) Regulation of the *Bacillus subtilis* *yciC* gene and insights into the DNA-binding specificity of the zinc-sensing metalloregulator Zur. *J Bacteriol* **190**: 3482-3488
- Gentry DR, Ingraham KA, Stanhope MJ, Rittenhouse S, Jarvest RL, O'Hanlon PJ, Brown JR, Holmes DJ (2003) Variable sensitivity to bacterial methionyl-tRNA synthetase inhibitors reveals subpopulations of *Streptococcus pneumoniae* with two distinct methionyl-tRNA synthetase genes. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1784-1789
- Giedroc DP, Arunkumar AI (2007) Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. *Dalton Trans*: 3107-3120
- Giner-Lamia J, Lopez-Maury L, Reyes JC, Florencio FJ (2012) The CopRS two-component system is responsible for resistance to copper in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol* **159**: 1806-1818
- Goerick R, Welshmeyer NA (1993) The marine prochlorophyte *Prochlorococcus* contributes significantly to phytoplankton biomass and primary production in the Sargasso sea. *Deep Sea Research* **40**: 2283-2294
- Gonzalez A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF (2011) Unravelling the regulatory function of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 through 2-D DIGE proteomic analysis. *J Proteomics* **74**: 660-671
- Grattan BJ, Freake HC (2012) Zinc and cancer: implications for LIV-1 in breast cancer. *Nutrients* **4**: 648-675
- Griese M, Lange C, Soppa J (2011) Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **323**: 124-131
- Grochowski LL, Xu H, Leung K, White RH (2007) Characterization of an Fe(2+)-dependent archaeal-specific GTP cyclohydrolase, MptA, from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry* **46**: 6658-6667

Bibliografía

- Gruber TM, Gross CA (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* **59**: 307-321
- Guo M, Schimmel P, Yang XL (2010a) Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions. *FEBS Lett* **584**: 434-442
- Guo M, Yang XL, Schimmel P (2010b) New functions of aminoacyl-tRNA synthetases beyond translation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 668-674
- Gupta RS (2009) Protein signatures (molecular synapomorphies) that are distinctive characteristics of the major cyanobacterial clades. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2510-2526
- Haas CE, Rodionov DA, Kropat J, Malasarn D, Merchant SS, de Crecy-Lagard V (2009) A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life. *BMC Genomics* **10**: 470
- Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, Ha SH, Ryu SH, Kim S (2012) Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* **149**: 410-424
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580
- Hantke K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**: 172-177
- Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* **25**: 29-32
- Hasegawa T, Miyano M, Himeno H, Sano Y, Kimura K, Shimizu M (1992) Identity determinants of E. coli threonine tRNA. *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 478-484
- Haury JF, Spiller H (1981) Fructose uptake and influence on growth of and nitrogen fixation by Anabaena variabilis. *J Bacteriol* **147**: 227-235
- Hausmann CD, Ibba M (2008) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 705-721
- Hennecke H, Bock A, Thomale J, Nass G (1977) Threonyl-transfer ribonucleic acid synthetase from Escherichia coli: subunit structure and genetic analysis of the structural gene by means of a mutated enzyme and of a specialized transducing lambda bacteriophage. *J Bacteriol* **131**: 943-950
- Herbert CJ, Labouesse M, Dujardin G, Slonimski PP (1988) The NAM2 proteins from S. cerevisiae and S. douglasii are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases, and are involved in mRNA splicing. *EMBO J* **7**: 473-483
- Hernandez JA, Bes MT, Fillat MF, Neira JL, Peleato ML (2002) Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from Anabaena PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. *Biochem J* **366**: 315-322
- Hernandez JA, Lopez-Gomollon S, Bes MT, Fillat MF, Peleato ML (2004) Three fur homologues from Anabaena sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition. *FEMS Microbiol Lett* **236**: 275-282
- Hernandez JA, Lopez-Gomollon S, Muro-Pastor A, Valladares A, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF (2006a) Interaction of FurA from Anabaena sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive effectors in the binding to isiB and furA promoters. *Biometals* **19**: 259-268

Bibliografía

- Hernandez JA, Muro-Pastor AM, Flores E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF (2006b) Identification of a furA cis antisense RNA in the cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120. *J Mol Biol* **355**: 325-334
- Herrero A, Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E (2004) Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 469-487
- Hess WR (2011) Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Curr Opin Microbiol* **14**: 608-614
- Hoagland MB (1955) An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim Biophys Acta* **16**: 288-289
- Hoagland MB (1958) Amino-acid activation by individual enzymes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **149**: 401-402
- Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC (1958) A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem* **231**: 241-257
- Horowitz H, Platt T (1982) Regulation of transcription from tandem and convergent promoters. *Nucleic Acids Res* **10**: 5447-5465
- Hou YM, Schimmel P (1988) A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature* **333**: 140-145
- Hou YM, Schimmel P (1989) Evidence that a major determinant for the identity of a transfer RNA is conserved in evolution. *Biochemistry* **28**: 6800-6804
- Huang DL, Tang DJ, Liao Q, Li HC, Chen Q, He YQ, Feng JX, Jiang BL, Lu GT, Chen B, Tang JL (2008) The Zur of Xanthomonas campestris functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters. *Nucleic Acids Res* **36**: 4295-4309
- Huang HH, Camsund D, Lindblad P, Heidorn T (2010) Design and characterization of molecular tools for a Synthetic Biology approach towards developing cyanobacterial biotechnology. *Nucleic Acids Res* **38**: 2577-2593
- Huckle JW, Morby AP, Turner JS, Robinson NJ (1993) Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Mol Microbiol* **7**: 177-187
- Hussain T, Kruparani SP, Pal B, Dock-Bregeon AC, Dwivedi S, Shekar MR, Sureshbabu K, Sankaranarayanan R (2006) Post-transfer editing mechanism of a D-aminoacyl-tRNA deacylase-like domain in threonyl-tRNA synthetase from archaea. *EMBO J* **25**: 4152-4162
- Hyun HJ, Sohn JH, Ha DW, Ahn YH, Koh JY, Yoon YH (2001) Depletion of intracellular zinc and copper with TPEN results in apoptosis of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 460-465
- Ibba M, Becker HD, Stathopoulos C, Tumbula DL, Soll D (2000) The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci* **25**: 311-316
- Ibba M, Curnow AW, Soll D (1997a) Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. *Trends Biochem Sci* **22**: 39-42
- Ibba M, Morgan S, Curnow AW, Pridmore DR, Vothknecht UC, Gardner W, Lin W, Woese CR, Soll D (1997b) A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetases. *Science* **278**: 1119-1122
- Ibba M, Soll D (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **69**: 617-650
- Ibba M, Soll D (2004) Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes Dev* **18**: 731-738

