



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Glutamina sintetasas recombinantes de  
*Haloferax mediterranei*

Anna Vegara Luque



Tesis

**Doctorales**

[www.eltallerdigital.com](http://www.eltallerdigital.com)

UNIVERSIDAD de ALICANTE







Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Departamento de Agroquímica y Bioquímica

Facultad de Ciencias

## **Glutamina sintetasas recombinantes de *Haloferax mediterranei***

Anna Vegara Luque

Tesis presentada para aspirar al grado de Doctora en Biología  
por la Universidad de Alicante

Universidad de Alicante  
Programa de doctorado en Biología Experimental y Aplicada

### **Dirigida por:**

María José Bonete Pérez

Mónica Lourdes Camacho Carrasco



**DÑA. MARÍA JOSÉ BONETE PÉREZ**, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE AGROQUÍMICA Y BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE

CERTIFICA: Que la memoria adjunta titulada “Glutamina sintetasas recombinantes de *Haloferax mediterranei*” presentada por Dña. Anna Vegara Luque, se ha realizado en este Departamento bajo su dirección y de la Dra. Mónica Lourdes Camacho Carrasco. Y para que conste a los efectos oportunos expide el siguiente certificado en:



Alicante, Junio de 2017

Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Dra. María José Bonete Pérez

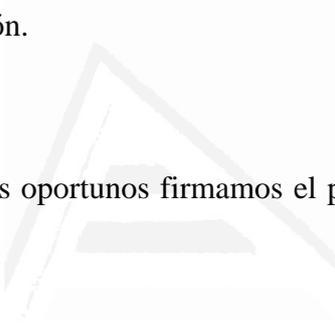


Las Dras. Dña. María José Bonete Pérez, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante, y Dña. Mónica Lourdes Camacho Carrasco, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alicante

#### CERTIFICAN

Que los trabajos conducentes a la elaboración de la presente memoria titulada “GLUTAMINA SINTETASAS RECOMBINANTES DE *Haloferax mediterranei*” presentada por Dña. ANNA VEGARA LUQUE para aspirar al grado de Doctora han sido realizados bajo nuestra dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Alicante, a 29 de Junio de 2017.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

Fdo.: María José Bonete Pérez

Fdo.: Mónica Lourdes Camacho Carrasco



La firmante de esta memoria ha disfrutado de una beca de proyecto otorgado por la Universidad de Alicante desde 2015-2017.

El presente trabajo ha sido subvencionado por el proyecto de investigación:

Adaptaciones metabólicas de haloarqueas en respuesta a diferentes condiciones nutricionales. Ministerio de Economía y Competitividad BIO2013-42921-P.

Parte de los resultados que se presentan en esta memoria han dado lugar al capítulo de libro y publicación siguientes:

Esclapez, J., Camacho, M., Pire, C., Bautista, V., **Vegara, A.**, Pedro-Roig, L., Pérez-Pomares, F., Martínez-Espinosa, R.M. y Bonete, M.J. (2016). Recent Advances in the Nitrogen Metabolism in Haloarchaea and Its Biotechnological Applications. In *Biotechnology of Extremophiles: Advances and Challenges*, pp 273-301. Rampelotto, Pabulo H (Ed.). Springer.

Esclapez, J., Pire, C., Camacho, M., Bautista, V., Martínez-Espinosa, R.M., Zafrilla, B., **Vegara, A.**, Alcaraz, L.A., Bonete, M.J. (2015). Transcriptional profiles of *Haloferax mediterranei* based on nitrogen availability. *Journal of Biotechnology*, 193, pp 100-107.



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido directa o indirectamente para que este trabajo se lleve a cabo.

En primer lugar agradecer a la Dra. María José Bonete y a la Dra. Mónica Camacho que gracias a su insistencia, me han hecho comprender que con ilusión, esfuerzo y constancia se es capaz de lograr cualquier meta en la vida por inalcanzable que ésta parezca.

A las Dras. Julia Esclapez y Vanesa Bautista por su ayuda con los experimentos de los mutantes. A la Dra. Carmen, que gracias a ella se despertó mi interés en trabajar en el laboratorio con microorganismos halófilos. A la Dra. Laia Pedro, quien me enseñó a realizar técnicas del laboratorio. A la Dra. Rosa María, por sus consejos y accesibilidad. Al Dr. Basilio Zafrilla y al Dr. Paco Pérez, con el que he disfrutado infinidad de tardes y fines de semana en horas inapropiadas en el laboratorio aprendiendo de su tenacidad. A Juan Antonio, por ser mi asesor en bombas de flujo y columnas. Al Dr. Juan Ferrer por su amabilidad y accesibilidad.

Gracias al Dr. Roque Brú por sus sabios consejos, a la Dra. Susana Selles por su amabilidad y entera disponibilidad. A Antonio y Juanjo por su amabilidad y apoyo, al Doctor Jaime Morante, la Dra. María José Esteso, el Dr. Juan Carlos, Maite, Rubén y Ricardo quienes me apoyaron desinteresadamente en mis primeros pasos científicos por los laboratorios.

A los Dres. Luis Alcaraz y Diego Amorós por su ayuda y accesibilidad en el tema de los microarrays, gracias.

A Vir, Asun y Pedro, doctores y buenos amigos, con quienes compartí el comienzo de la tesis estando siempre conmigo en los buenos y malos momentos, sois fantásticos. A la Dra. Leti, por su apoyo, amistad y transmisión de conocimientos.

A mis chicas del laboratorio Sandra, Gloria y Vero por los buenos momentos que hemos compartido en el trabajo de laboratorio y por toda la ayuda ofrecida. A Pablo por su

ayuda, apoyo y amistad. A mis “mohones” (Javi y Elías) porque siempre han sabido estar ahí, dando ayuda incondicional y ánimo en los momentos de abatimiento con cariño y generosidad. A Leo, porque pese a sus ocupaciones fue capaz de buscar un hueco para ayudarme incondicionalmente, gracias. A Irene por su amistad y ayuda incondicional.

A mis padres, hermana, y Héctor, que durante estos seis años han sido el soporte más importante para poder lograr la finalización de este proyecto.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

A mis padres, hermana y Héctor



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## RESUMEN

*Haloferax mediterranei* es un microorganismo halófilo extremo que se incluye dentro del Dominio *Archaea*. Es capaz de crecer utilizando carbohidratos, ácidos carboxílicos, alcoholes y aminoácidos como fuentes de carbono y energía. Además, puede crecer en medio definido en presencia de glucosa como única fuente de carbono, y con nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno a través de la vía de asimilación utilizando las nitrato y nitrito reductasas asimilativas. El nitrato lo utiliza reduciéndolo a amonio, el cual es incorporado a esqueletos carbonados vía glutamato deshidrogenasa (GDH) en condiciones de exceso de nitrógeno o mediante la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT) bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno.

La glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2) se encuentra en todos los Dominios, que participa en la asimilación del amonio y en la biosíntesis de glutamina, actuando como donador de nitrógeno para la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos. Esta enzima cataliza la biosíntesis de glutamina mediante la reacción biosintética dependiente de magnesio o manganeso, a partir de glutamato, ATP y amonio.

En el genoma de *Hfx. mediterranei* se localizaron tres genes que presentaron homología con glutamina sintetasa, en base a la presencia de tres dominios conservados (COG0174: transporte y metabolismo de aminoácidos; pfam00120: dominio catalítico y pfam03951: dominio beta-Grasp) que se utilizan para identificar a las GSs. También se observó que uno de los genes mantiene conservadas las tres secuencias consenso características de GSs (*glnA*), mientras que los otros dos genes (*glnA-2* y *glnA-3*) contienen parcialmente conservada una de ellas. Con el objetivo de conocer qué funciones desempeñan estas tres proteínas en la asimilación del nitrógeno, y si concretamente *glnA-2* y *glnA-3* ejercen un papel importante en este proceso, cada una de las tres proteínas halofílicas se clonó y expresó heterológamente en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, utilizando el vector de expresión pET3a, obteniéndose las proteínas en forma de cuerpos de inclusión. Cada una de estas fracciones sólidas se solubilizaron utilizando urea 8 M, y posteriormente se diluyeron en un tampón conteniendo NaCl 2 M y DTT 5 mM para conseguir su renaturalización. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación de cada una por separado mediante una única etapa a través de una cromatografía en DEAE-celulosa; obteniéndose puras cada una de las proteínas y concentradas de forma rápida y con un

buen rendimiento. La caracterización de la GS (GlnA) recombinante indicó que se trataba de una enzima dependiente de metales catiónicos divalentes, regulada por los efectores 2-oxoglutarato y glutamina. La proteína fue activada por 2-oxoglutarato e inhibida por glutamina. Mediante la técnica de velocidad de sedimentación se determinó que su estructura oligomérica consistía en 12 subunidades y se clasificó como GS tipo I, incluida en la subdivisión  $\alpha$ .

Se generaron mutantes de delección de *glnA* y *glnA-3* en *Hfx. mediterranei* mediante la técnica *pop-in pop-out*, que permitió la sustitución de una secuencia concreta del genoma por otra modificada *in vitro*. Para la obtención de los mutantes se utilizó la cepa HM26 ( $\Delta$ *pyrE2*) de *Hfx. mediterranei*. Primeramente, se construyó un *cassette* de delección para la obtención de un producto de fusión de 1000 pb (versión incompleta del gen) que se clonó en el vector pMH101N, conteniendo una copia del gen *pyrE2*, el cual se utilizó como marcador genético. Los mutantes *pop-in* se seleccionaron en un medio carente de uracilo, ya que sólo las células que codificaron el gen *pyrE2*, presente en el plásmido suicida, pudieron sintetizar *de novo* dicho compuesto y crecer. Posteriormente, el plásmido suicida se perdió y junto con él una de las copias del gen, delecionada u original (mutante *pop-out*). Finalmente se obtuvieron los mutantes de delección para los genes *glnA* y *glnA-3*, de los cuales *glnA* resultó ser un gen esencial en la asimilación de amonio y en la síntesis de glutamina, puesto que aquellos mutantes que presentaron la delección de *glnA* fueron incapaces de crecer en un medio definido carente de glutamina; se trató por tanto de mutantes auxótrofos para este aminoácido, que únicamente crecieron al adicionar glutamina en el medio de cultivo.

Finalmente, para conocer el efecto que produce la fuente de nitrógeno sobre la expresión global de los genes en *Hfx. mediterranei*, se realizó un array de expresión de la cepa R4 (silvestre) y se determinó la expresión global de genes en tres medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno: cultivo con amonio como fuente de nitrógeno en fase estacionaria y exponencial de crecimiento, cultivo con nitrato en mitad de fase exponencial de crecimiento y cultivos con carencia de nitrógeno. Las principales diferencias en expresión de genes se detectaron en los medios de nitrato y carencia de nitrógeno con respecto a amonio, los resultados sugirieron que la ausencia de amonio fue el factor responsable para la expresión de genes implicados en la ruta de asimilación de nitrato. Concretamente, en carencia de nitrógeno la GS mostró una mayor expresión que en medio

con amonio. Para analizar los cambios de expresión en los genes *glnA-2* y *glnA-3* se realizó un nuevo array de expresión de la cepa HM26-A ( $\Delta pyrE2 \Delta glnA$ ) utilizando como control la cepa parental HM26 ( $\Delta pyrE2$ ). Se determinó la expresión en dos medios de cultivo, en medio complejo suplementado con glutamina 40 mM en mitad de fase exponencial de crecimiento y en medio con carencia en nitrógeno. Tanto en la cepa HM26-A con carencia en nitrógeno como en la cepa parental HM26 se detectaron cambios de expresión en los genes relacionados con la vía asimilativa del metabolismo del nitrógeno de esta arquea halófila. En la cepa HM26 en carencia de nitrógeno con respecto a medio complejo con gln 40 mM se mostró una menor expresión de los genes *glnA-2* y *glnA-3* y una sobreexpresión de *glnA*. Mientras que en la cepa HM26-A en medio complejo con glutamina frente a la cepa HM26 en medio complejo en carencia de nitrógeno, al delecionar *glnA*, los genes *glnA-2* y *glnA-3* mostraron un incremento de expresión.

En conclusión, la glutamina sintetasa de *Hfx. mediterranei* es una enzima de tipo GSI- $\alpha$ , dodecamérica, resultando ser una proteína esencial en la asimilación de amonio y en la síntesis de glutamina; siendo activa en condiciones de deficiencia de nitrógeno, a diferencia de las isoformas GlnA-2 y GlnA-3 que podrían ejercer un papel regulador de GlnA y posiblemente actúen en la célula en condiciones de abundancia de nitrógeno.



# ÍNDICE



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>27</b>
1.1. Filogenia.....	27
1.2. Familia <i>Haloferacaceae</i> .....	33
1.3. <i>Haloferax mediterranei</i> .....	36
1.4. Ciclo del nitrógeno .....	38
1.4.1. Asimilación de nitrato .....	40
1.4.2. Asimilación de amonio.....	42
1.4.3. Desnitrificación o respiración del nitrato .....	43
1.5. Glutamina sintetasa .....	43
1.5.1. Estructura de las glutamina sintetetas .....	48
1.5.2. Regulación de la glutamina sintetasa .....	53
1.5.2.1. Regulación de la glutamina sintetasa en bacterias .....	54
1.5.2.2. Regulación de la glutamina sintetasa en cianobacterias .....	57
1.5.2.3. Regulación de la glutamina sintetasa en arqueas .....	59
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>67</b>
3.1. Microorganismos y plásmidos empleados .....	67
3.2. Purificación de glutamina sintetasa de <i>Haloferax mediterranei</i> .....	69
3.2.1. Condiciones de cultivo de <i>Hfx. mediterranei</i> .....	69
3.2.2. Obtención del extracto enzimático de la glutamina sintetasa.....	69
3.2.4. Medición de la actividad glutamina sintetasa.....	70
3.2.4.1. Actividad transferasa GS.....	70
3.2.4.2. Actividad biosintética GS.....	71
3.2.5. Purificación de la glutamina sintetasa .....	71
3.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	72
3.2.7. Western blot y <i>Dot blot</i> .....	73
3.3. Clonaje de los genes <i>glnA</i> , <i>glnA-2</i> y <i>glnA-3</i> de <i>Hfx. mediterranei</i> .....	73
3.3.1. Aislamiento del DNA genómico de <i>Hfx. mediterranei</i> .....	73
3.3.2. Medida de la concentración de DNA .....	74
3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa .....	74

3.3.4. Clonaje del gen <i>glnA</i> en pGEM y en pET3a .....	74
3.3.5. Clonaje de los genes <i>glnA-2</i> y <i>glnA-3</i> en pET3a.....	79
3.4. Expresión heteróloga de las proteínas recombinantes.....	80
3.4.1. Crecimiento e inducción de la expresión.....	81
3.4.2. Aislamiento de fracciones celulares .....	81
3.4.3. Solubilización de los cuerpos de inclusión y renaturalización de la glutamina sintetasa recombinante y de sus isoformas.....	83
3.4.4. Purificación de la glutamina sintetasa recombinante y de las isoformas GlnA-2 y GlnA-3.....	83
3.4.5. Caracterización cinética de la glutamina sintetasa recombinante y efecto de sales, temperatura, pH y efectores.....	84
3.4.5.1. Parámetros cinéticos: $K_m$ y $V_{máx}$ .....	84
3.4.5.2. Efecto de la concentración de sal y temperatura sobre la actividad enzimática .....	84
3.4.5.3. Efecto del pH sobre la actividad.....	84
3.4.5.4. Efecto de iones divalentes, 2-oxoglutarato y glutamina sobre la actividad.....	85
3.5. Propiedades moleculares y estructura cuaternaria.....	85
3.5.1. Determinación del tamaño de subunidad mediante PAGE-SDS.....	85
3.5.2. Determinación de la masa molecular mediante filtración en gel.....	85
3.5.3. Determinación de la masa molecular mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).....	86
Después, se realizó la representación del logaritmo de la masa molecular frente al $K_{av}$ para determinar el peso molecular de la proteína GS, tanto recombinante como nativa. ....	86
3.5.4. <i>Cross-linking</i> de la glutamina sintetasa.....	86
3.5.5. Determinación de la masa molecular mediante ultracentrifugación analítica (velocidad de sedimentación) y dispersión de luz dinámica (DLS).....	87
3.6. Identificación de glutaminas sintetasas mediante espectrometría de masas.....	89
3.6.1. Digestión de proteínas en gel con tripsina.....	89
3.6.2. Separación y detección de péptidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) .....	89
3.6.3. Identificación de péptidos y proteínas .....	90
3.7. Construcción de mutantes de delección de <i>glnA</i> y <i>glnA-3</i> de <i>Hfx. mediterranei</i> .....	90
3.7.1. Construcción del plásmido suicida.....	90
3.7.2. PCR de amplificación del DNA genómico .....	91
3.7.3. PCR de fusión.....	94
3.7.4. Ligación del producto de fusión en el vector pMH101N .....	95

3.7.5. Transformación de las células HM26 ( $\Delta pyrE2$ ) con el plásmido suicida .....	98
3.7.6. Cultivo de los mutantes <i>pop-in</i> en medio definido.....	98
3.7.7. Comprobación de los mutantes <i>pop-in</i> mediante PCR <i>screening</i> .....	99
3.7.8. Cultivo de los mutantes <i>pop-out</i> en medio complejo con 5-FOA.....	100
3.7.9. Comprobación de los mutantes <i>pop-out</i> mediante PCR <i>screening</i> y <i>Southern blot</i> .....	101
3.8. Caracterización fisiológica del mutante HM26-A ( $\Delta pyrE2 \Delta glnA$ ).....	103
3.9. Análisis del transcriptoma de <i>Hfx. mediterranei</i> en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno .....	104
3.9.1. Arrays de expresión.....	104
3.9.2. Validación mediante qRT-PCR.....	106
3.10. Métodos bioinformáticos.....	107
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>111</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>115</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>147</b>
ANEXO I: DESCRIPCIÓN Y SIGNIFICADO DE MARCADORES GENÉTICOS.....	147
ANEXO II: MEDIOS DE CULTIVO Y DISOLUCIONES .....	149
ANEXO III: OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS .....	153
ANEXO IV: .....	155
<b>8. ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>159</b>
<b>9. ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>163</b>
<b>10. ABREVIATURAS .....</b>	<b>167</b>



# INTRODUCCIÓN



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



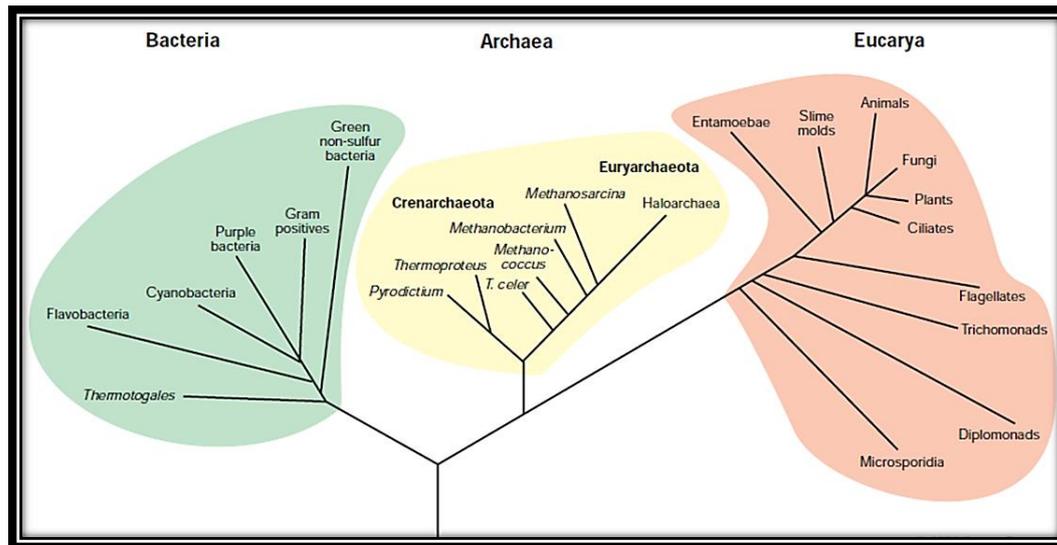
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Filogenia

Los descubrimientos realizados en la primera mitad del siglo XX determinaron que todos los seres vivos, desde microorganismos hasta organismos superiores, compartían una bioquímica parecida, indicando por lo tanto, la existencia de un ancestro común (Pace, 2009).

Desde los tiempos de Linnaeus, quien en 1735 publicó su *Systema Naturae* (Sistema natural) y organizó a los seres vivos en dos reinos, animal y vegetal, se propusieron sucesivos sistemas de clasificación que agrupaban a todos los organismos vivos dentro de dos grupos: eucariotas (células con núcleo) y procariotas (células sin núcleo). Posteriormente Woese y Fox en 1977, basándose en la comparación de fragmentos de RNA ribosómico (rRNA) 16S o 18S, propusieron que los procariotas no constituían un grupo homogéneo, sino que existían dos linajes claramente diferenciados, los cuales se denominaron eubacterias y arqueobacterias. Cada uno de estos dos grupos poseía tanta entidad como el grupo de los eucariotas.

En 1990 Woese et al. propusieron un nuevo taxón de mayor rango que el Reino, al que denominaron Dominio (Woese *et al.*, 1990). Los tres Dominios propuestos fueron: *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea* (Figura 1), que sustituyeron a eubacterias, eucariotas y arqueobacterias, respectivamente. Aunque esta clasificación de los tres Dominios es clara, existe una gran controversia sobre la relación que hay entre ellos (Forterre, 1997; Gupta, 1998; Cavalier-Smith, 2002). En base a la comparación de secuencias de rRNA, el Dominio *Archaea* parece estar más estrechamente relacionado con *Eukarya* que con *Bacteria* (Woese, 1996, 2000). De hecho, comparten muchas características a nivel molecular como son los genes eucariotas clave (incluyendo la actina y tubulina), un sistema de modificación de proteínas por ubiquitina y genes implicados en la replicación, transcripción y traducción. Sin embargo, *Archaea* y *Bacteria* también son bastante similares a nivel genómico, con genomas circulares y con genes relacionados funcionalmente organizados en operones (Forterre, 2013; Williams *et al.*, 2013).



**Figura 1:** Árbol filogenético universal basado en la comparación de secuencias de rRNA, tomado de Woese, 1996.

### Dominio Archaea

Las arqueas son especies ubicuas en el medio ambiente y contribuyen a una fracción importante de la biomasa en la tierra. Habitan algunos de los ambientes más extremos en el planeta, sobreviviendo a temperaturas de congelación en el hielo, o a más de 100 °C en las fumarolas submarinas. Viven en aguas extremadamente alcalinas, ácidas o salinas, lodos anóxicos y en depósitos de petróleo. También, son residentes habituales en la flora intestinal humana, pero en menor cantidad que las bacterias. En muchos ambientes, incluyendo el intestino humano, las arqueas viven en simbiosis con las bacterias. Sin embargo, los organismos del Dominio *Archaea* no son exclusivos de ambientes extremos, sino que también se encuentran en ambientes moderados (Huguet *et al.*, 2017; Raymann *et al.*, 2017). Además, desempeñan un papel esencial en los ciclos biogeoquímicos, especialmente en los ciclos del carbono y del nitrógeno, e influyen en las emisiones de gases de efecto invernadero. También, llevan a cabo dos metabolismos esenciales en el ciclo global de nutrientes, la metanogénesis y la oxidación anaerobia del metano dependiente de sulfato. Además, presentan un tercer metabolismo de importancia global, la oxidación aeróbica del amonio, llevada a cabo por arqueas y bacterias, ambas oxidantes de amonio, que oxidan el mismo a nitrito (Offre *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017).

Las arqueas, miembros del tercer Dominio de la vida, presentan propiedades fisiológicas únicas. En este Dominio se destacan las siguientes características: presentan

membranas lipídicas que contienen cadenas laterales isoprenoide con enlaces éter, en contraste con los hidrocarburos con enlaces éster de todos los demás sistemas biológicos. Carecen en todos los casos del ácido murámico (peptidoglicano) como constituyente de la pared celular. Poseen una morfología típica, como las formas poligonales que tienen algunas arqueas halófilas o los cocos extremadamente irregulares que presentan algunos hipertermófilos. No catabolizan la glucosa mediante glucólisis, sino que emplean una vía metabólica de oxidación simple y por último, su maquinaria fundamental de transcripción es muy similar a la que poseen los organismos pertenecientes al Dominio *Eukarya* (Bullock, 2000; Forterre *et al.*, 2002).

Por otro lado, las proteínas de arqueas y un amplio rango de enzimas se utilizan en procesos biotecnológicos debido a su estabilidad y capacidad de funcionar en condiciones extremas en las que otras proteínas se degradarían. Además, las arqueas pueden producir una amplia gama de pequeños péptidos (como las arqueocinas) y nuevos metabolitos secundarios, como los supuestamente implicados en la comunicación celular (acil homoserina lactonas), que podrían ser de considerable interés en biotecnología. Debido a la amplia gama de metabolitos producidos por las arqueas, hay un gran potencial biotecnológico de antimicrobianos, como las dicetopiperazinas y arqueocinas, nombradas anteriormente, y también presentan funciones en la industria cosmética y alimentaria (Charlesworth y Burns, 2015).

Conforme a las comparaciones de rRNA 16S el Dominio *Archaea* se divide principalmente en dos *phyla* (Woese *et al.*, 1990):

- *Phylum Crenarchaeota*: comprende a los microorganismos que se han denominado hipertermófilos y termoacidófilos. Algunos géneros son *Sulfolobus*, *Desulfurococcus*, *Pyrodictium*, *Thermoproteus* y *Thermofilum*. También se incluyen en este *phylum* varios grupos de microorganismos mesofílicos, y probablemente, psicrófilos que se han detectado mediante PCR en diversos ambientes, (Forterre *et al.*, 2002). En este *phylum* se supone que se encuentra el fenotipo del ancestro del Dominio *Archaea* (Cavalier-Smith, 2002).
- *Phylum Euryarchaeota*: abarca un amplio rango ecológico, comprendiendo microorganismos hipertermófilos, como por ejemplo los géneros *Pyrococcus* y

*Thermococcus*, metanógenos como el género *Methanosarcina*, halófilos como por ejemplo los géneros *Haloferax*, *Halobacterium* y *Halococcus* e incluso metanógenos termofílicos como los géneros *Methanococcus*, *Methanothermus* y *Methanobacterium* (Brown y Doolittle, 1997).

Gracias a la amplificación por PCR de secuencias de rRNA 16S procedentes de organismos no aislados, se han detectado nuevas especies de arqueas que no se encuadran dentro de los dos *phyla* propuestos, y que parecen estar más cercanas al Dominio *Eukarya*. Estas secuencias se clasifican provisionalmente en otro *phylum* dentro del Dominio *Archaea* denominado ***Korarchaeota***. De hecho, pueden haber divergido antes que los *phyla* *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* (Barns *et al.*, 1996; Elkins *et al.*, 2008)

Después se propuso un cuarto *phylum*, ***Nanoarchaeota***, representado únicamente por la especie *Nanoarchaeum equitans*, un microorganismo simbiote hipertermófilo que se ha encontrado en chimeneas submarinas (Huber *et al.*, 2002).

También se propusieron dos *phyla*: ***Micrarchaeota*** que engloba arqueas acidófilas (pH 0.5-1.5) de pequeño tamaño (< 0.45 µm de diámetro) con morfología celular pleomórfica asociadas a biofilms (Baker *et al.*, 2006). Y el *phylum* ***Parvarchaeota***, el cual incluye microorganismos de pequeño tamaño (< 500 nm de diámetro) encontrados en diversos ecosistemas ácidos (Baker *et al.*, 2010).

En el año 2008 se propuso un nuevo *phylum* denominado ***Thaumarchaeota***, que comprende a *Cenarchaeum symbiosum* y otras arqueas mesofílicas relacionadas con esta especie que hasta el momento se incluían en el *phylum* *Crenarchaeota* (Brochier-Armanet *et al.*, 2008a). Esta nueva clasificación se realizó en base a la presencia de la topoisomerasa IB (Topo IB), específica hasta la fecha de eucariotas, y a la ausencia de la topoisomerasa IA (Topo IA) (Brochier-Armanet *et al.*, 2008b). En el genoma de la especie *Nitrosopumilus maritimus* se encontró esta Topo IB, pudiéndose clasificar también en este *phylum*. Los análisis filogenéticos sugieren que la Topo IB estuvo presente en el ancestro común de los Dominios *Archaea* y *Eukarya*.

En el año 2011 mediante avances de la metagenómica, se propone otro *phylum* denominado ***Aigarchaeota*** al encontrar la especie *Caldiarchoaeum subterraneum*, una *Crenarchaeota* con características genómicas únicas. Contiene una ruta de degradación de

proteínas utilizando un sistema conjugado de ubiquitina (rasgo que se creía que era inherente a *Eucarya*), pequeñas proteínas con dedos de zinc que presenta motivos estructurales específicos del sistema eucariota y además contiene la Topo IB (Nunoura *et al.*, 2011).

En el año 2012 se propuso el *phylum Nanohaloarchaeota*, que incluye microorganismos de ambientes hipersalinos con características distintivas a otras arqueas halófilas en cuanto a la composición de aminoácidos, vías metabólicas y un menor tamaño celular (Narasingarao *et al.*, 2012).

El *phylum Aenigmarchaeota* se sugirió en 2013, y está representado por secuencias de arqueas no cultivadas procedentes de aguas de ambientes geotermales (Takai *et al.*, 2001; Rinke *et al.*, 2013). También se propuso el *phylum Diapherotrites*, que incluye genomas recuperados de aguas subterráneas en una mina de oro abandonada, donde *Iainarchaeum andersonii* es su único representante (Youssef *et al.*, 2015).

Además, se propuso otro nuevo *phylum*, *Geoarchaeota*, que incluye a arqueas termófilas procedentes de ambientes geotermales localizadas en matrices de óxido de hierro (Kozubal *et al.*, 2012, 2013).

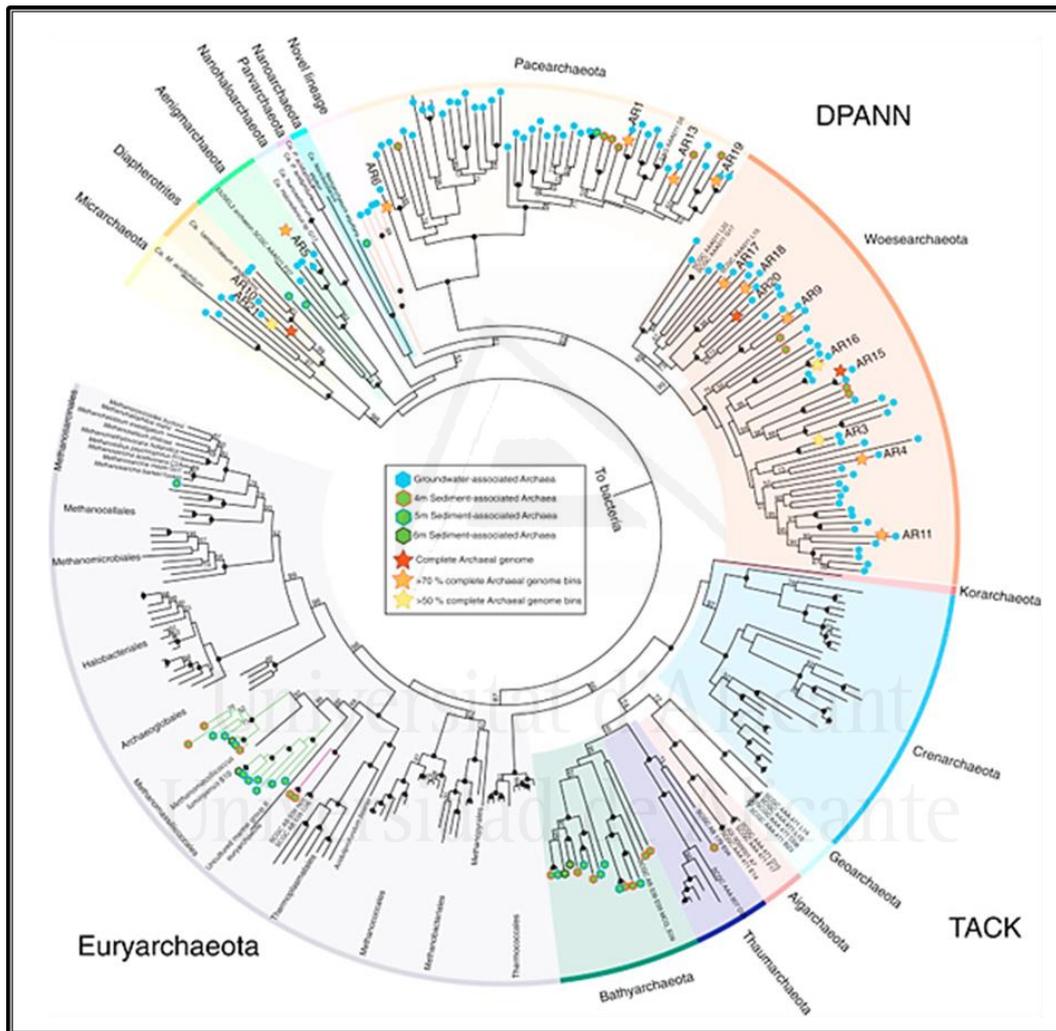
De acuerdo a análisis filogenéticos del rRNA, proteínas ribosómicas y genes Topo IB, en el año 2014 se propuso un nuevo *phylum*, *Bathyarchaeota*, que abarca un grupo de diversos microorganismos procedentes de sedimentos marinos y de agua dulce, que permite analizar los eventos de diversificación para la transición entre estos ambientes. Este grupo de microorganismos está implicado en la degradación de compuestos aromáticos y en la remineralización de sedimentos marinos anóxicos (Meng *et al.*, 2014; Fillol *et al.*, 2016).