Bibliografía

- Illangasekare M, Yarus M (1999) A tiny RNA that catalyzes both aminoacyl-RNA and peptidyl-RNA synthesis. *RNA* **5**: 1482-1489
- Irving H, Williams RJP (1948) Order of stability of metal complexes. *Nature* **162**: 746-747
- Ishikura H, Nagaoka Y, Yokozawa J, Umehara T, Kuno A, Hasegawa T (2000) Threonyl-tRNA synthetase of archaea: importance of the discriminator base in the aminoacylation of threonine tRNA. *Nucleic Acids Symp Ser*: 83-84
- Ishiura M, Kutsuna S, Aoki S, Iwasaki H, Andersson CR, Tanabe A, Golden SS, Johnson CH, Kondo T (1998) Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. *Science* **281**: 1519-1523
- Ito H, Mutsuda M, Murayama Y, Tomita J, Hosokawa N, Terauchi K, Sugita C, Sugita M, Kondo T, Iwasaki H (2009) Cyanobacterial daily life with Kai-based circadian and diurnal genome-wide transcriptional control in *Synechococcus elongatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14168-14173
- Ito K, Kawakami K, Nakamura Y (1993) Multiple control of *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase expression involves a transcriptional repressor and a translational enhancer element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 302-306
- Iwasaki H, Nishiwaki T, Kitayama Y, Nakajima M, Kondo T (2002) KaiA-stimulated KaiC phosphorylation in circadian timing loops in cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15788-15793
- Jaffe EK (2003) An unusual phylogenetic variation in the metal ion binding sites of porphobilinogen synthase. *Chem Biol* **10**: 25-34
- Jaffe EK (2004) The porphobilinogen synthase catalyzed reaction mechanism. *Bioorg Chem* **32**: 316-325
- Jarvest RL, Berge JM, Berry V, Boyd HF, Brown MJ, Elder JS, Forrest AK, Fosberry AP, Gentry DR, Hibbs MJ, Jaworski DD, O'Hanlon PJ, Pope AJ, Rittenhouse S, Sheppard RJ, Slater-Radosti C, Worby A (2002) Nanomolar inhibitors of *Staphylococcus aureus* methionyl tRNA synthetase with potent antibacterial activity against gram-positive pathogens. *Journal of medicinal chemistry* **45**: 1959-1962
- Kageyama H, Nishiwaki T, Nakajima M, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T (2006) Cyanobacterial circadian pacemaker: Kai protein complex dynamics in the KaiC phosphorylation cycle in vitro. *Mol Cell* **23**: 161-171
- Kahn M, Kolter R, Thomas C, Figurski D, Meyer R, Remaut E, Helinski DR (1979) Plasmid cloning vehicles derived from plasmids ColE1, F, R6K, and RK2. *Methods Enzymol* **68**: 268-280
- Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takazawa M, Yamada M, Yasuda M, Tabata S (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* **8**: 205-213; 227-253
- Kao J, Ryan J, Brett G, Chen J, Shen H, Fan YG, Godman G, Familletti PC, Wang F, Pan YC, et al. (1992) Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. *J Biol Chem* **267**: 20239-20247
- Kasting JF, Siefert JL (2002) Life and the evolution of Earth's atmosphere. *Science* **296**: 1066-1068
- Keilin D, Mann T (1940) Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem J* **34**: 1163-1176
- Kim J, Guan KL (2011) Amino acid signaling in TOR activation. *Annu Rev Biochem* **80**: 1001-1032

Bibliografía

- King JC (2011) Zinc: an essential but elusive nutrient. *The American journal of clinical nutrition* **94**: 679S-684S
- Kise Y, Lee SW, Park SG, Fukai S, Sengoku T, Ishii R, Yokoyama S, Kim S, Nureki O (2004) A short peptide insertion crucial for angiostatic activity of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 149-156
- Kitabatake M, Ali K, Demain A, Sakamoto K, Yokoyama S, Soll D (2002) Indolmycin resistance of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by induced expression of one of its two tryptophanyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **277**: 23882-23887
- Kitayama Y, Iwasaki H, Nishiwaki T, Kondo T (2003) KaiB functions as an attenuator of KaiC phosphorylation in the cyanobacterial circadian clock system. *EMBO J* **22**: 2127-2134
- Klein S, Lorenzo C, Hoffmann S, Walther JM, Storbeck S, Piekarski T, Tindall BJ, Wray V, Nimtz M, Moser J (2009) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to various conditions includes tRNA-dependent formation of alanyl-phosphatidylglycerol. *Mol Microbiol* **71**: 551-565
- Kloosterman TG, van der Kooi-Pol MM, Bijlsma JJ, Kuipers OP (2007) The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn²⁺ stress by activation of the Zn²⁺-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **65**: 1049-1063
- Knight RD, Landweber LF (2000) The early evolution of the genetic code. *Cell* **101**: 569-572
- Knoll AH (2008) Cyanobacteria and Earth History. In *The Cyanobacteria. Molecular Biology, Genomics and Evolution*, Herrero A, Flores E (eds), pp 1-19. Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Koonin EV, Novozhilov AS (2009) Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma. *IUBMB Life* **61**: 99-111
- Koonin EV, Wolf YI (2008) Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res* **36**: 6688-6719
- Korencic D, Ahel I, Schelert J, Sacher M, Ruan B, Stathopoulos C, Blum P, Ibba M, Soll D (2004) A freestanding proofreading domain is required for protein synthesis quality control in Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10260-10265
- Kouril R, Arteni AA, Lax J, Yeremenko N, D'Haene S, Rogner M, Matthijs HC, Dekker JP, Boekema EJ (2005) Structure and functional role of supercomplexes of IsiA and Photosystem I in cyanobacterial photosynthesis. *FEBS Lett* **579**: 3253-3257
- Krakauer DC, Nowak MA (1999) Evolutionary preservation of redundant duplicated genes. *Seminars in cell & developmental biology* **10**: 555-559
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lambowitz AM, Perlman PS (1990) Involvement of aminoacyl-tRNA synthetases and other proteins in group I and group II intron splicing. *Trends Biochem Sci* **15**: 440-444
- Laudenbach DE, Straus NA (1988) Characterization of a cyanobacterial iron stress-induced gene similar to *psbC*. *J Bacteriol* **170**: 5018-5026
- Leach MR, Zamble DB (2007) Metallocenter assembly of the hydrogenase enzymes. *Current opinion in chemical biology* **11**: 159-165
- Lee JW, Helmann JD (2007) Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**: 485-499

Bibliografía

- Lee N, Bessho Y, Wei K, Szostak JW, Suga H (2000) Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nat Struct Biol* **7**: 28-33
- Lee SW, Cho BH, Park SG, Kim S (2004) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J Cell Sci* **117**: 3725-3734
- Li Y, Qiu Y, Gao H, Guo Z, Han Y, Song Y, Du Z, Wang X, Zhou D, Yang R (2009) Characterization of Zur-dependent genes and direct Zur targets in *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* **9**: 128
- Liang Y, Li C, Guzman VM, Evinger AJ, 3rd, Protzman CE, Krauss AH, Woodward DF (2003) Comparison of prostaglandin F2alpha, bimatoprost (prostamide), and butaprost (EP2 agonist) on Cyr61 and connective tissue growth factor gene expression. *J Biol Chem* **278**: 27267-27277
- Lim HM, Lewis DE, Lee HJ, Liu M, Adhya S (2003) Effect of varying the supercoiling of DNA on transcription and its regulation. *Biochemistry* **42**: 10718-10725
- Ling J, Peterson KM, Simonovic I, Cho C, Soll D, Simonovic M (2012) Yeast mitochondrial threonyl-tRNA synthetase recognizes tRNA isoacceptors by distinct mechanisms and promotes CUN codon reassignment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 3281-3286
- Ling J, Reynolds N, Ibba M (2009) Aminoacyl-tRNA synthesis and translational quality control. *Annu Rev Microbiol* **63**: 61-78
- Liu HB, Nolla HA, Campbell L (1997) *Prochlorococcus* growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **12**: 39-47
- Liu J, Gagnon Y, Gauthier J, Furenlid L, L'Heureux PJ, Auger M, Nureki O, Yokoyama S, Lapointe J (1995) The zinc-binding site of *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase is located in the acceptor-binding domain. Studies by extended x-ray absorption fine structure, molecular modeling, and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **270**: 15162-15169
- Liu LF, Wang JC (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7024-7027
- Liu T, Golden JW, Giedroc DP (2005) A zinc(II)/lead(II)/cadmium(II)-inducible operon from the Cyanobacterium *Anabaena* is regulated by AztR, an alpha3N ArsR/SmtB metalloregulator. *Biochemistry* **44**: 8673-8683
- Llull D, Son O, Blanie S, Briffotiaux J, Morello E, Rogniaux H, Danot O, Poquet I (2011) *Lactococcus lactis* ZitR is a zinc-responsive repressor active in the presence of low, nontoxic zinc concentrations in vivo. *J Bacteriol* **193**: 1919-1929
- Loftfield RB, Vanderjagt D (1972) The frequency of errors in protein biosynthesis. *Biochem J* **128**: 1353-1356
- Lopez PJ, Guillerez J, Sousa R, Dreyfus M (1998) On the mechanism of inhibition of phage T7 RNA polymerase by lac repressor. *J Mol Biol* **276**: 861-875
- Lopez-Gomollon S, Hernandez JA, Pellicer S, Angarica VE, Peleato ML, Fillat MF (2007) Cross-talk between iron and nitrogen regulatory networks in *Anabaena* (Nostoc) sp. PCC 7120: identification of overlapping genes in FurA and NtcA regulons. *J Mol Biol* **374**: 267-281
- Lopez-Gomollon S, Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF (2009) New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem J* **418**: 201-207
- Lostao A, Peleato ML, Gomez-Moreno C, Fillat MF (2010) Oligomerization properties of FurA from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120: direct visualization by in situ atomic force microscopy under different redox conditions. *Biochim Biophys Acta* **1804**: 1723-1729