En 2015 se propusieron dos nuevos *phyla*: *Woesearchaeota* y *Pacearchaeota*, que incluyen arqueas no cultivadas procedentes de sedimentos de acuífero y hábitats salinos, probablemente simbióticas (Castelle *et al.*, 2015). Ambos *phyla* presentan una gran abundancia en aguas superficiales de lagos oligotróficos a altitudes elevadas (Ortiz-Alvarez y Casamayor, 2016).

Entre el año 2015 y 2016 se descubrieron otros dos nuevos *phyla*; por un lado, *Lokiarchaeota*, del cual se ha identificado y caracterizado su genoma procedente de

fuentes hidrotermales a 3283 metros de profundidad, que forma un grupo monofilético con el Dominio *Eukarya* (Spang *et al.*, 2015). Por otro lado, *Thorarchaeota*, que incluye a arqueas no cultivadas de sedimentos de estuarios, las cuales parecen desempeñar un papel fundamental en el ciclo anaeróbico del nitrógeno y del azufre (Seitz *et al.*, 2016).

Por tanto, en la actualidad, el número de *phyla* de este Dominio se resume en la Figura 2 (Castelle *et al.*, 2015).



**Figura 2:** Árbol filogenético de los *phyla* del Dominio Archaea, tomado de Castelle *et al.*, 2015.

## 1.2. Familia *Haloferacaceae*

Esta familia se clasifica filogenéticamente dentro del *phylum Euryarchaeota*. Los microorganismos que la comprenden presentan una estricta dependencia por elevadas concentraciones de sal para su crecimiento y estabilidad estructural, por esta razón se consideran halófilos (Oren, 2002). Dichos halófilos se encuentran en los tres Dominios de vida: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*. Además, la familia *Haloferacaceae* pertenece, junto con *Halorubraceae*, al orden *Haloferacales* (Gupta *et al.*, 2016). Según las bases de datos, la familia *Haloferacaceae* comprende en la actualidad (abril 2017) ocho géneros, entre los que se encuentra el género *Haloprofundus* recientemente descrito (Zhang *et al.*, 2017).

Los microorganismos que se incluyen en esta familia habitan en ambientes de elevada salinidad, concretamente en salinas y lagos hipersalinos, como por ejemplo en el Mar Muerto y Gran Lago Salado. Además, existen morfologías diversas como cocos, bacilos, formas cuadradas o rectangulares. Presentan pH óptimo en un rango neutro y muestran un crecimiento heterotrófico y quimioorganotrófico. Algunos miembros de esta familia presentan motilidad y contienen vesículas de gas (Gupta *et al.*, 2015). Los representantes de esta familia son halófilos obligados y la concentración de NaCl media óptima de crecimiento se sitúa entre 2 y 4.5 M según las especies. Su temperatura óptima de crecimiento es en torno a 40-45 °C, pero pueden crecer a 60 °C (*Haloterrigena thermotolerans*) (Montalvo-Rodríguez *et al.*, 2000).

Las arqueas halófilas son esencialmente heterótrofas aerobias. Realizan la degradación de los compuestos carbonados mediante el ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT) y la cadena transportadora de electrones, en combinación con el ciclo del glioxilato (Serrano *et al.*, 1998), reacciones de la vía Embden-Meyerhof y de la vía modificada de Entner-Doudoroff (Danson, 1989; Bonete *et al.*, 1996; Oren, 2002). Muchas de estas especies crecen en medio definido con un sólo compuesto orgánico como fuente de carbono, como es el caso de *Hfx. mediterranei* que crece en medio definido suplementado con glucosa (Rodríguez-Valera *et al.*, 1980a). Como estas especies habitan en medios hipersalinos con altas temperaturas, la solubilidad del oxígeno es muy baja transformándose en un factor limitante. Para soportar estas condiciones, algunas especies presentan diferentes estrategias para sobrevivir. Por ejemplo, *Haloferax mediterranei* y *Halobacterium salinarum* (*H. salinarum*) producen vesículas de gas que les permiten flotar

en la columna de agua salada y desplazarse hasta la superficie de la salmuera. Esta estrategia está controlada por las proteínas reguladoras GvpE y GvpD, y además está influenciada por factores medioambientales en el caso de *Hfx. mediterranei* (Scheuch *et al.*, 2008).

Las arqueas halófilas y los organismos de este Dominio, a semejanza con el Dominio *Bacteria*, contienen un cromosoma circular con un tamaño de 2000 a 3000 kilobases (kb). Además, poseen varios plásmidos denominados megaplásmidos o minicromosomas (Ng *et al.*, 1998). Dichos plásmidos contienen abundantes secuencias de inserción, que son secuencias de DNA que contienen información únicamente para promover su propia inserción en otros lugares del genoma. En halófilos se han secuenciado varios de estos elementos, generalmente son secuencias ricas en pares de nucleótidos AT, y presentan un tamaño entre 0.5 y 2 kb (Brügger *et al.*, 2002). Debido a que existe un número alto de secuencias de inserción en el genoma de estos microorganismos, éstos muestran tasas de mutación espontánea muy elevadas, pudiendo alcanzar valores entre  $10^{-2}$ - $10^{-4}$ .

Respecto a la organización del genoma, los halófilos contienen genes agrupados en operones que se transcriben en mRNA policistrónicos. El mecanismo básico de transcripción muestra una gran similitud con el de *Eukarya*, pero más sencillo, ya que intervienen menos factores de transcripción (Bell y Jackson, 1998).

### **Adaptaciones halofílicas al medio**

Los halófilos, para combatir las altas concentraciones de sal, han desarrollado dos estrategias metabólicas con el fin de mantener fuera de las células el NaCl: la primera la utilizan principalmente arqueas halófilas extremas, y consiste en acumular KCl a concentraciones equivalentes a las de cloruro sódico en el medio extracelular. La segunda estrategia la emplean la mayoría de bacterias halófilas y *Eukarya*, y consiste en mantener bajas concentraciones de sal intracelulares mediante la acumulación de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, también conocidos como osmolitos o solutos compatibles (Quillaguamán *et al.*, 2010). Los osmolitos pueden ser: aminoácidos, derivados de aminoácidos, azúcares, derivados de azúcar (sacarosa, trehalosa, glucosilglicerol), polioles como el glicerol y arabitol, y aminas cuaternarias como la glicina betaína, que no interfieran significativamente con el metabolismo normal de las células

(Oren, 1999). Además, ayudan a mantener la presión de turgencia, el volumen celular y la concentración de electrolitos en las mismas.

Respecto a las proteínas, la presencia de elevadas concentraciones de sal favorece la formación de interacciones hidrofóbicas, causando la agregación de aquellas y otras macromoléculas. En las arqueas halófilas extremas todas las enzimas y componentes celulares estructurales tienen que adaptarse a la presencia de altas concentraciones de sal para asegurar el funcionamiento adecuado de la maquinaria enzimática intracelular (Oren, 1999). Tales adaptaciones hacen que estos microorganismos muestren una estricta dependencia por la presencia de elevadas concentraciones de sal con el fin de mantener su integridad estructural y viabilidad (Lanyi, 1974; Eisenberg, 1995).

La inmensa mayoría de las enzimas de los halófilos extremos requieren entre 2 y 4 M de cloruro sódico para alcanzar su máxima actividad, desnaturalizándose a concentraciones de sal inferiores a 1 M (Lanyi, 1974). Las proteínas halofílicas presentan una superficie muy ácida y una reducción del número de residuos hidrofóbicos, particularmente, los aromáticos (Zhang *et al.*, 2013). Contienen un aumento de residuos ácidos (Asp y Glu), un bajo contenido de residuos básicos (Lys y Arg), un incremento de los residuos hidrofóbicos (Gly, Ala y Val) y una disminución de los residuos alifáticos (Ile, Leu) (Lanyi, 1974; Madern *et al.*, 1995). Se conocen ejemplos de proteínas en diferentes especies que presentan un número relativamente elevado de aminoácidos negativamente cargados en sus proteínas, como NADP-isocitrato deshidrogenasa de *Haloferax volcanii* (*Hfx. volcanii*) (Camacho *et al.*, 1995), NADP-glutamato deshidrogenasa (Ferrer *et al.*, 1996), nitrito reductasa asimilativa (Martínez-Espinosa *et al.*, 2001a) glucosa deshidrogenasa (Pire *et al.*, 2001), y ciclodextrin glucanotransferasa (Bautista, 2010) todas ellas de *Hfx. mediterranei*. También, las  $\alpha$ -amilasas de *Haloarcula marismortui* (Zorgani *et al.*, 2014), la xilanasa de *Planococcus* sp. SL4 (Huang *et al.*, 2015), la proteasa de *Halobacterium* sp. cepa LBU5030 (Chuprom *et al.*, 2016). Una posible explicación de esta abundancia de aminoácidos ácidos puede ser que una superficie de proteína cargada negativamente mejora su capacidad para competir con iones por las moléculas de agua y, por lo tanto, solubiliza preferentemente la proteína. Esta hipótesis se apoya por las observaciones de estructuras cristalinas de las proteínas halófilas que incluyen moléculas de agua unidas a la superficie de residuos ácidos (Edbeib *et al.*, 2016). Además, análisis bioinformáticos de secuencias de proteínas halófilas revelan que las proteínas contienen

considerablemente menos residuos polares, por ejemplo serinas, debido a que tales residuos no proporcionan protección contra la deshidratación en entornos de alta salinidad (Zhang y Ge, 2013).

### 1.3. *Haloferax mediterranei*

*Haloferax mediterranei* se aisló por primera vez en las aguas de las salinas de Santa Pola (Alicante, España). En 1983, Rodríguez-Valera la describió inicialmente como *Halobacterium mediterranei*. Posteriormente se propuso una clasificación nueva de este microorganismo junto con *Halobacterium volcanii* y *Halobacterium denitrificans* para formar el nuevo género *Haloferax* (Torreblanca *et al.*, 1986).

Dicho microorganismo pertenece al Dominio *Archaea*, clasificado dentro del *phylum Euryarchaeota*. Se sitúa en la clase *Halobacteria*, que representa uno de los grupos más grandes dentro del Dominio, y se incluye dentro de la familia *Haloferacaceae*, perteneciendo al orden *Haloferacales* (Gupta *et al.*, 2015, 2016).

*Hfx. mediterranei* muestra una amplia variedad morfológica, siendo el bacilo la forma predominante, y su tinción es Gram (-). Presenta un tamaño entre 0.5 y 2  $\mu\text{m}$  y una débil movilidad durante la fase exponencial de crecimiento, y son capaces de formar vacuolas de gas (Pfeifer *et al.*, 1997). Muestra un crecimiento óptimo a concentraciones de NaCl entre un 20-25 % y tiene una elevada dependencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (0.5-1.5 M) para su crecimiento. Comparada con otras arqueas halófilas, como las especies del género *Halobacterium* y *Halococcus*, la concentración de sal óptima y mínima que requiere para crecer es menor, por esta razón se dice que es una arquea halófila (Martínez-Espinosa *et al.*, 2003; Bautista, 2010). El pH óptimo de crecimiento de esta arquea es de 6.5 y presenta un cierto carácter termofílico con una temperatura óptima de 51 °C (Bowers y Wiegel, 2011).

Su metabolismo es quimioheterótrofo, utilizando carbohidratos, ácidos carboxílicos, alcoholes y aminoácidos como fuentes de carbono y energía. Además, puede crecer en medio definido en presencia de glucosa como única fuente de carbono, mediante la vía modificada de Entner-Doudoroff (Danson, 1989; Bonete *et al.*, 1996); y con nitrato o nitrito como única fuente de nitrógeno a través de la vía de asimilación utilizando las

nitrate y nitrite reductases asimilativas (Martínez-Espinosa *et al.*, 2001a, 2001b). También es capaz de crecer en condiciones microaerófilas empleando el nitrato como aceptor final de la cadena de transporte de electrones (Alvarez-Ossorio *et al.*, 1992).

*Hfx. mediterranei* produce carotenoides a elevadas concentraciones, pudiéndose utilizar como fuente natural aprovechable en procesos de bioingeniería en biorreactores (Rodrigo-Baños *et al.*, 2015). Además, esta especie sobrevive a concentraciones de sal menores del 5 %, produciéndose un aumento en la síntesis de bacteriorrubberinas a medida que disminuye la concentración de sal en el medio (D'Souza *et al.*, 1997).

La organización de su genoma se determinó mediante el uso de electroforesis de campo pulsado (PFGE) y el análisis de patrones de restricción obtenidos con varias endonucleasas. Estas técnicas revelaron la presencia de un cromosoma circular de 2.9 Mpb y tres plásmidos de 490, 320 y 130 kb (Lopez-García *et al.*, 1992). La secuencia del genoma completo se incluyó en GenBank en Mayo de 2012: CP001868.1 (cromosoma), NC\_017942.1 (pHM100), NC\_017943.1 (pHM300) y NC\_017944.1 (pHM500) (Han *et al.*, 2012).

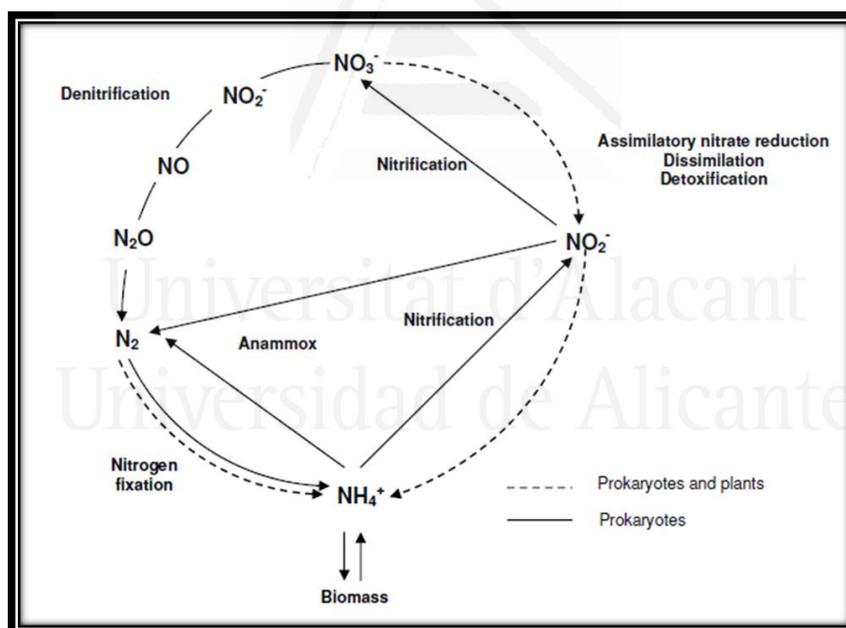
Esta arquea es poliploide conteniendo más de 10 copias de su genoma. La regulación del número de copias del genoma depende de la fase de crecimiento, mostrando un menor número de copias en la fase estacionaria (Soppa, 2013). La poliploidía supone una serie de ventajas en haloarqueas, entre las que destacan: la redundancia génica, menor tasa de mutación, resistencia a la radiación y desecación, supervivencia a largo plazo, conversión génica y DNA como polímero de almacenamiento de fosfato (Soppa, 2011, 2013).