Bibliografía

- Lucarelli D, Russo S, Garman E, Milano A, Meyer-Klaucke W, Pohl E (2007) Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **282**: 9914-9922
- Luque I, Forchhammer K (2008) Nitrogen Assimilation and C/N Balance Sensing. In *The Cyanobacteria*, Herrero A, Flores E (eds), pp 335-382. Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Luque I, Riera-Alberola ML, Andujar A, Ochoa de Alda JA (2008) Intraphylum diversity and complex evolution of cyanobacterial aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Biol Evol* **25**: 2369-2389
- Ma Z, Gabriel SE, Helmann JD (2011) Sequential binding and sensing of Zn(II) by *Bacillus subtilis* Zur. *Nucleic Acids Res* **39**: 9130-9138
- Maciag A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palu G, Riccardi G, Manganello R (2007) Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol* **189**: 730-740
- Mackinney G (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* **140**: 315-322
- Maier RJ, Benoit SL, Seshadri S (2007) Nickel-binding and accessory proteins facilitating Ni-enzyme maturation in *Helicobacter pylori*. *Biometals* **20**: 655-664
- Masse E, Gottesman S (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4620-4625
- Mechulam Y, Schmitt E, Maveyraud L, Zelwer C, Nureki O, Yokoyama S, Konno M, Blanquet S (1999) Crystal structure of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase highlights species-specific features. *J Mol Biol* **294**: 1287-1297
- Meeks JC, Elhai J (2002) Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free-living and plant-associated symbiotic growth states. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 94-121; table of contents
- Merchant SS, Helmann JD (2012) Elemental economy: microbial strategies for optimizing growth in the face of nutrient limitation. *Adv Microb Physiol* **60**: 91-210
- Min B, Kitabatake M, Polycarpo C, Pelaschier J, Racznik G, Ruan B, Kobayashi H, Namgoong S, Soll D (2003) Protein synthesis in *Escherichia coli* with mischarged tRNA. *J Bacteriol* **185**: 3524-3526
- Min B, Pelaschier JT, Graham DE, Tumbula-Hansen D, Soll D (2002) Transfer RNA-dependent amino acid biosynthesis: an essential route to asparagine formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2678-2683
- Minajigi A, Francklyn CS (2010) Aminoacyl transfer rate dictates choice of editing pathway in threonyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **285**: 23810-23817
- Mocibob M, Ivic N, Bilokapic S, Maier T, Luic M, Ban N, Weygand-Durasevic I (2010) Homologs of aminoacyl-tRNA synthetases acylate carrier proteins and provide a link between ribosomal and nonribosomal peptide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 14585-14590
- Mogk A, Schmidt R, Bukau B (2007) The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol* **17**: 165-172
- Mohamed A, Jansson C (1989) Influence of light on accumulation of photosynthesis-specific transcripts in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. *Plant Mol Biol* **13**: 693-700
- Mohr G, Rennard R, Cherniack AD, Stryker J, Lambowitz AM (2001) Function of the *Neurospora crassa* mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing. Role of the idiosyncratic N-terminal extension and different modes of interaction with different group I introns. *J Mol Biol* **307**: 75-92

Bibliografía

- Moine H, Romby P, Springer M, Grunberg-Manago M, Ebel JP, Ehresmann B, Ehresmann C (1990) Escherichia coli threonyl-tRNA synthetase and tRNA(Thr) modulate the binding of the ribosome to the translational initiation site of the thrS mRNA. *J Mol Biol* **216**: 299-310
- Mulkidjanian AY, Koonin EV, Makarova KS, Mekhedov SL, Sorokin A, Wolf YI, Dufresne A, Partensky F, Burd H, Kaznadzey D, Haselkorn R, Galperin MY (2006) The cyanobacterial genome core and the origin of photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13126-13131
- Muro-Pastor AM, Hess WR (2012) Heterocyst differentiation: from single mutants to global approaches. *Trends Microbiol* **20**: 548-557
- Murray NE, Brammar WJ, Murray K (1977) Lamboid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol Gen Genet* **150**: 53-61
- Mursinna RS, Martinis SA (2002) Rational design to block amino acid editing of a tRNA synthetase. *J Am Chem Soc* **124**: 7286-7287
- Musier-Forsyth K, Beuning PJ (2000) Role of zinc ion in translational accuracy becomes crystal clear. *Nat Struct Biol* **7**: 435-436
- Nagel GM, Doolittle RF (1991) Evolution and relatedness in two aminoacyl-tRNA synthetase families. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8121-8125
- Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, Oyama T, Kondo T (2005) Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* **308**: 414-415
- Nakama T, Nureki O, Yokoyama S (2001) Structural basis for the recognition of isoleucyl-adenylate and an antibiotic, mupirocin, by isoleucyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **276**: 47387-47393
- Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Mimuro M, Miyashita H, Tsuchiya T, Sasamoto S, Watanabe A, Kawashima K, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakazaki N, Shimpo S, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res* **10**: 137-145
- Nameki N (1995) Identity elements of tRNA(Thr) towards *Saccharomyces cerevisiae* threonyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res* **23**: 2831-2836
- Nameki N, Asahara H, Hasegawa T (1996) Identity elements of *Thermus thermophilus* tRNA(Thr). *FEBS Lett* **396**: 201-207
- Napolitano M, Rubio MA, Camargo S, Luque I (2013) Regulation of internal promoters in a zinc-responsive operon is influenced by transcription from upstream promoters. *J Bacteriol*
- Nasir MS, Fahrni CJ, Suhy DA, Kolodnick KJ, Singer CP, O'Halloran TV (1999) The chemical cell biology of zinc: structure and intracellular fluorescence of a zinc-quinolinesulfonamide complex. *J Biol Inorg Chem* **4**: 775-783
- Navarre WW, Zou SB, Roy H, Xie JL, Savchenko A, Singer A, Edvokimova E, Prost LR, Kumar R, Ibba M, Fang FC (2010) PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* **39**: 209-221
- Nichol CA, Smith GK, Duch DS (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu Rev Biochem* **54**: 729-764
- Niehus E, Cheng E, Tan M (2008) DNA supercoiling-dependent gene regulation in *Chlamydia*. *J Bacteriol* **190**: 6419-6427
- Nishiwaki T, Iwasaki H, Ishiura M, Kondo T (2000) Nucleotide binding and autophosphorylation of the clock protein KaiC as a circadian timing process of cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 495-499