Esta arquea halófila es interesante para el campo de la biotecnología ya que, por un lado, acumula grandes cantidades de polihidroxialcanoato (PHA), un copolímero de  $\beta$ -hidroxibutirato y  $\beta$ -hidroxivalerato, que se emplea para la producción de plásticos biodegradables y biocompatibles. Por otro lado, produce exopolisacáridos (Antón *et al.*, 1988) que pueden emplearse como agentes gelatinizantes, emulsionantes o espesantes (Oren, 2002). Además, la producción de compuestos químicos como pesticidas, herbicidas, y tintes generan mezclas complejas de sales y nitratos (Bonete *et al.*, 2008), por lo que es posible emplear la capacidad metabólica de *Hfx. mediterranei* en procesos biotecnológicos

como, por ejemplo, biorremediación y tratamiento de aguas residuales (Nájera-Fernández *et al.*, 2012).

### 1.4. Ciclo del nitrógeno

El ciclo del nitrógeno representa uno de los ciclos de nutrientes más importantes que se encuentran en los ecosistemas terrestres. El nitrógeno es un elemento principal en todos los organismos vivos. Este elemento puede encontrarse en la naturaleza en diferentes estados de oxidación, desde +5 (nitrato) hasta -3 (amonio). Es un componente de las proteínas y los ácidos nucleicos en donde se encuentra en la forma más reducida. Las reacciones del ciclo del nitrógeno (Figura 3) posibilitan las interconversiones de los compuestos de nitrógeno mediante procesos de oxidación y reducción, en los que los procariotas juegan un papel fundamental fundamental (Richardson y Watmough, 1999; Bonete *et al.*, 2008).



**Figura 3:** Reacciones redox del ciclo del nitrógeno. Tomado de (Bonete *et al.*, 2008).

La reducción del nitrato se puede realizar con tres propósitos diferentes (Moreno-Vivián *et al.*, 1999):

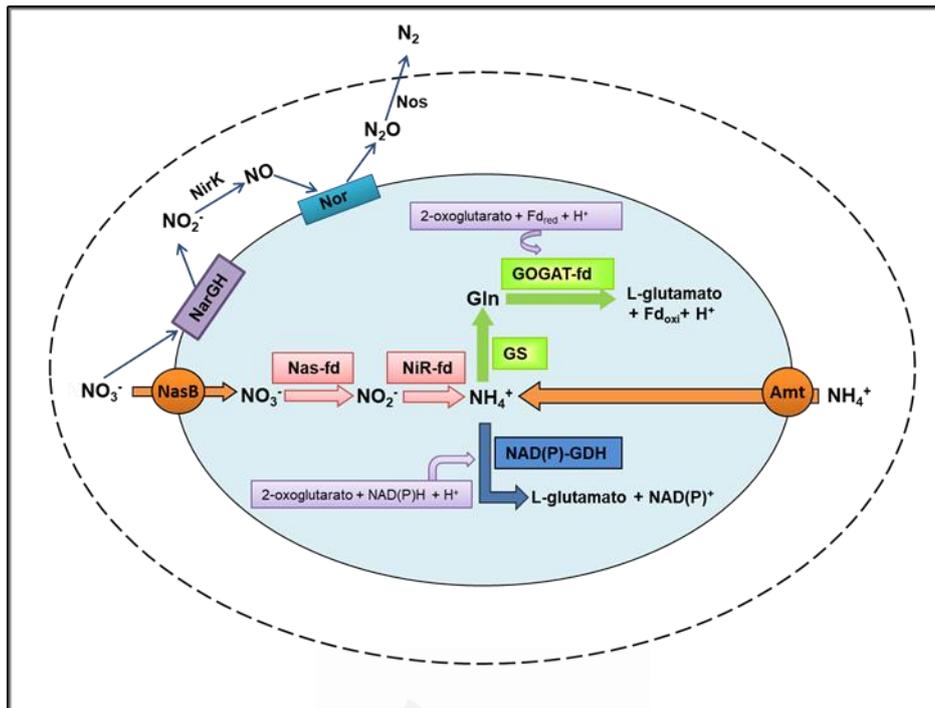
- **Asimilación del nitrato:** esta ruta la realizan procariontas y eucariotas. El  $\text{NO}_3^-$  se utiliza como fuente de nitrógeno para el crecimiento celular. En esta vía, el  $\text{NO}_3^-$  se reduce a  $\text{NO}_2^-$ , y éste es reducido a  $\text{NH}_4^+$  (Guerrero *et al.*, 1981).
- **Respiración del nitrato:** esta vía se lleva a cabo en anaerobiosis. El  $\text{NO}_3^-$  es el aceptor terminal de electrones reduciéndose a  $\text{NO}_2^-$  y óxidos de nitrógeno ( $\text{NO}$  y  $\text{N}_2\text{O}$ ) para generar energía metabólica (Moura *et al.*, 1997).
- **Disimilación del nitrato:** el  $\text{NO}_3^-$  se utiliza como aceptor de electrones para disipar el exceso de poder reductor (Moreno-Vivián *et al.*, 1999).

Las reacciones asimilativas del ciclo del nitrógeno incluyen: la **fijación de nitrógeno** (conversión de  $\text{N}_2$  en amonio por bacterias simbióticas o de vida libre) (Newton, 2007) y la **reducción asimilativa de nitrato** (la reducción de nitrato a amonio). Ambas vías producen amonio que se incorpora a los esqueletos de carbono para producir aminoácidos para el crecimiento. Aparte de la reducción respiratoria del nitrato al amonio, realizado por bacterias anaeróbicas fermentativas, existen dos procesos principales de generación de energía: la **nitrificación** (desempeñada por bacterias que viven en el suelo y otras bacterias nitrificantes que oxidan el amonio a nitrato) (Ferguson *et al.*, 2007); y la **desnitrificación** (realizada por microorganismos anaerobios o anaerobios facultativos que reducen el nitrato a  $\text{N}_2$  u otros gases nitrogenados en condiciones anaeróbicas) (van Spanning *et al.*, 2007).

Para completar el ciclo global del nitrógeno, se llevan a cabo dos vías más: **amonificación** (diversas bacterias y hongos degradan la materia orgánica, liberando el nitrógeno fijado para su reutilización por otros organismos, por ejemplo, en algunas enterobacterias el nitrito se reduce a amonio para excretarse posteriormente), y **anammox** (oxidación anaeróbica del amonio que produce  $\text{N}_2$  mediante la reducción de nitrito y oxidando al amonio; este proceso se realiza por comunidades bacterianas de planctomicetos con importancia biológica en ambientes marinos (Cabello *et al.*, 2004; Jetten *et al.*, 2009; Martínez-Espinosa *et al.*, 2011).

### 1.4.1. Asimilación de nitrato

La asimilación de nitrato es uno de los principales procesos del ciclo del nitrógeno que permite el uso de  $\text{NO}_3^-$  como fuente de nitrógeno para el crecimiento (Cabello *et al.*, 2004; Tischner y Kaiser 2007). En *Hfx. mediterranei*, en la reducción asimilativa del nitrato, en primer lugar éste se incorpora a las células mediante transportadores de alta afinidad (NasB) (Figura 4) y después, se reduce a amonio mediante dos reacciones de reducción secuenciales catalizadas por la nitrato reductasa asimilativa (Nas) y la nitrito reductasa asimilativa (NiR), ambas dependientes de ferredoxina (Bonete *et al.*, 2008). A continuación, el amonio producido se incorpora a esqueletos carbonados por la ruta glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS-GOGAT) o vía glutamato deshidrogenasa (GDH). Si el amonio está disponible para la célula en grandes cantidades, es asimilado vía GDH, mientras que la vía GS-GOGAT es operativa cuando la concentración intracelular de amonio es baja (Hochman *et al.*, 1988). La ruta GS-GOGAT es importante porque permite la asimilación de amonio en L-glutamato a bajas concentraciones de amonio intracelulares, sustituyendo eficazmente la reacción biosintética de glutamato (vía GDH) en estas condiciones.



**Figura 4:** Metabolismo del nitrógeno en *Hfx. mediterranei*. Se muestra la reducción asimilativa y la respiración anaeróbica ambas de nitrato en la que intervienen las siguientes proteínas: NasB: transportador de nitrato; Amt: transportador de amonio; GS: glutamina sintetasa; GOGAT-fd: glutamato sintasa dependiente de ferredoxina; NAD(P)-GDH: NAD(P)-glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD(P); Nas-fd: nitrato reductasa asimilativa dependiente de ferredoxina; NiR: nitrito reductasa asimilativa dependiente de ferredoxina; NarGH: nitrato reductasa respiratoria; NirK: nitrito reductasa respiratoria. Nor: óxido nítrico reductasa; Nos: óxido nitroso reductasa. Línea discontinua: capa S. Modificada de Bonete *et al.*, 2008.

El amonio ejerce un efecto inhibitor en la asimilación de nitrato de las actividades de las enzimas asimilativas Nas y NiR. Este efecto del amonio se describió muchos años antes en bacterias y cianobacterias (Flores *et al.*, 1983). En *Hfx. mediterranei* el amonio reprime la expresión del operon *nas* e inhibe la ruta de asimilación de nitrato, mientras que el nitrato es un inductor de la expresión de los mismos. Por esta razón, en presencia de las sales nitrato de amonio o nitrito de amonio, preferiblemente se consumiría el amonio (Bonete *et al.*, 2008).

### 1.4.2. Asimilación de amonio

Cuando el amonio es la fuente de nitrógeno para el crecimiento, primeramente, éste atraviesa las membranas celulares mediante transportadores de amonio (Amt), que son proteínas integrales de membrana que permiten la captación de amonio y metilamonio en las células. La GS-GOGAT y la GDH (Figura 4) son las principales rutas de asimilación de amonio en diversos microorganismos incluyendo *Hfx. mediterranei*. La vía GS-GOGAT requiere ATP, pero tiene una alta afinidad por el amonio, mientras que la GDH no consume ATP pero es menos efectiva en condiciones con déficit de nitrógeno. Estas enzimas se encuentran en los tres Dominios de vida (Bonete *et al.*, 2008). La GS desempeña un doble papel proporcionando glutamina para la biosíntesis de aminoácidos y asimilando amonio en colaboración con la glutamato sintasa. En *Hfx. mediterranei* la GS permite la asimilación del amonio producido por la nitrito reductasa asimilativa a bajas concentraciones de amonio intracelular, mientras que la proteína GDH se encarga de asimilar el amonio en presencia de altas concentraciones del mismo. Por otro lado, la GDH juega un papel clave, ya que transforma el 2-oxoglutarato en L-glutamato de manera reversible actuando como nexo de unión entre el ciclo del carbono y el metabolismo del nitrógeno. En condiciones de carencia de nitrógeno, la GS produce glutamina a partir de glutamato y amonio, y la glutamina se transforma a glutamato mediante la proteína GOGAT. Por tanto, en condiciones de bajas concentraciones de amonio, la ruta GS-GOGAT es la utilizada para la asimilación de dicho amonio (Hochman *et al.*, 1988). Esto se debe a que la GS presenta una  $K_m$  para el sustrato amonio mucho más pequeña que la GDH (Bonete *et al.*, 2008). Tras la secuenciación del genoma de *Hfx. mediterranei* se han identificado al menos cuatro genes (tres genómicos y uno insertado en uno de los megaplásmidos) con una alta homología para las NAD(P)-GDHs. Se han aislado y caracterizado dos de las cuatro posibles enzimas. Una de ellas es NADPH dependiente, con una  $K_m$  de 4.2 mM para  $\text{NH}_4^+$  (Ferrer *et al.*, 1996). La otra enzima caracterizada mostró una clara dependencia por NADH, y tras expresarla heterológamente se observó que la reacción que cataliza está completamente desplazada hacia la aminación reductiva con una  $K_m$  para  $\text{NH}_4^+$  próxima a 50 mM (Díaz *et al.*, 2006).

### 1.4.3. Desnitrificación o respiración del nitrato

La desnitrificación se produce en muchos ambientes, incluyendo suelos, océanos y aguas dulces, y generalmente se realiza por microorganismos anaerobios facultativos que crecen bajo condiciones microaerófilas o anóxicas (Zumft, 1997). En esta ruta, el  $\text{NO}_3^-$  se utiliza como aceptor terminal de electrones de una cadena respiratoria con el fin de obtener energía (Jormakka *et al.*, 2004). La desnitrificación o respiración de nitrato consiste en la producción biológica de los gases NO (óxido nítrico),  $\text{N}_2\text{O}$  (óxido nitroso) y  $\text{N}_2$  a partir de nitrato en condiciones anaeróbicas o de microaerofilia. En este proceso, el nitrato se reduce a  $\text{N}_2$  mediante las reacciones catalizadas por la nitrato reductasa respiratoria (NarGH), nitrito reductasa respiratoria (NirK), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos). En general, los organismos capaces de realizar la desnitrificación se clasifican como desnitrificantes completos o incompletos: en los primeros, el nitrato se reduce completamente a nitrógeno molecular, mientras que en los segundos, el nitrato se reduce parcialmente a NO o  $\text{N}_2\text{O}$  (Torregrosa-Crespo *et al.*, 2016).

Los gases producidos en estas reacciones, concretamente el  $\text{N}_2\text{O}$  y NO, causan un gran impacto en la atmósfera, destruyen la capa de ozono y además, el óxido nitroso es un gas de efecto invernadero más potente que el  $\text{CO}_2$ , contribuyendo al calentamiento global del planeta (Ravishankara *et al.*, 2009; Thomson *et al.*, 2012). En *Hfx. mediterranei*, estudios de RT-PCR también han demostrado que la presencia de  $\text{NO}_3^-$  incrementa los niveles de transcripción del operón que contiene la NarGH aunque parece que son las condiciones anóxicas o de microaerofilia las que desencadenan totalmente la vía respiratoria (Lledó *et al.*, 2004).

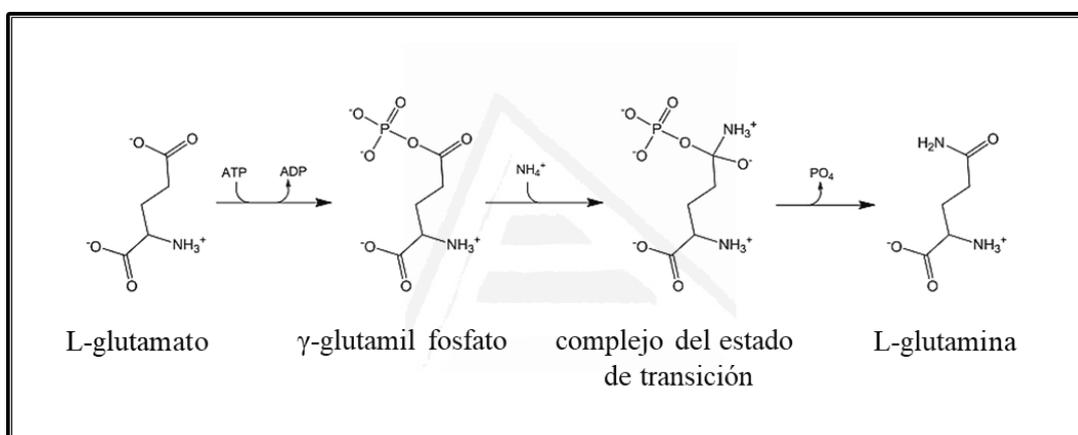
### 1.5. Glutamina sintetasa

La glutamina sintetasa (GS; EC 6.3.1.2) es una enzima esencial en la asimilación del amonio y en la biosíntesis de glutamina. Dicho aminoácido actúa como donador de nitrógeno para la biosíntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas y aminoazúcares (Robinson *et al.*, 2001). Presenta una alta afinidad por el amonio y es capaz de incorporarlo a compuestos orgánicos. Esta enzima cataliza la biosíntesis de glutamina mediante la reacción biosintética (1) en la que el metal ( $\text{Me}^{2+}$ ) puede ser magnesio o manganeso.

Esta reacción que cataliza la GS se considera la más relevante fisiológicamente (Eisenberg *et al.*, 2000).



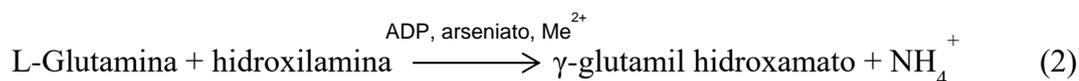
Como se muestra en la Figura 5, la biosíntesis de glutamina implica la formación inicial de  $\gamma$ -glutamil fosfato a partir de ATP y glutamato. El segundo paso consiste en la formación del estado de transición a partir de un ataque nucleofílico producido por el amonio sobre  $\gamma$ -glutamil fosfato. Finalmente, la posterior liberación del fosfato conlleva la formación de L-glutamina.



**Figura 5:** Mecanismo de reacción de la enzima glutamina sintetasa, tomado de (Wray y Fisher, 2010).

Además, si la hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) se sustituye por el amonio en la reacción (1), el producto L-glutamina se sustituye por  $\gamma$ -glutamil hidroxamato (Eisenberg *et al.*, 2000).

La GS también cataliza la reacción transferasa (2) con la producción de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato y amonio libre (Shapiro y Stadtman, 1970):



En esta reacción la hidroxilamina y la glutamina, en presencia de un nucleótido (ADP o ATP), arseniato y un ion metálico ( $\text{Me}^{2+}$ ), dan lugar a la formación de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato y amonio libre. En este caso, el complejo intermedio es  $\gamma$ -glutamil arseniato (Eisenberg *et al.*, 2000).

La GS actúa conjuntamente con la glutamato sintasa (GOGAT; EC 1.4.7.1), que cataliza la transferencia reductiva del grupo amida de la L-glutamina al 2-oxoglutarato, empleando un equivalente de poder reductor y generando dos moléculas de L-glutamato; de las cuales, una molécula se recicla de nuevo como sustrato para la reacción de GS, y la otra se exporta o se utiliza para producir otros aminoácidos (Bao *et al.*, 2014).

La glutamina sintetasa se encuentra en todos los organismos, ya que es una enzima clave tanto en la asimilación de amonio como en proporcionar nitrógeno para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Los genes que codifican GS muestran homología en diferentes organismos, incluso en especies evolutivas distantes, por lo que la enzima se ha considerado como un buen reloj molecular en la evolución génica (Pesole *et al.*, 1991; Kumada *et al.*, 1993).

Las glutaminas sintetetasas son una familia de enzimas oligoméricas que se dividen en tres clases, GSI, GSII y GSIII, en función de diferencias en su masa molecular, su secuencia y estructura cuaternaria (Woods y Reid, 1993). Para estos tres tipos de GS existe una controversia en cuanto a su clasificación, puesto que diferentes estudios realizados con las estructuras tridimensionales de cada uno de los tipos, los autores llegan a diferentes conclusiones en cada caso que se exponen a continuación.

La glutamina sintetasa de tipo I (**GSI**) está presente en bacterias y arqueas (Brown *et al.*, 1994), en mamíferos y plantas (Mathis *et al.*, 2000; Wyatt *et al.*, 2006) y en cianobacterias; está codificada por el gen *glnA* (Domínguez-Martín *et al.*, 2016). Se dispone en 12 subunidades idénticas, con una longitud de sus cadenas polipeptídicas entre 450 y 470 aminoácidos, con una masa molecular de subunidad entre 44-60 kDa (Robertson y Alberte, 1996); y la actividad de GSI está controlada por la adenilación de un residuo de tirosina.

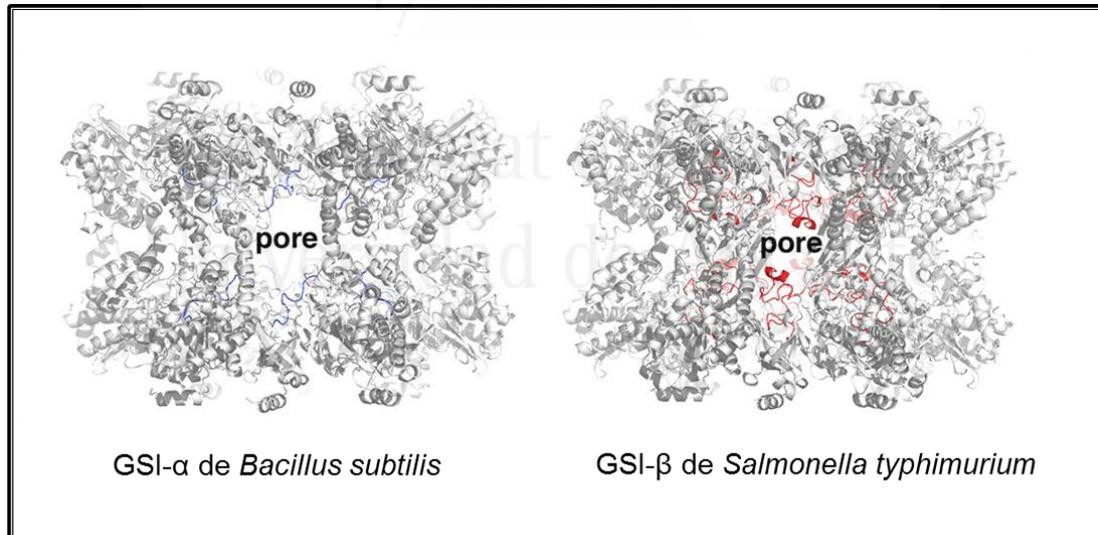
En cuanto a la GS tipo II (**GSII**), presenta una longitud de sus cadenas polipeptídicas entre 350-420 aminoácidos, con una masa molecular de 35-50 kDa por subunidad (Kumada *et al.*, 1993). Se encuentra en eucariotas y algunas bacterias de las familias *Rhizobiaceae* y *Streptomyetaceae*.

Existe una controversia en cuanto a su estructura, ya que algunos autores señalan que se dispone en decámeros de subunidades idénticas organizadas en dos anillos pentaméricos (Murray *et al.*, 2013; Torreira *et al.*, 2014), como la enzima GSII del maíz (Unno *et al.*, 2006), la de mamíferos (Krajewski *et al.*, 2008) y la de levadura (He *et al.*, 2009). Sin embargo, la base de datos PROSITE y otros autores apuntan que la GSII se organiza en un octámero de subunidades idénticas (Shatters y Kahn, 1989; Tiboni *et al.*, 1993; Woods y Reid, 1993).

La glutamina sintetasa tipo III (**GSIII**) está presente en bacterias anaeróbicas y en cianobacterias (en estas últimas codificada por *glnN*), con una masa molecular de subunidad entre 75-83 kDa; presenta cadenas polipeptídicas con aproximadamente 700 aminoácidos. Existe una controversia en cuanto a su estructura puesto que algunos autores junto con la base de datos PROSITE señalan que se organiza en 6 subunidades idénticas (Tiboni *et al.*, 1993; Woods y Reid, 1993), como por ejemplo la GS (GlnN) de *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 (Reyes y Florencio, 1994). Otros autores apuntan que la GSIII es dodecamérica pero sus interacciones hexámero-hexámero son diferentes a la GSI (Murray *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017), como por ejemplo la GSIII de *Bacteroides fragilis* (van Rooyen *et al.*, 2011).

En función de análisis filogenéticos, la GSI procariótica se divide en dos grupos: GSI- $\alpha$  y GSI- $\beta$ , que se diferencian en tres criterios: (1) diferencias a nivel de secuencia, (2) presencia o ausencia de una inserción de 25 aminoácidos específicos y (3) presencia o ausencia de regulación de la GS mediante adenilación (Brown *et al.*, 1994). Las enzimas **GSI- $\alpha$**  se encuentran en *Euryarchaeota* (*Pyrococcus furiosus*, *Hfx. volcanii* y *Methanococcus voltae*); en bacterias Gram positivas con bajo contenido en G+C como *Lactobacillus delbrueckii*, *Clostridium acetobutylicum* y *Bacillus* sp.; en algunas bacterias termofílicas como por ejemplo, *Thermotoga maritima*; y la mejor estudiada es la enzima de *Bacillus subtilis* (Murray *et al.*, 2013). Las **GSI- $\beta$**  contienen una inserción de 25 aminoácidos específicos y están presentes en bacterias Gram positivas con alto contenido en G+C, como *Streptomyces* sp., *Mycobacterium tuberculosis* y *Frankia* sp., en cianobacterias, como *Synechococcus* sp. y *Anabaena* sp. y en otras especies de bacterias como *E. coli* y *Salmonella typhimurium*.

Aunque la GSI- $\alpha$  y GSI- $\beta$  comparten una identidad de secuencia entre 35-41 %, presentan mecanismos de regulación diferentes. Concretamente, las enzimas GSI- $\alpha$  están sujetas a inhibición *feedback* por el producto glutamina, y en menor grado por el AMP. Mientras que la actividad de las GSI- $\beta$  está regulada por adenililación de una tirosina del sitio activo de la proteína (Murray *et al.*, 2013), a excepción de la GS de cianobacterias que se regula por otros mecanismos (Fisher *et al.*, 1981), como por ejemplo, por modificación oxidativa en condiciones de carencia de nitrógeno en el caso de *Prochlorococcus marinus* cepa PCC 9511 (Gómez-Baena *et al.*, 2015); o por interacción directa con los factores inactivantes en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Saelices *et al.*, 2011). La adenililación de la enzima GSI- $\beta$  se encuentra tanto en las proteínas nativas como sobreexpresadas en *E. coli* de especies como *Azospirillum brasilense* (Bozouklian y Elmerich, 1986), *Rhizobium* sp. (Darrow y Knotts, 1977; Rossi *et al.*, 1989), *Streptomyces* sp. (Streicher y Tyler, 1981; Wray y Fisher, 1988) y *Frankia* sp. (Edmands *et al.*, 1987). Hay disponibles estructuras proteicas de GSI- $\beta$  como, la de *E. coli*, *Micobacterium tuberculosis*, y *Salmonella typhimurium*; y un ejemplo de estructura proteica de GSI- $\alpha$  es la de *Bacillus subtilis* (Figura 6) (Murray *et al.*, 2013).



**Figura 6:** Estructuras de las enzimas glutamina sintetasas dodecámicas GSI- $\alpha$  de *Bacillus subtilis* y GSI- $\beta$  de *Salmonella typhimurium*, modificado de Murray *et al.*, 2013.

### 1.5.1. Estructura de las glutamina sintetasas

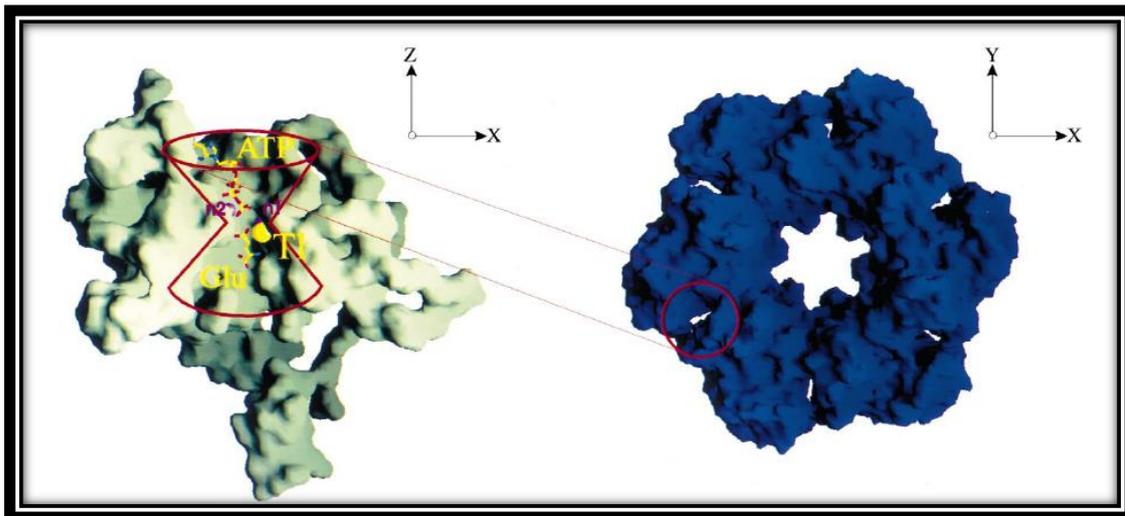
Mediante estudios bioquímicos y estructurales se ha demostrado que las GSI y GSII se ensamblan mediante dos estructuras de anillos cerrados (con sitios activos formados entre los protómeros) que se asocian a través de un punto de contacto, disponiéndose en simetría dihédrica (van Rooyen *et al.*, 2011).

#### Glutamina sintetasa tipo I (GSI)

La GS de tipo I es principalmente procariota. Se trata de una proteína grande con una masa molecular de 600 kDa y un tamaño de 50 kDa por subunidad. Depende de Mg (II) o Mn (II) para su actividad catalítica (Woolfolk *et al.*, 1966; Stadtman y Ginsburg, 1974). La estructura de GS se determinó mediante cristalografía y difracción de rayos X con una resolución de 3.5 Å (Almassy *et al.*, 1986), después se mejoró mediante recolección de datos y refinamiento a 2.5 Å (Eisenberg *et al.*, 2000). Los estudios estructurales mediante difracción de rayos X se realizaron en muestras de GS purificadas a partir de una cepa mutante de *Salmonella typhimurium* incapaz de adenililar a la GS, para evitar la heterogeneidad de la modificación covalente.

La GS de bacterias son dodecámeros constituidos por dos anillos hexaméricos superpuestos, con doce sitios activos formados entre monómeros de un mismo anillo. Cada sitio activo se ha descrito como un *bifunnel* o doble embudo en donde el ATP y el glutamato se unen por extremos opuestos (Figura 7). El ATP se une al sitio activo por la parte superior del doble embudo, que corresponde al extremo abierto hacia la parte externa de la superficie de la GS. La parte central del doble embudo corresponde a sitios de unión de dos cationes divalentes (n1 y n2) separados por 6 Å, donde se unen el manganeso o el magnesio para la catálisis. El ion situado en n2 está implicado en la transferencia del grupo fosforilo (Hunt *et al.*, 1975), mientras que el ion del sitio n1 estabiliza la GS en estado activo (Shapiro y Ginsburg, 1968) y desempeña un papel en la unión del glutamato (Hunt y Ginsburg, 1980).

La afinidad por metales iónicos en el sitio n1 es 50 veces mayor que la del sitio n2 y esto se debe a una mayor carga negativa hacia la mitad inferior del doble embudo cerca de n1.



**Figura 7:** Estructura de glutamina sintetasa bacteriana. En azul se muestra uno de los dos anillos hexaméricos. El dodecamero tiene 12 sitios activos, el círculo en rojo muestra un sitio activo entre las dos subunidades vecinas; cada uno de ellos es un doble embudo con una entrada superior y otra inferior para los sustratos ATP y glutamato, respectivamente. A la izquierda se muestra una subunidad. Los sitios de unión para los iones metálicos (n1 y n2) están separados por 6 Å de longitud, y se localizan en el cuello del doble embudo. La localización del sustrato amonio en el sitio activo se ha determinado utilizando el análogo Talio por estos autores. La distancia entre n1 y el sitio de  $Tl^+$  es de 4 Å, mientras que entre n2 y  $Tl^+$  es de 7 Å. Para una mejor visualización del sitio de unión a glutamato, el lazo del Glu-327 no se ha incluido en la figura (Tomado de Eisenberg *et al.*, 2000).

El dodecámero de GS se mantiene unido principalmente por interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno entre los dos anillos hexaméricos. La hélice situada en el extremo N-terminal se encuentra por encima del anillo hexamérico y se expone al solvente. Mientras que la hélice C-terminal se inserta en un bolsillo hidrofóbico localizado en la subunidad adyacente del anillo hexamérico opuesto.

Además, el canal central del dodecámero está revestido por seis cadenas  $\beta$  que entrelazan los dos anillos de la enzima. La estructura del dodecámero expone varios lazos que presentan una función determinada.