Bibliografía

- Nishiwaki T, Satomi Y, Kitayama Y, Terauchi K, Kiyohara R, Takao T, Kondo T (2007) A sequential program of dual phosphorylation of KaiC as a basis for circadian rhythm in cyanobacteria. *EMBO J* **26**: 4029-4037
- Nishiwaki T, Satomi Y, Nakajima M, Lee C, Kiyohara R, Kageyama H, Kitayama Y, Temamoto M, Yamaguchi A, Hijikata A, Go M, Iwasaki H, Takao T, Kondo T (2004) Role of KaiC phosphorylation in the circadian clock system of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13927-13932
- Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* **64**: 43-60
- Nureki O, Kohno T, Sakamoto K, Miyazawa T, Yokoyama S (1993) Chemical modification and mutagenesis studies on zinc binding of aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **268**: 15368-15373
- Nureki O, Vassilyev DG, Tateno M, Shimada A, Nakama T, Fukai S, Konno M, Hendrickson TL, Schimmel P, Yokoyama S (1998) Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* **280**: 578-582
- O'Donoghue P, Luthey-Schulten Z (2003) On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 550-573
- Olmedo-Verd E, Santamaria-Gomez J, Ochoa de Alda JA, Ribas de Pouplana L, Luque I (2011) Membrane anchoring of aminoacyl-tRNA synthetases by convergent acquisition of a novel protein domain. *J Biol Chem* **286**: 41057-41068
- Osman D, Cavet JS (2010) Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors. *Natural product reports* **27**: 668-680
- Otani A, Slike BM, Dorrell MI, Hood J, Kinder K, Ewalt KL, Cheresch D, Schimmel P, Friedlander M (2002) A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 178-183
- Palencia A, Crepin T, Vu MT, Lincecum TL, Jr., Martinis SA, Cusack S (2012) Structural dynamics of the aminoacylation and proofreading functional cycle of bacterial leucyl-tRNA synthetase. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 677-684
- Palenik B, Brahamsha B, Larimer FW, Land M, Hauser L, Chain P, Lamerdin J, Regala W, Allen EE, McCarren J, Paulsen I, Dufresne A, Partensky F, Webb EA, Waterbury J (2003) The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* **424**: 1037-1042
- Palmer AC, Egan JB, Shearwin KE (2011) Transcriptional interference by RNA polymerase pausing and dislodgement of transcription factors. *Transcription* **2**: 9-14
- Palmer CM, Guerinot ML (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* **5**: 333-340
- Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS (2003) Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9912-9917
- Park SG, Ewalt KL, Kim S (2005) Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends Biochem Sci* **30**: 569-574
- Partensky F, Hess WR, Vaultot D (1999) *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 106-127
- Patzter SI, Hantke K (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 1199-1210

Bibliografía

- Patzer SI, Hantke K (2000) The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **275**: 24321-24332
- Paukstelis PJ, Chen JH, Chase E, Lambowitz AM, Golden BL (2008) Structure of a tyrosyl-tRNA synthetase splicing factor bound to a group I intron RNA. *Nature* **451**: 94-97
- Paukstelis PJ, Coon R, Madabusi L, Nowakowski J, Monzingo A, Robertus J, Lambowitz AM (2005) A tyrosyl-tRNA synthetase adapted to function in group I intron splicing by acquiring a new RNA binding surface. *Mol Cell* **17**: 417-428
- Pawlik MC, Hubert K, Joseph B, Claus H, Schoen C, Vogel U (2012) The zinc-responsive regulon of *Neisseria meningitidis* comprises 17 genes under control of a Zur element. *J Bacteriol* **194**: 6594-6603
- Pennella MA, Shokes JE, Coper NJ, Scott RA, Giedroc DP (2003) Structural elements of metal selectivity in metal sensor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3713-3718
- Perez-Roger I, Macian F, Armengod ME (1995) Transcription termination in the *Escherichia coli* dnaA gene is not mediated by the internal DnaA box. *J Bacteriol* **177**: 1896-1899
- Posey JE, Gherardini FC (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**: 1651-1653
- Proshkin S, Rahmouni AR, Mironov A, Nudler E (2010) Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science* **328**: 504-508
- Puerto-Galan L, Vioque A (2012) Expression and processing of an unusual tRNA gene cluster in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEMS Microbiol Lett* **337**: 10-17
- Putney SD, Royal NJ, Neuman de Vegvar H, Herlihy WC, Biemann K, Schimmel P (1981) Primary structure of a large aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **213**: 1497-1501
- Putzer H, Brakhage AA, Grunberg-Manago M (1990) Independent genes for two threonyl-tRNA synthetases in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **172**: 4593-4602
- Putzer H, Gendron N, Grunberg-Manago M (1992) Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J* **11**: 3117-3127
- Radford DS, Kihlken MA, Borrelly GP, Harwood CR, Le Brun NE, Cavet JS (2003) CopZ from *Bacillus subtilis* interacts in vivo with a copper exporting CPx-type ATPase CopA. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 105-112
- Ray PS, Fox PL (2007) A post-transcriptional pathway represses monocyte VEGF-A expression and angiogenic activity. *EMBO J* **26**: 3360-3372
- Raymond J, Zhaxybayeva O, Gogarten JP, Gerdes SY, Blankenship RE (2002) Whole-genome analysis of photosynthetic prokaryotes. *Science* **298**: 1616-1620
- Reyes-Caballero H, Guerra AJ, Jacobsen FE, Kazmierczak KM, Cowart D, Koppolu UM, Scott RA, Winkler ME, Giedroc DP (2010) The metalloregulatory zinc site in *Streptococcus pneumoniae* AdcR, a zinc-activated MarR family repressor. *J Mol Biol* **403**: 197-216
- Reynolds NM, Lazazzera BA, Ibba M (2010) Cellular mechanisms that control mistranslation. *Nat Rev Microbiol* **8**: 849-856
- Rhee KY, Opel M, Ito E, Hung S, Arfin SM, Hatfield GW (1999) Transcriptional coupling between the divergent promoters of a prototypic LysR-type regulatory system, the *ilvYC* operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14294-14299