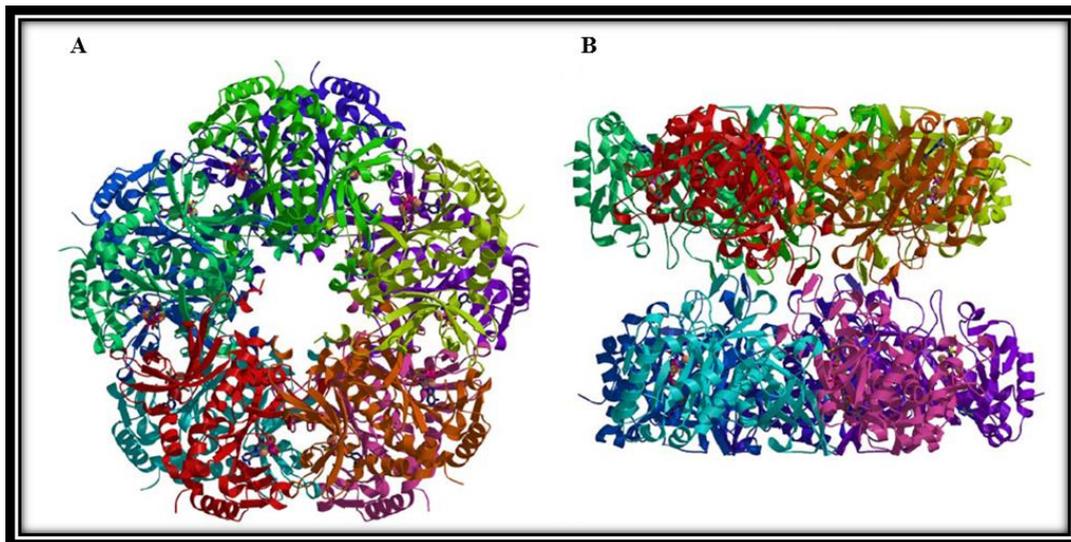
Un lazo está formado por los residuos 156-173 (la numeración corresponde a GS de *E. coli*), sobresale en el canal central del dodecámero y es un sitio de proteólisis (Lei *et al.* 1979) y ADP-ribosilación (Moss *et al.* 1990); otro, llamado lazo de adenilación, contiene

el residuo Tyr397, que es modificado covalentemente por adición de AMP (Shapiro y Stadtman, 1968) y se sitúa en la entrada inferior del doble embudo.

### **Glutamina sintetasa tipo II (GSII)**

La glutamina sintetasa de tipo II se encuentra principalmente en eucariotas y se compone de 10 subunidades aproximadamente de 40 kDa que se disponen en dos anillos pentaméricos superpuestos (Unno *et al.*, 2006; Krajewski *et al.*, 2008).

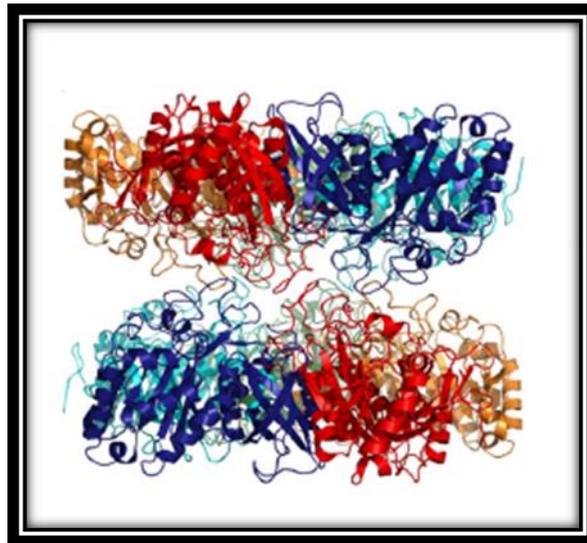
La primera estructura tridimensional de GSII determinada fue a partir de la enzima del maíz. Concretamente, las plantas contienen dos tipos de GS que se localizan en sitios diferentes de la célula, denominadas como GS1 (situadas en el citosol) y GS2 que se encuentran en los cloroplastos. GS1 está codificada por una familia multigénica pequeña, y sus miembros se clasifican en función del perfil de expresión en respuesta al estado de nitrógeno externo, a las propiedades enzimáticas y a la estabilidad fisicoquímica. El maíz presenta cinco GS1s (GS1a–GS1e), de las que las mejor caracterizadas son la GS1a y GS1d, presentando una alta identidad de secuencia (86 %) y diferencias notables en su estabilidad. Mediante cristalografía se ha comprobado que la estructura de GS del maíz (Figura 8) se dispone en dos anillos pentaméricos con subunidades idénticas con un total de diez sitios activos (Unno *et al.*, 2006).



**Figura 8:** Estructura de glutamina sintetasa del maíz (GSa1). **(A)** Estructura vista desde arriba, cada subunidad se muestra en un color diferente. **(B)** Vista lateral de la estructura de la GS del maíz. (Tomado de Unno *et al.*, 2006).

En cuanto a la GS de tipo II en mamíferos, las primeras estructuras tridimensionales de este tipo de GS determinadas fueron la GS canina y humana tanto en ausencia como en presencia de metales, nucleótidos y un inhibidor; ambas se disponen en dos anillos pentaméricos (Krajewski *et al.*, 2008).

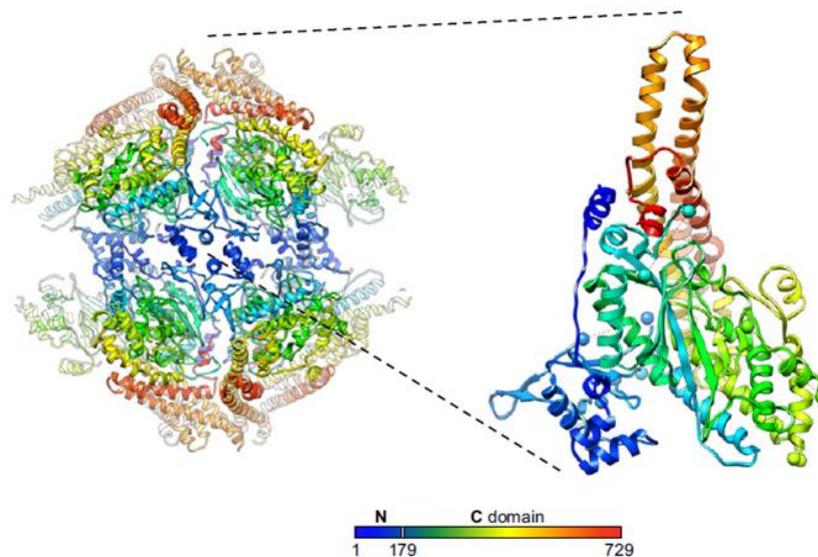
La estructura cristalográfica de la GS canina (*Canis familiaris*) (Figura 9) se realizó mediante reemplazamiento molecular empleando la estructura ya resuelta de un pentámero de la GS de maíz, y se refinó a una resolución de 3 Å. Por otro lado, la GS humana se determinó en dos estructuras: en presencia de manganeso, ADP y fosfato inorgánico (1) y con L-metionina-S-sulfoximina fosfato (MSX-P) (inhibidor de GS), ADP y manganeso (2), a una resolución de 2.05 Å y 2.6 Å, respectivamente.



**Figura 9:** Estructura tridimensional decamérica de glutamina sintetasa canina, en la que cada subunidad muestra un color diferente (Tomado de Krajewski *et al.*, 2008).

### **Glutamina sintetasa tipo III (GSIII)**

La GS tipo III se encuentra en bacterias anaeróbicas y cianobacterias. Su estructura se determinó mediante la técnica de tinción negativa en microscopía electrónica con la GS del patógeno anaeróbico oportunista *Bacteroides fragilis*. Esta glutamina sintetasa se disponía en dos anillos hexaméricos formando un dodecámero con subunidades con masas moleculares de 82.7 kDa (van Rooyen *et al.*, 2006). Posteriormente, la primera estructura cristalina de una enzima GSIII en *Bacteroides fragilis* (Figura 10), mostró que existe una conservación del plegamiento catalítico con respecto a las GSs tipo I y II, pero existen diferencias sutiles en las interacciones proteína-ligando que sugieren posibles vías para el diseño de inhibidores de GSIII. A pesar de las similitudes, la divergencia de GS tipo III con respecto a las otras GSs puede explicarse por su estructura cuaternaria ya que mejoran su estabilidad, contienen geometrías de sitio activo más rígidas, y minimizan las superficies expuestas pudiendo aportar ventajas selectivas (van Rooyen *et al.*, 2011).



**Figura 10:** Estructura cristalina tridimensional de GSIII de *Bacteroides fragilis*. Estructura dodecamérica coloreada según la posición de los residuos. A la derecha se muestra únicamente un solo monómero (Tomado de van Rooyen *et al.*, 2011).

### 1.5.2. Regulación de la glutamina sintetasa

La enzima GS se encuentra sujeta a una compleja regulación tanto a nivel de síntesis proteica como a nivel de su actividad. En la mayoría de sistemas estudiados, el control de la actividad de la GS responde a señales de carbono y nitrógeno. En presencia de abundantes fuentes de carbono y en deficiencia de nitrógeno, se produce un aumento de la actividad de GS. Mientras que, cuando existe una fuente abundante de nitrógeno y en deficiencia de carbono, la actividad glutamina sintetasa se ve disminuida. Por tanto, esta regulación, dependiendo del organismo, se produce mediante diferentes mecanismos (Saelices *et al.*, 2011) que se exponen a continuación.

### 1.5.2.1. Regulación de la glutamina sintetasa en bacterias

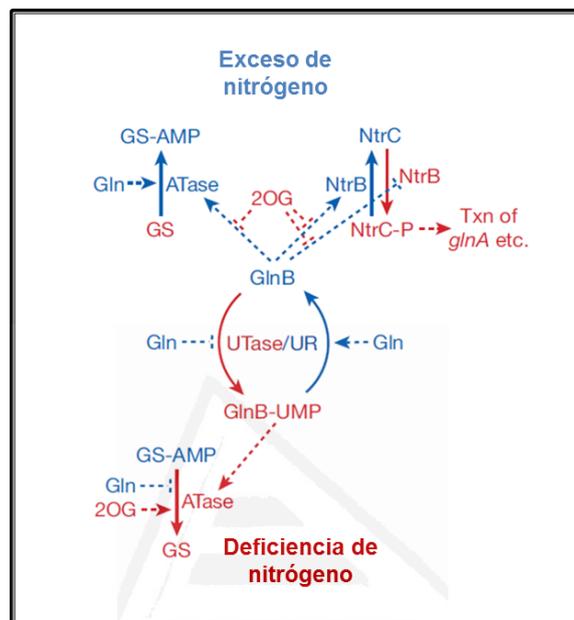
En bacterias, la actividad catalítica de la GS puede regularse mediante adenililación o desadenililación de un residuo específico de tirosina y también por modificación oxidativa (Ginsburg *et al.*, 1970; Liaw *et al.*, 1993).

La enzima GS de *E. coli*, se regula mediante inhibición *feedback* acumulativa por nueve productos finales del metabolismo de glutamina, que son: serina, alanina, glicina, AMP, CTP, triptófano, histidina, carbamil fosfato y glucosamina-6-fosfato. Cada uno de los inhibidores se une a la enzima en su propio centro regulador, que es diferente del centro activo en cada caso, y disminuye la actividad de GS parcialmente (Eisenberg *et al.*, 2000). Sin embargo, los efectos de los distintos inhibidores, cuando actúan de manera conjunta, inactivan a la enzima. A partir de estudios cristalográficos se determinó que los inhibidores serina, alanina y glicina se unen a la GS en el mismo centro activo que el sustrato glutamato, presentando un comportamiento competitivo (Liaw *et al.*, 1993). Además, los nucleótidos GDP, ADP y AMP se unen al sitio de unión del cofactor ATP de la GS sin modificar (desadenililada) y unida a manganeso (Liaw *et al.*, 1994). Por otro lado, en *E. coli* también se produce regulación por modificación covalente reversible de cada subunidad, mediante la adenililación/desadenililación de la Tyr397 que conlleva la alteración de propiedades catalíticas, incluyendo la inactivación de la actividad biosintética en presencia de magnesio. El grado de adenililación depende de los niveles de glutamina y 2-oxoglutarato (Shapiro *et al.*, 1967; Saelices *et al.*, 2015).

Como se muestra en la Figura 11 la adenililación de la GS en *E. coli* implica a tres proteínas. La primera es la adenililtransferasa (ATasa) codificada por *glnE*, la cual transfiere el AMP a partir del ATP a un residuo de tirosina específico de la GS, y también elimina el AMP mediante escisión fosforolítica. La segunda proteína es la PII (codificada por el gen *glnB*) y existe en dos formas: desuridililada, GlnB (estimula la adenililación de GS, inactivándola) y uridililada, GlnB-UMP (estimula la desadenililación, activando a la glutamina sintetasa). La tercera es la uridililtransferasa (UTasa/UR) codificada por el gen *glnD*, que uridilila un residuo de tirosina específico de GlnB mediante la transferencia de UMP a partir de UTP, eliminando también UMP por hidrólisis (Leigh y Dodsworth, 2007). Por tanto, cuando la relación Gln/2-oxoglutarato celular es elevada, (condiciones de exceso

de nitrógeno) la UTasa/UR desuridilila a la proteína GlnB, la cual actúa sobre la ATasa induciendo la adenililación de la GS, GS-AMP (forma menos activa).

Mientras que, en condiciones de deficiencia de nitrógeno (relación Gln/2-oxoglutarato baja), GlnB se uridilila induciendo a la ATasa a desadenililar a la GS, produciendo su forma más activa.



**Figura 11:** Regulación de la actividad glutamina sintetasa y de la expresión de *glnA* en *E. coli*. El color azul indica exceso de nitrógeno y el color rojo deficiencia de nitrógeno. Las modificaciones o no modificaciones están representadas por líneas sólidas, y la función de las proteínas reguladoras y los efectores se representan con líneas discontinuas. Las flechas indican efectos positivos y líneas romas efectos negativos. Modificado de Leigh y Dodsworth, 2007.

En cuanto a la regulación de la expresión de *glnA* en *E. coli* a nivel transcripcional, el sistema Ntr (sistema de regulación global del nitrógeno) está formado por dos componentes que son una proteína sensora histidina quinasa (NtrB) y el regulador de respuesta (NtrC). NtrB fosforila al regulador de respuesta NtrC. NtrB también presenta una actividad fosfatasa que produce la desfosforilación de NtrC. Por tanto, la proteína NtrC fosforilada, NtrC-P, activa la transcripción de genes entre los que se encuentra *glnA*. Cuando se produce un exceso de nitrógeno en la célula, la GS está adenililada, de manera que *glnA* se expresa a nivel basal y los otros genes *ntr* no son expresados (Reitzer, 2003). Como GlnB no está uridililada, se asocia directamente con NtrB estimulando la actividad fosfatasa e inhibiendo la actividad quinasa, lo que conlleva a que NtrC no pueda

fosforilarse y no active la transcripción de *glnA* (Leigh y Dodsworth, 2007). En condiciones de deficiencia de nitrógeno, GlnB-UMP no tiene ningún efecto sobre NtrB, y NtrC se fosforila por NtrB activando la transcripción de *glnA* y otros genes ntr.

La proteína PII pertenece a una superfamilia que se divide en tres familias que están codificadas por: 1. *glnB*; 2. *glnK*, genes que están genéticamente ligados al gen transportador de amonio (*amtB*); 3. *nifH*, genes que se encuentran en *Euryarchaeota* y algunas bacterias, regulando a la enzima nitrogenasa. GlnB y GlnK se encuentran en la mayoría de las bacterias y presentan una estructura homotrimérica, mientras que las proteínas NifH son heteromultiméricas (Forchhammer, 2007; Leigh and Dodsworth, 2007).

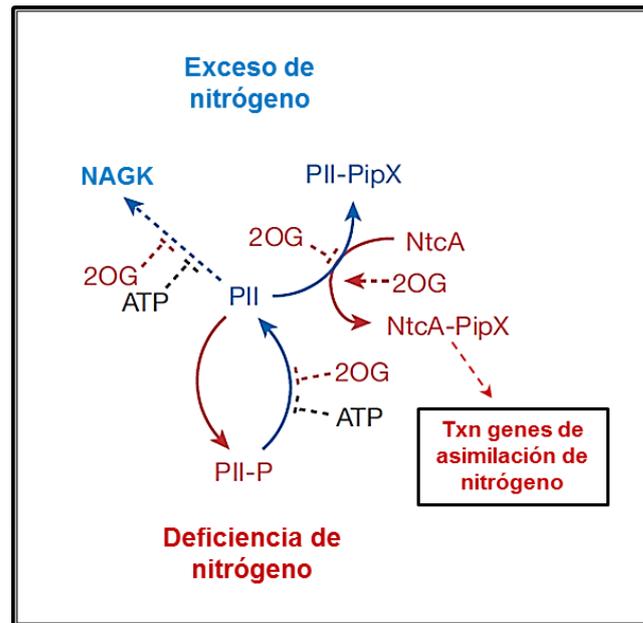
En GS de *Bacillus subtilis*, la expresión de genes regulados por nitrógeno está controlada por dos proteínas, GlnR y TnrA (ambas son miembros de la familia de factores de transcripción MerR). La glutamina sintetasa inhibida por *feedback* (IFB-GS) modula las actividades de unión al DNA de los factores de transcripción mediante una interacción directa con los mismos en cantidades abundantes de nitrógeno. IFB-GS forma complejos con TnrA y bloquea su capacidad para unirse al DNA. En condiciones de **exceso de nitrógeno**, IFB-GS actúa como una chaperona que activa a GlnR y estabiliza el complejo GlnR-DNA, de manera que GlnR reprime la síntesis de glutamina sintetasa, ureasa y TnrA. Mientras que en condiciones de **deficiencia de nitrógeno**, TnrA puede ser activador o represor de la transcripción de genes. Esta proteína activa la expresión de los genes implicados en el transporte de amonio (*amtB-glnK*), la degradación de asparagina (*ansZ*), el transporte de  $\alpha$ -aminobutirato (*gabP*), en la asimilación de nitrato (*nasA*) y nitrito (*nasDEF*), de la ureasa (*ureABC*), y de su propio gen; mientras que reprime la síntesis de GS y de GOGAT (Wray *et al.*, 2001; Wray y Fisher, 2010).

Los autores (Fedorova *et al.*, 2013) indican que la proteína TnrA inhibe parcialmente la actividad biosintética glutamina sintetasa *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, GlnK previene la interacción de GS en estado activo (no inhibida mediante *feedback*) con TnrA. Es decir, en condiciones de deficiencia de nitrógeno, TnrA se une a GlnK evitando que se forme el complejo TnrA-GS, lo que permite que la enzima GS presente actividad.

### 1.5.2.2. Regulación de la glutamina sintetasa en cianobacterias

En cianobacterias no existe un sistema de regulación transcripcional NtrBC como ocurre en bacterias. Por tanto, la asimilación de amonio está controlada mediante el factor transcripcional NtcA, que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales CRP/CAP. Esta proteína es la principal responsable del control del nitrógeno en cianobacterias, la cual actuando como activadora o represora, regula la expresión de diferentes genes regulados por nitrógeno (Muro-Pastor *et al.*, 2005).

La proteína reguladora PII en cianobacterias, codificada por el gen *glnB*, se modifica por fosforilación en un residuo de serina situado en el T-loop (Forchhammer y De Marsac, 1995). Concretamente, las proteínas reguladoras PII son homotrómeros con tres loops por subunidad (T-loop, B-loop y C-loop), de los cuales es especialmente importante el T-loop, puesto que presenta una secuencia conservada que contiene el sitio para una modificación reversible y además es estructuralmente muy flexible, de manera que permite adoptar varias conformaciones que son fundamentales para la interacción de esta proteína reguladora con otras proteínas (Forchhammer, 2004). Al igual que en las enterobacterias, su actividad depende de la unión sinérgica de ATP y 2-oxoglutarato. Como se muestra en la Figura 12, en condiciones de **deficiencia de nitrógeno**, las elevadas concentraciones intracelulares de 2-oxoglutarato y ATP impiden la interacción de PII con PipX (proteína activadora de NtcA) y de PII con NAGK (N-acetil-L-glutamato quinasa) (Espinosa *et al.*, 2009). Cantidades de 2-oxoglutarato elevadas estimulan la interacción de NtcA con PipX activando los genes dependientes de NtcA. Cuando existen **cantidades abundantes de nitrógeno**, los niveles de 2-oxoglutarato intracelular son bajos, de manera que la interacción de PII con PipX disminuye la formación del complejo NtcA-PipX, induciendo la biosíntesis de arginina. Es decir, la PII desfosforilada interacciona con la enzima NAGK aumentando su actividad.

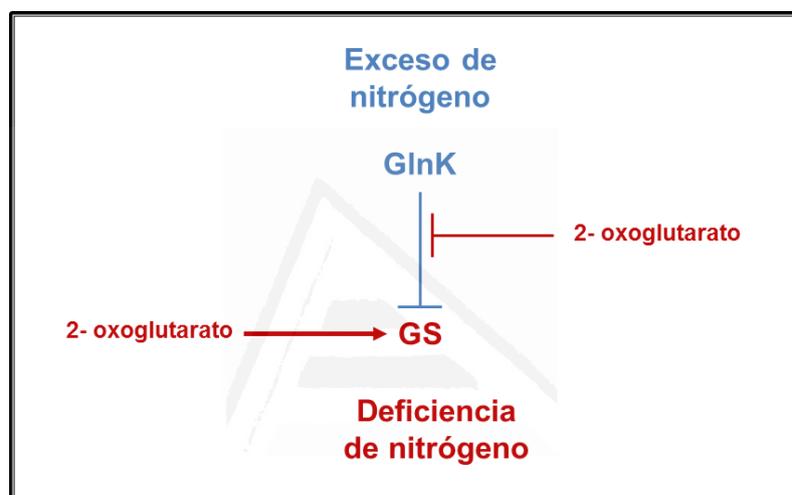


**Figura 12:** Regulación de la transcripción de genes de asimilación de nitrógeno y de la actividad NAGK en cianobacterias unicelulares. El color azul indica exceso de nitrógeno y el color rojo deficiencia de nitrógeno. Las flechas indican efectos positivos y líneas romas efectos negativos. Modificado de Leigh y Dossdsworth, 2007.

En las cianobacterias, la expresión y actividad de la GSI se modula a nivel transcripcional y post-traducciona. Existen cianobacterias que tienen una única GS (GSI, codificada por el gen *glnA*) mientras que otras, además de la GSI poseen la GSIII, codificada por el gen *glnN*. En ausencia de amonio, el factor NtcA activa la transcripción de genes relacionados con el nitrógeno uniéndose a sus correspondientes promotores. El mecanismo de regulación post-traducciona en *Synechocystis* y otras cianobacterias consiste en la interacción proteína-proteína de la GSI con los factores inactivantes IF7 e IF17, dos polipéptidos inhibidores de la GS codificados por los genes *gifA* y *gifB*, respectivamente, y ambos se requieren *in vivo* para su completa inactivación, aunque la presencia de cualquiera de las dos proteínas es suficiente para producir algún grado de inactivación de GS (García-Domínguez *et al.*, 1999; Saelices *et al.*, 2015). Sin embargo, en cepas del género *Prochlorococcus* no existen los genes *gifA* y *gifB*, por lo que la GS se regula mediante modificación oxidativa en condiciones de carencia de nitrógeno (Gómez-Baena *et al.*, 2015). Es decir, la inactivación de la GS ocurre mediante sistemas de oxidación catalizada por metales tanto enzimáticos como:  $\text{NAD(P)H} + \text{NAD(P)H-oxidasa} + \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2$ , como no enzimáticos, como:  $\text{ascorbato} + \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2$ . Este proceso requiere la presencia de oxígeno y un metal catiónico (Gómez-Baena *et al.*, 2001).

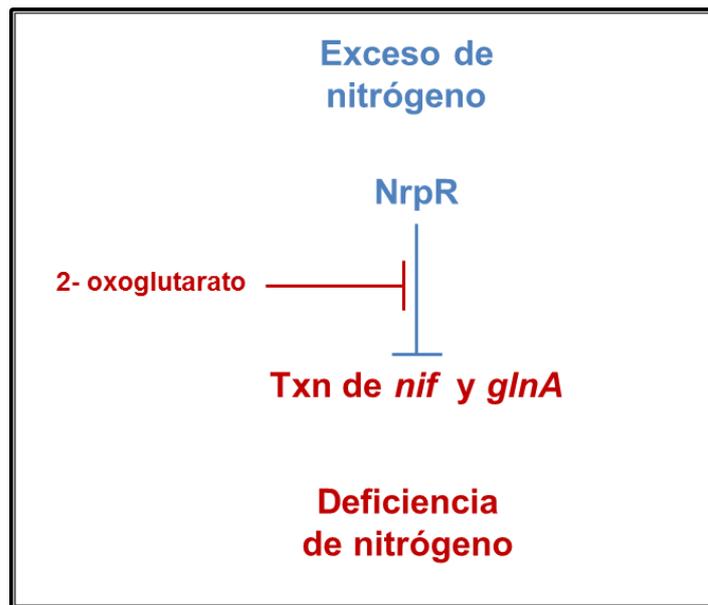
### 1.5.2.3. Regulación de la glutamina sintetasa en arqueas

La arquea metanógena *Methanosarcina mazei*, que pertenece al *phylum Euryarchaeota*, asimila el amonio mediante la ruta GS-GOGAT. Además, contiene los genes *glnK<sub>1</sub>* y *glnK<sub>2</sub>*, ambos unidos a los genes *amtB*. En esta especie existe una interacción directa entre la PII y la GS (GlnA<sub>1</sub>), de manera que, en condiciones de exceso de nitrógeno, la proteína GlnK<sub>1</sub> inhibe a GlnA<sub>1</sub> (Figura 13). Los altos niveles intracelulares de 2-oxoglutarato impiden el efecto inhibitorio de GlnK<sub>1</sub>, produciendo un aumento de actividad de la GS, pero no dificultan la formación del complejo GlnK<sub>1</sub>-GS (Ehlers *et al.*, 2005).



**Figura 13:** Regulación de la GS en *Methanosarcina mazei* mediante interacción directa de GlnK y 2-oxoglutarato sobre la enzima glutamina sintetasa. La flecha indica efecto positivo y las líneas romas indican efectos negativos. Modificado de Leigh y Dodsworth, 2007.

En algunas arqueas la transcripción de los genes de asimilación de nitrógeno está regulada por el represor NrpR (Figura 14), que se descubrió por primera vez en *Methanococcus maripaludis* (Leigh y Dodsworth, 2007). En esta arquea metanógena, dicho represor se une a los operadores en las regiones promotoras de los genes *nif* y *glnA*. En condiciones de carencia de nitrógeno, el 2-oxoglutarato actúa como molécula inductora impidiendo la unión del represor NrpR, por lo que se induce la transcripción de los genes *nif* y *glnA*.



**Figura 14:** Regulación de *glnA* mediante interacción directa con el represor NrpR en *Methanococcus maripaludis*. Modificado de Leigh y Dosdsworth, 2007. Líneas romas indican efectos negativos.

En la haloarquea *Haloferax mediterranei* existen dos genes que codifican GlnK (proteína PII), denominados *glnK<sub>1</sub>* y *glnK<sub>2</sub>* ambos unidos a los genes de transportadores de amonio (*amt*). Estas proteínas reguladoras son casi idénticas con una similitud del 84 %, y mediante su expresión heteróloga en *E. coli* se obtuvo que se modifican post-traduccionalmente mediante uridililación, que ocurre en la Tyr60 para GlnK<sub>1</sub> y en la Tyr61 para GlnK<sub>2</sub> (Pedro-Roig *et al.*, 2013a).

Tanto las formas uridililadas como desuridililadas se obtuvieron en condiciones de carencia de nitrógeno. Sin embargo en el genoma de esta arquea no se ha encontrado una enzima homóloga a la uridililtransferasa (UTasa/UR) codificada por el gen *glnD*, lo que implica que debe de existir otra proteína diferente que ejerza esta función. Las proteínas GlnK se expresan únicamente en la célula cuando se utiliza el nitrato como fuente de nitrógeno o en carencia de nitrógeno, mientras que en presencia de amonio o medio complejo no se produce su expresión (Pedro-Roig *et al.*, 2011). En presencia de 2-oxoglutarato, mediante interacción directa de la PII con la GS (*glnA*), se produce la activación de la glutamina sintetasa al formarse el complejo PII-GS (Pedro-Roig *et al.*, 2013b).

# OBJETIVOS



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo consiste en:  
Profundizar en el entendimiento de las funciones específicas de las diferentes glutamina sintetasas dentro del metabolismo del nitrógeno de *Haloferax mediterranei*.

Este propósito comprende los siguientes objetivos específicos:

1. Clonar y expresar los genes que codifican glutamina sintetasa.
2. Caracterizar la proteína glutamina sintetasa recombinante (GlnA).
3. Obtener una cepa mutante del gen *glnA*.
4. Caracterizar la cepa mutante.
5. Determinar el posible papel fisiológico de las isoformas GlnA-2 y GlnA-3.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Microorganismos y plásmidos empleados

En el presente trabajo se ha utilizado como organismo modelo *Hfx. mediterranei* cepa R4 (ATCC 33500) y HM26 ( $\Delta pyrE2$ ) en la que el gen *pyrE2* de la cepa salvaje R4 se sustituyó por una versión deletada del mismo (Pedro-Roig, 2012). El gen *pyrE2* codifica a la enzima orotato fosforribosil transferasa, que está implicada en la biosíntesis de pirimidinas. Esta mutación produce la incapacidad de crecer en medio mínimo, permitiendo utilizar el gen *pyrE2* como un marcador genético de selección y contra-selección para la generación de mutantes *knockout* (Bitan-Banin *et al.*, 2003). En concreto, la cepa HM26 se utilizó como cepa parental para la construcción de otros mutantes en *Hfx. mediterranei*.

En la Tabla 1 se resumen las diferentes cepas empleadas en este estudio, tanto las bacterianas utilizadas para clonar y expresar las proteínas de interés, así como las cepas de *Hfx. mediterranei*.

**Tabla 1:** Genotipo y función de las cepas microbianas.

Especie	Cepa	Genotipo	Función
<i>Escherichia coli</i>	JM 109 (Promega)	<i>end A1, rec A1, gyr A96, thi1, hsd R17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), relA1, sup E44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Clonaje
	BL21 (DE3) (Novagen)	F <sup>-</sup> <i>ompT, hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm, (DE3)</i>	Expresión
<i>Haloferax mediterranei</i>	R4 ATCC33500	salvaje	Estudios de fisiología y estimación del peso molecular
	HM26	Δ <i>pyrE2</i>	Construcción de mutantes
	HM26-A	Δ <i>glnA</i>	Estudios de fisiología
	HM26-A3	Δ <i>glnA-3</i>	Estudios de función de GlnA-3

El significado de los marcadores genéticos se explica en el Anexo I.

Los plásmidos utilizados en este estudio fueron: pGEM®-T Easy (Promega) para la realización del clonaje de los genes, y pET-3a (Novagen) para la posterior expresión. También se ha empleado el vector pMH101 (proporcionado por el Dr. Soppa), con el que se creó el plásmido pMH101N con resistencia a novobiocina para la generación de mutantes *knockout* en *Hfx. mediterranei* (Pedro-Roig, 2012).

### 3.2. Purificación de glutamina sintetasa de *Haloferax mediterranei*

#### 3.2.1. Condiciones de cultivo de *Hfx. mediterranei*

*Haloferax mediterranei* se cultivó en medio definido con agua de sales al 25 % (p/v) (Anexo II) (Rodríguez-Valera *et al.*, 1980b). Además, el medio contenía FeCl<sub>3</sub> 0.005 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.9 g/L suplementado con glucosa 10 g/L (como única fuente de carbono) y KNO<sub>3</sub> 40 mM (como fuente de nitrógeno). El pH se ajustó a 7.3 con NaOH. Se creció en condiciones aerobias a 42 °C con agitación a 200 rpm. El crecimiento del cultivo se siguió mediante la medida de la densidad óptica a 600 nm en un biofotómetro (Eppendorff).

Para la construcción de los mutantes de los genes *glnA* y *glnA-3*, tanto la cepa parental HM26 como la mutante se crecieron en diferentes medios de cultivo. Para la obtención de mutantes *pop-in* de GS y de GlnA-3, los cultivos se crecieron en medio definido para *Hfx. mediterranei* (Anexo II). Posteriormente, para conseguir los mutantes *pop-out* de ambas proteínas, los cultivos se crecieron en medio complejo para *Hfx. mediterranei* (Anexo II). En todos los medios se ajustó el pH entre 7.2-7.4. Para el crecimiento de los mutantes en medio sólido se añadió agar al 1.8 %.