Bibliografía

- Rho SB, Lincecum TL, Jr., Martinis SA (2002) An inserted region of leucyl-tRNA synthetase plays a critical role in group I intron splicing. *EMBO J* **21**: 6874-6881
- Rho SB, Martinis SA (2000) The bI4 group I intron binds directly to both its protein splicing partners, a tRNA synthetase and maturase, to facilitate RNA splicing activity. *RNA* **6**: 1882-1894
- Ribas de Pouplana L, Frugier M, Quinn CL, Schimmel P (1996) Evidence that two present-day components needed for the genetic code appeared after nucleated cells separated from eubacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 166-170
- Ribas de Pouplana L, Schimmel P (2000) A view into the origin of life: aminoacyl-tRNA synthetases. *Cell Mol Life Sci* **57**: 865-870
- Ribas de Pouplana L, Schimmel P (2001) Aminoacyl-tRNA synthetases: potential markers of genetic code development. *Trends Biochem Sci* **26**: 591-596
- Rippka R (1972) Photoheterotrophy and Chemoheterotrophy among Unicellular Blue-Green Algae. *Arch Mikrobiol* **87**: 93-98
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**: 1-61
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697
- Robinson NJ, Winge DR (2010) Copper metallochaperones. *Annu Rev Biochem* **79**: 537-562
- Rocap G, Larimer FW, Lamerdin J, Malfatti S, Chain P, Ahlgren NA, Arellano A, Coleman M, Hauser L, Hess WR, Johnson ZI, Land M, Lindell D, Post AF, Regala W, Shah M, Shaw SL, Steglich C, Sullivan MB, Ting CS, Tolonen A, Webb EA, Zinser ER, Chisholm SW (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* **424**: 1042-1047
- Romby P, Caillet J, Ebel C, Sacerdot C, Graffe M, Eyermann F, Brunel C, Moine H, Ehresmann C, Ehresmann B, Springer M (1996) The expression of *E. coli* threonyl-tRNA synthetase is regulated at the translational level by symmetrical operator-repressor interactions. *EMBO J* **15**: 5976-5987
- Romby P, Springer M (2003) Bacterial translational control at atomic resolution. *Trends Genet* **19**: 155-161
- Roy H, Becker HD, Reinbolt J, Kern D (2003) When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9837-9842
- Roy H, Ibba M (2008) RNA-dependent lipid remodeling by bacterial multiple peptide resistance factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 4667-4672
- Roy H, Ling J, Alfonzo J, Ibba M (2005) Loss of editing activity during the evolution of mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **280**: 38186-38192
- Ruan B, Palioura S, Sabina J, Marvin-Guy L, Kochhar S, Larossa RA, Soll D (2008) Quality control despite mistranslation caused by an ambiguous genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16502-16507
- Rudinger J, Hillenbrandt R, Sprinzl M, Giege R (1996) Antideterminants present in minihelix(Sec) hinder its recognition by prokaryotic elongation factor Tu. *EMBO J* **15**: 650-657
- Salazar JC, Ahel I, Orellana O, Tumbula-Hansen D, Krieger R, Daniels L, Soll D (2003) Coevolution of an aminoacyl-tRNA synthetase with its tRNA substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13863-13868
- Saluta MV, Hirshfield IN (1995) The occurrence of duplicate lysyl-tRNA synthetase gene homologs in *Escherichia coli* and other prokaryotes. *J Bacteriol* **177**: 1872-1878

Bibliografía

- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Francisco MJ, Hope CL, Owolabi JB, Tisa LS, Rosen BP (1990) Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acids Res* **18**: 619-624
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Sankaran B, Bonnett SA, Shah K, Gabriel S, Reddy R, Schimmel P, Rodionov DA, de Crecy-Lagard V, Helmann JD, Iwata-Reuyl D, Swairjo MA (2009) Zinc-independent folate biosynthesis: genetic, biochemical, and structural investigations reveal new metal dependence for GTP cyclohydrolase IB. *J Bacteriol* **191**: 6936-6949
- Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon AC, Rees B, Bovee M, Caillet J, Romby P, Francklyn CS, Moras D (2000) Zinc ion mediated amino acid discrimination by threonyl-tRNA synthetase. *Nat Struct Biol* **7**: 461-465
- Sankaranarayanan R, Dock-Bregeon AC, Romby P, Caillet J, Springer M, Rees B, Ehresmann C, Ehresmann B, Moras D (1999) The structure of threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex enlightens its repressor activity and reveals an essential zinc ion in the active site. *Cell* **97**: 371-381
- Santos MA, Moura G, Massey SE, Tuite MF (2004) Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *Trends Genet* **20**: 95-102
- Sasaki HM, Sekine S, Sengoku T, Fukunaga R, Hattori M, Utsunomiya Y, Kuroishi C, Kuramitsu S, Shirouzu M, Yokoyama S (2006) Structural and mutational studies of the amino acid-editing domain from archaeal/eukaryal phenylalanyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 14744-14749
- Sauerwald A, Zhu W, Major TA, Roy H, Palioura S, Jahn D, Whitman WB, Yates JR, 3rd, Ibba M, Soll D (2005) RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* **307**: 1969-1972
- Schimmel P, Ribas de Pouplana L (1995) Transfer RNA: from minihelix to genetic code. *Cell* **81**: 983-986
- Schimmel PR, Soll D (1979) Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annu Rev Biochem* **48**: 601-648
- Schirromeister BE, Antonelli A, Bagheri HC (2011) The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BMC Evol Biol* **11**: 45
- Schirromeister BE, de Vos JM, Antonelli A, Bagheri HC (2013) Evolution of multicellularity coincided with increased diversification of cyanobacteria and the Great Oxidation Event. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1791-1796
- Schon A, Krupp G, Gough S, Berry-Lowe S, Kannangara CG, Soll D (1986) The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* **322**: 281-284
- Schroder J, Jochmann N, Rodionov DA, Tauch A (2010) The Zur regulon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *BMC Genomics* **11**: 12
- Schulze JO, Masoumi A, Nickel D, Jahn M, Jahn D, Schubert WD, Heinz DW (2006) Crystal structure of a non-discriminating glutamyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **361**: 888-897
- Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR (2009) Mechanism of Mo-dependent nitrogenase. *Annu Rev Biochem* **78**: 701-722

Bibliografía

- Sevilla E, Martin-Luna B, Gonzalez A, Gonzalo-Asensio JA, Peleato ML, Fillat MF (2011) Identification of three novel antisense RNAs in the fur locus from unicellular cyanobacteria. *Microbiology* **157**: 3398-3404
- Shi T, Falkowski PG (2008) Genome evolution in cyanobacteria: the stable core and the variable shell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2510-2515
- Shih PM, Wu D, Latifi A, Axen SD, Fewer DP, Talla E, Calteau A, Cai F, Tandeau de Marsac N, Rippka R, Herdman M, Sivonen K, Coursin T, Laurent T, Goodwin L, Nolan M, Davenport KW, Han CS, Rubin EM, Eisen JA, Woyke T, Gugger M, Kerfeld CA (2013) Improving the coverage of the cyanobacterial phylum using diversity-driven genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1053-1058
- Shimizu S, Juan EC, Sato Y, Miyashita Y, Hoque MM, Suzuki K, Sagara T, Tsunoda M, Sekiguchi T, Dock-Bregeon AC, Moras D, Takenaka A (2009) Two complementary enzymes for threonylation of tRNA in crenarchaeota: crystal structure of Aeropyrum pernix threonyl-tRNA synthetase lacking a cis-editing domain. *J Mol Biol* **394**: 286-296
- Shin JH, Jung HJ, An YJ, Cho YB, Cha SS, Roe JH (2011) Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in Zur. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5045-5050
- Sigdel TK, Easton JA, Crowder MW (2006) Transcriptional response of Escherichia coli to TPEN. *J Bacteriol* **188**: 6709-6713
- Silvian LF, Wang J, Steitz TA (1999) Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{ile} and mupirocin. *Science* **285**: 1074-1077
- Sissler M, Delorme C, Bond J, Ehrlich SD, Renault P, Francklyn C (1999) An aminoacyl-tRNA synthetase paralog with a catalytic role in histidine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8985-8990
- Sissler M, Eriani G, Martin F, Giege R, Florentz C (1997) Mirror image alternative interaction patterns of the same tRNA with either class I arginyl-tRNA synthetase or class II aspartyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res* **25**: 4899-4906
- Skouloubris S, Ribas de Pouplana L, De Reuse H, Hendrickson TL (2003) A noncognate aminoacyl-tRNA synthetase that may resolve a missing link in protein evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11297-11302
- Smith AJ, London J, Stanier RY (1967) Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and thiobacilli. *J Bacteriol* **94**: 972-983
- Smith RM, Williams SB (2006) Circadian rhythms in gene transcription imparted by chromosome compaction in the cyanobacterium Synechococcus elongatus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8564-8569
- Sokabe M, Ose T, Nakamura A, Tokunaga K, Nureki O, Yao M, Tanaka I (2009) The structure of alanyl-tRNA synthetase with editing domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11028-11033
- Söll D, Schimmel P (1974) Enzymes. Vol. 10, Aminoacyl-tRNA synthetases, pp 489-538.
- Springer M, Plumbridge JA, Butler JS, Graffe M, Dondon J, Mayaux JF, Fayat G, Lestienne P, Blanquet S, Grunberg-Manago M (1985) Autogenous control of Escherichia coli threonyl-tRNA synthetase expression in vivo. *J Mol Biol* **185**: 93-104
- Sriram SM, Kim BY, Kwon YT (2011) The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 735-747
- Stanzel M, Schon A, Sprinzl M (1994) Discrimination against misacylated tRNA by chloroplast elongation factor Tu. *Eur J Biochem* **219**: 435-439

Bibliografía

- Stebegg R, Wurzinger B, Mikulic M, Schmetterer G (2012) Chemoheterotrophic growth of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 dependent on a functional cytochrome c oxidase. *J Bacteriol* **194**: 4601-4607
- Steinhauser D, Fernie AR, Araujo WL (2012) Unusual cyanobacterial TCA cycles: not broken just different. *Trends Plant Sci* **17**: 503-509
- Studier WD, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**: 60-89
- Summers ML, Wallis JG, Campbell EL, Meeks JC (1995) Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium *Nostoc* sp. strain ATCC 29133. *J Bacteriol* **177**: 6184-6194
- Swingley WD, Blankenship RE, Raymond J (2008) Integrating Markov clustering and molecular phylogenetics to reconstruct the cyanobacterial species tree from conserved protein families. *Mol Biol Evol* **25**: 643-654
- Tasaki T, Sriram SM, Park KS, Kwon YT (2012) The N-end rule pathway. *Annu Rev Biochem* **81**: 261-289
- Terada T, Nureki O, Ishitani R, Ambrogelly A, Ibba M, Soll D, Yokoyama S (2002) Functional convergence of two lysyl-tRNA synthetases with unrelated topologies. *Nat Struct Biol* **9**: 257-262
- Thelwell C, Robinson NJ, Turner-Cavet JS (1998) An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10728-10733
- Thompson AW, Foster RA, Krupke A, Carter BJ, Musat N, Vault D, Kuypers MM, Zehr JP (2012) Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* **337**: 1546-1550
- Tomitani A, Knoll AH, Cavanaugh CM, Ohno T (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5442-5447
- Torres-Larios A, Dock-Bregeon AC, Romby P, Rees B, Sankaranarayanan R, Caillet J, Springer M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moras D (2002) Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl tRNA synthetase. *Nat Struct Biol* **9**: 343-347
- Torres-Larios A, Sankaranarayanan R, Rees B, Dock-Bregeon AC, Moras D (2003) Conformational movements and cooperativity upon amino acid, ATP and tRNA binding in threonyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **331**: 201-211
- Tottey S, Rondet SA, Borrelly GP, Robinson PJ, Rich PR, Robinson NJ (2002) A copper metallochaperone for photosynthesis and respiration reveals metal-specific targets, interaction with an importer, and alternative sites for copper acquisition. *J Biol Chem* **277**: 5490-5497
- Tottey S, Waldron KJ, Firbank SJ, Reale B, Bessant C, Sato K, Cheek TR, Gray J, Banfield MJ, Dennison C, Robinson NJ (2008) Protein-folding location can regulate manganese-binding versus copper- or zinc-binding. *Nature* **455**: 1138-1142
- Tripp HJ, Bench SR, Turk KA, Foster RA, Desany BA, Niazi F, Affourtit JP, Zehr JP (2010) Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature* **464**: 90-94
- Tukalo M, Yaremchuk A, Fukunaga R, Yokoyama S, Cusack S (2005) The crystal structure of leucyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Leu} in the post-transfer-editing conformation. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 923-930
- Ungerer JL, Pratte BS, Thiel T (2008) Regulation of fructose transport and its effect on fructose toxicity in *Anabaena* spp. *J Bacteriol* **190**: 8115-8125

Bibliografía

- Varshavsky A (1983) Diadenosine 5', 5'''-P₁, P₄-tetraphosphate: a pleiotropically acting alarmone? *Cell* **34**: 711-712
- Vecchione JJ, Sello JK (2008) Characterization of an inducible, antibiotic-resistant aminoacyl-tRNA synthetase gene in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **190**: 6253-6257
- Wakasugi K, Schimmel P (1999) Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* **284**: 147-151
- Wakasugi K, Slike BM, Hood J, Ewalt KL, Cheresch DA, Schimmel P (2002a) Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* **277**: 20124-20126
- Wakasugi K, Slike BM, Hood J, Otani A, Ewalt KL, Friedlander M, Cheresch DA, Schimmel P (2002b) A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 173-177
- Waldron KJ, Robinson NJ (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat Rev Microbiol* **7**: 25-35
- Waldron KJ, Rutherford JC, Ford D, Robinson NJ (2009) Metalloproteins and metal sensing. *Nature* **460**: 823-830
- Wetzel R (1978) Aminoacyl-tRNA synthetase families and their significance to the origin of the genetic code. *Origins of life* **9**: 39-50
- Wetzel R (1995) Evolution of the aminoacyl-tRNA synthetases and the origin of the genetic code. *J Mol Evol* **40**: 545-550
- Whitton BA, Potts M (2002) Introduction to the cyanobacteria. In *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, Whitton BA, Potts M (eds), 1, pp 1-10. New York, Boston, Dordrecht: Kluwer Academic Publisher
- Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jorgensen F, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS (1998a) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 185-192
- Winson MK, Swift S, Hill PJ, Sims CM, Griesmayr G, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS (1998b) Engineering the luxCDABE genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 193-202
- Woese CR (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8392-8396
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4576-4579
- Woese CR, Olsen GJ, Ibba M, Soll D (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 202-236
- Wolf YI, Aravind L, Grishin NV, Koonin EV (1999) Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases--analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* **9**: 689-710
- Wolf YI, Rogozin IB, Kondrashov AS, Koonin EV (2001) Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context. *Genome Res* **11**: 356-372
- Wong FC, Beuning PJ, Nagan M, Shiba K, Musier-Forsyth K (2002) Functional role of the prokaryotic proline-tRNA synthetase insertion domain in amino acid editing. *Biochemistry* **41**: 7108-7115
- Xiao JF, Yu J (2007) A scenario on the stepwise evolution of the genetic code. *Genomics, proteomics & bioinformatics* **5**: 143-151

Bibliografía

- Xiong J (2006) Photosynthesis: what color was its origin? *Genome Biol* **7**: 245
- Xiong J, Fischer WM, Inoue K, Nakahara M, Bauer CE (2000) Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science* **289**: 1724-1730
- Yanagisawa T, Sumida T, Ishii R, Takemoto C, Yokoyama S (2010) A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 1136-1143
- Yannay-Cohen N, Carmi-Levy I, Kay G, Yang CM, Han JM, Kemeny DM, Kim S, Nechushtan H, Razin E (2009) LysRS serves as a key signaling molecule in the immune response by regulating gene expression. *Mol Cell* **34**: 603-611
- Yaremchuk A, Cusack S, Tukalo M (2000) Crystal structure of a eukaryote/archaeon-like protyl-tRNA synthetase and its complex with tRNA^{Pro}(CGG). *EMBO J* **19**: 4745-4758
- Yokobori S, Suzuki T, Watanabe K (2001) Genetic code variations in mitochondria: tRNA as a major determinant of genetic code plasticity. *J Mol Evol* **53**: 314-326
- Yuan J, Palioura S, Salazar JC, Su D, O'Donoghue P, Hohn MJ, Cardoso AM, Whitman WB, Soll D (2006) RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 18923-18927
- Zaher HS, Green R (2009a) Fidelity at the molecular level: lessons from protein synthesis. *Cell* **136**: 746-762
- Zaher HS, Green R (2009b) Quality control by the ribosome following peptide bond formation. *Nature* **457**: 161-166
- Zeng Y, Roy H, Patil PB, Ibba M, Chen S (2009) Characterization of two seryl-tRNA synthetases in albomycin-producing *Streptomyces* sp. strain ATCC 700974. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4619-4627
- Zhang K, Showalter M, Revollo J, Hsu FF, Turk J, Beverley SM (2003) Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in *Leishmania*. *EMBO J* **22**: 6016-6026
- Zhang S, Bryant DA (2011) The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science* **334**: 1551-1553
- Zhaxybayeva O, Gogarten JP, Charlebois RL, Doolittle WF, Papke RT (2006) Phylogenetic analyses of cyanobacterial genomes: quantification of horizontal gene transfer events. *Genome Res* **16**: 1099-1108
- Zheltonosova J, Melnikova E, Garber M, Reinbolt J, Kern D, Ehresmann C, Ehresmann B (1994) Threonyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*: purification and some structural and kinetic properties. *Biochimie* **76**: 71-77
- Zhou XL, Ruan ZR, Huang Q, Tan M, Wang ED (2013) Translational fidelity maintenance preventing Ser mis-incorporation at Thr codon in protein from eukaryote. *Nucleic Acids Res* **41**: 302-314