#### 3.2.2. Obtención del extracto enzimático de la glutamina sintetasa

Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria, las células se cosecharon por centrifugación a 8500 rpm durante 45 minutos a 4 °C en una centrífuga “Beckman Coulter Avanti™ J-20XP” con un rotor angular JLA 9100. A continuación, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron (40 % p/v) en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5 conteniendo NaCl 2M ADP 0.1 mM y 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Posteriormente, se procedió a la ruptura de las células en frío con un sonicador de la casa VirTis, VirSonic 475 a 300 W durante ocho periodos de 40 segundos con descansos de 40 segundos entre cada uno de los pulsos. La suspensión sonicada se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman modelo L5-65B con rotor de ángulo fijo tipo 35 Ti a 30000 rpm durante 1.5 horas. Finalmente, el sobrenadante obtenido se utilizó como extracto enzimático.

### 3.2.3. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó mediante el método Bradford (Bradford, 1976) que se basa en el principio de unión proteína-colorante, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como patrón para realizar la correspondiente curva de calibrado. Para ello, se utilizó el microensayo empleando 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de proteína y 1 mL del reactivo de Bradford. Después, se midieron las absorbancias a 595 nm.

### 3.2.4. Medición de la actividad glutamina sintetasa

#### 3.2.4.1. Actividad transferasa GS

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se basa en una reacción paralela a la reacción biosintética, en la que la hidroxilamina y la glutamina, en presencia de un nucleótido, arseniato y un ion metálico, dan lugar a la formación de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato y amonio libre (Shapiro y Stadtman, 1970). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, frente a un control sin enzima. La actividad se midió mediante la determinación colorimétrica del  $\gamma$ -glutamil hidroxamato producido, siguiendo la variación de absorbancia a 510 nm. Las mezclas de reacción se componen del reactivo A (MOPS 0.1 M pH 7, glutamina 200 mM,  $\text{MnCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  e hidroxilamina 20 mM) y el reactivo B (MOPS 0.125 M pH 7, ADP 40  $\mu\text{M}$  y  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  200 mM).

El ensayo se realizó con mezclas que contenían cada uno de los reactivos que se muestra en la Tabla 2, en un volumen final de 1 mL.

**Tabla 2:** Mezcla de reacción de la actividad transferasa de la GS.

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>Reactivo A</b>	500
<b>Tampón con 2 M NaCl</b>	200
<b>Muestra problema</b>	50*
<b>Reactivo B</b>	250

\*La muestra problema se puede variar hasta un máximo de 250  $\mu\text{L}$ , ajustando el volumen de tampón.

La reacción se desarrolló durante 40 minutos en un baño a 40 °C, y se detuvo por la adición del reactivo de hierro (reactivo revelador) en medio ácido (Anexo II). A 1 mL de la mezcla de reacción se le añaden 3 mL de reactivo revelador, y al cabo de 10 min, el complejo formado se determina midiendo la absorbancia a 510 nm. La unidad de actividad enzimática (U), se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato por minuto. Para determinar la cantidad de  $\gamma$ -glutamil hidroxamato formado se realizó una curva de calibrado con este reactivo.

#### **3.2.4.2. Actividad biosintética GS**

Por otro lado, la GS cataliza la reacción biosintética en presencia de los metales divalentes  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ , produciendo glutamina y la liberación de fosfato inorgánico a partir de glutamato, amonio y ATP. Los ensayos de actividad se realizaron por triplicado, utilizando muestras control, una sin enzima y otra en ausencia de glutamato. Para esta medida de actividad, se prepararon mezclas de sustratos en un volumen final de 1 mL, que contenían ATP,  $MnCl_2$  o  $MgCl_2$ , glutamato y amonio (Anexo II). Después, en la mezcla de reacción se utilizaron 0.1 mL de la misma, la enzima, y el tampón hasta completar un volumen final de 0.2 mL. La cantidad de enzima fue ajustada hasta 0.25 micromoles de fosfato producido en la reacción, que se desarrolló durante 15 min a 40 °C, y se detuvo mediante la adición de 1.8 mL del reactivo de sulfato ferroso (Anexo II). A continuación, se añadieron 0.15 mL del reactivo de molibdato de amonio (Anexo II) que tras 1 minuto producía un tono azulado a la reacción. La cantidad de fosfato inorgánico producido se determinó mediante una curva de calibrado con diferentes concentraciones del mismo. La actividad biosintética se determinó, midiendo la producción de fosfato inorgánico espectrofotométricamente a 660 nm.

#### **3.2.5. Purificación de la glutamina sintetasa**

Tras obtener el extracto enzimático como se describe en el apartado 3.2.2, la purificación se llevó a cabo mediante dos etapas a temperatura ambiente que se explican a continuación:

- Paso 1: Cromatografía en Sepharosa 4B-CL. El extracto enzimático se cromatografió en una columna Sepharosa 4B-CL (2.6 x 30 cm) equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5 conteniendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 M, ADP 0.1 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. La columna se lavó con el mismo tampón utilizado para el equilibrado. La elución de la proteína se realizó con un gradiente de sulfato amónico de concentración lineal decreciente (de 2.5 a 0.5 M en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5 ADP 0.1 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM). La velocidad de flujo se estableció a 48 mL/h, recogiendo fracciones de 10 mL/tubo. Aquellas fracciones que contenían actividad glutamina sintetasa se combinaron y se aplicaron a una columna de DEAE-celulosa.
- Paso 2: Cromatografía en DEAE-celulosa. Se pesaron 7.5 g de DEAE-celulosa *Fast Flow* (Sigma), y se resuspendieron en HCl 0.5 M. Esta mezcla se incubó durante 30 minutos, removiéndose aproximadamente cada 4–5 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 4000 rpm durante 2 min y se eliminó el sobrenadante, lavándose con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro y eliminando las partículas más pequeñas con una pipeta Pasteur. A continuación, se realizó el mismo proceso empleando NaOH 0.5 M. Una vez activada la matriz, se empaquetó la columna (3 x 4 cm) y se equilibró con tres volúmenes de columna de tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5 conteniendo  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 M, ADP 0.1 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM. A continuación, se aplicó la muestra con actividad GS procedente de la cromatografía anterior. Posteriormente, se lavó con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 48 mL/h hasta que la absorbancia a 280 nm fue menor de 0.05. La enzima se eluyó con tampón Tris-HCl 20 mM pH 7.5, conteniendo NaCl 2 M, ADP 0.1 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM a una velocidad de flujo de 48 mL/h, recogiendo fracciones de 2.5 mL/tubo.

### 3.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para determinar el grado de pureza de las proteínas se efectuaron electroforesis analíticas de la purificación. Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS. El sistema empleado en la electroforesis fue el descrito por Laemmli en 1970. Se prepararon geles de acrilamida separadores al 12 % (p/v) y concentradores al 4 % (p/v). Las disoluciones preparadas se describen en el Anexo II. La electroforesis se realizó en un sistema miniVE (Amersham Bioscience). La visualización directa de la proteína se realizó mediante tinción con azul

Coomassie (R-250, AppliChem) siguiendo el método propuesto por De Moreno et al (De Moreno *et al.*, 1985).

### 3.2.7. Western blot y *Dot blot*

Las proteínas cargadas y separadas mediante un SDS-PAGE se transfirieron a una membrana Amersham™ Hybond™ PVDF de GE Healthcare, en medio húmedo en el tampón de transferencia Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20 % (v/v), pH 9.2 en un sistema miniVE (Amersham Bioscience). La transferencia se realizó a 100 V y 350 mA durante 1 hora en frío. Para la inmunodetección de la proteína GS, se empleó el anticuerpo primario policlonal de conejo específico anti-GlnA (GeneScript). Después se añadió el anticuerpo secundario de conejo conjugado a la enzima peroxidasa de Thermo Scientific, y el sustrato quimioluminiscente luminol (*Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent kit*) de GE Healthcare. Primero, se realizó el bloqueo de la membrana con leche desnatada en polvo al 5 % en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente, para evitar así, las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-GlnA a una concentración final de 0.2 µg/mL diluido en TBST, a una temperatura de 4 °C y durante la noche. Posteriormente, el anticuerpo secundario se añadió a la membrana a una dilución 1:50000 en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se expuso al reactivo de detección ECL durante 5 minutos, produciéndose señales quimioluminiscentes que se capturaron en una placa de rayos X de Amersham. En cuanto al *Dot blot*, en primer lugar se activó la membrana PVDF humedeciéndola en metanol, después en agua ultrapura y luego en el tampón de transferencia (mencionado anteriormente). A continuación, se dejó secar al aire para posteriormente añadir un volumen final de 10 µL de cada gota de proteína recombinante, se dejaron secar al aire y después a las membranas se les realizó el mismo tratamiento que en el *Western blot*.

## 3.3. Clonaje de los genes *glnA*, *glnA-2* y *glnA-3* de *Hfx. mediterranei*

### 3.3.1. Aislamiento del DNA genómico de *Hfx. mediterranei*

La técnica utilizada para la extracción del DNA, consistió en lisar las células halofílicas con agua ultrapura y realizar la extracción del DNA con fenol equilibrado con

Tris (Applichem). El DNA se precipitó con etanol absoluto, se disolvió en agua ultrapura estéril y se incubó en un baño a 37 °C hasta su completa disolución (Dyall-Smith y Doolittle, 1994).

### 3.3.2. Medida de la concentración de DNA

La concentración de DNA se midió espectrofotométricamente registrando la absorbancia de la muestra a 260 nm. Para DNA puro, un valor de absorbancia de 1 corresponde a una concentración de 50 µg/mL.

### 3.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

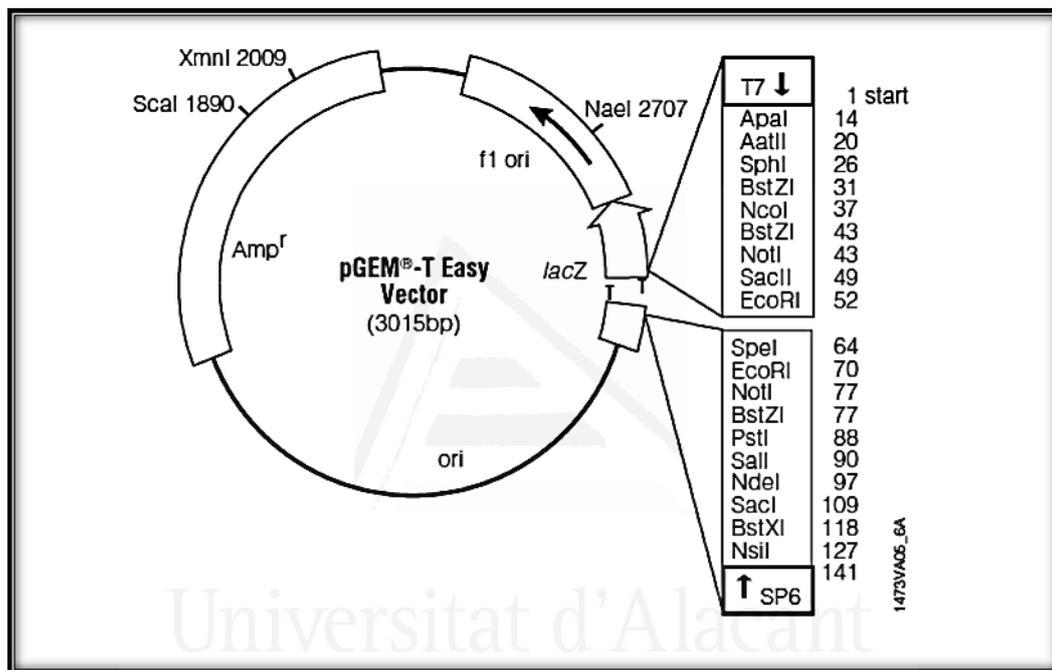
Una vez aislado el DNA genómico y conocida su concentración y pureza, se realizó la separación electroforética de fragmentos de DNA en geles de agarosa al 1 % (Pronadisa) en tampón TAE 1X (Anexo II), con RedSafe 260X (iNtRON Biotechnology). La fuente empleada fue Electrophoresis Power Suply EPS 500/400 (Pharmacia). Las muestras se prepararon añadiendo el tampón de carga (Anexo II) a cada uno de los DNAs en una proporción 1:6 (tampón de carga: muestra). Las electroforesis se llevaron a cabo a 90 V, y una vez terminadas, se observaron las bandas teñidas con RedSafe mediante un transiluminador UV Spectroline TC-312A. El gel se fotografió con un sistema “Gel Logic 200” de Kodak.

### 3.3.4. Clonaje del gen *glnA* en pGEM y en pET3a

Con el objetivo de sobreexpresar heterológamente la proteína GS de *Haloferax mediterranei*, el gen *glnA* se clonó en el vector de expresión pET3a utilizando pGEM como vector intermedio para facilitar el proceso.

El vector pGEM (Promega) tiene un tamaño de 3 Kb. Se trata de un vector específico para el clonaje efectivo de productos de PCR. Este grado de eficiencia, se consigue debido a que el plásmido pGEM se comercializa en forma lineal y con un residuo terminal de timidina a cada extremo, el cual impide la recircularización y ayuda a la ligación del inserto. Otra característica del sistema de clonaje con pGEM, es la posibilidad de la identificación de las colonias con inserto por código de color blanco-azul. En el

vector pGEM (Figura 15) el sitio de clonaje múltiple se encuentra incluido en una secuencia codificante para el extremo N-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa, de modo que cuando existe inserto esta secuencia se interrumpe. A causa de esto, si no hay inserto y el vector se encuentra en una célula cuyo genoma codifica la porción terminal de esta enzima, cuando las células sean inducidas por IPTG y esté presente el sustrato de la enzima (X-gal), las colonias se teñirán de azul. En caso contrario, si la porción N-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa se encuentra interrumpida por un inserto, dicha enzima permanecerá incompleta en la célula y las colonias serán blancas.



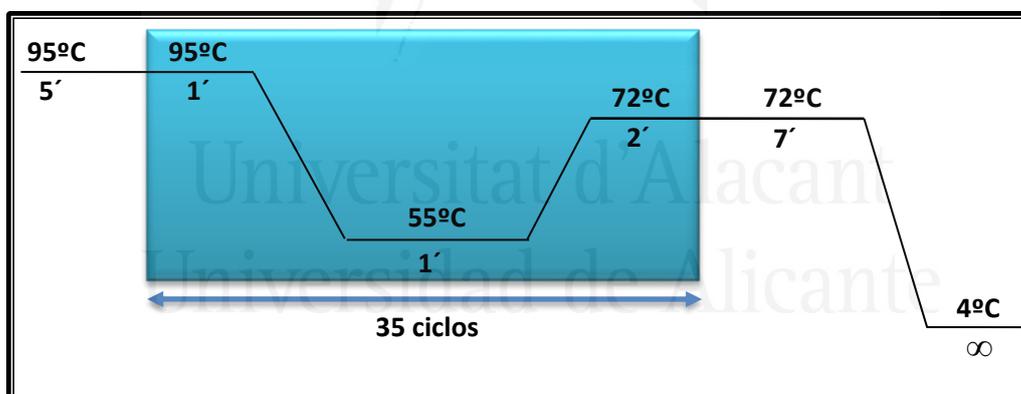
**Figura 15:** Mapa del vector pGEM®-T Easy.

Para la expresión y purificación de la proteína glutamina sintetasa de *Hfx. mediterranei*, se amplificó el gen *glnA* con dos oligonucleótidos específicos que se diseñaron con sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, denominados como GSexpF (cebador directo) y GSexpR (cebador reverso) (Anexo III). Mediante PCR se amplificó el gen de la GS de *Hfx. mediterranei* a partir de DNA genómico. Se preparó una mezcla de reacción que contenía los reactivos que se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Concentración de los reactivos utilizados para la amplificación del gen de la glutamina sintetasa (*glnA*) de *Hfx. mediterranei*.

Reactivos	Concentración final
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 mM
10X buffer PCR	1 X
dNTPs 100 mM	1.6 mM
GSexpF 100 pmol/μL	2 pmol/μL
GSexpR 100 pmol/μL	2 pmol/μL
DNA genómico <i>Haloferax</i>	100 ng
EcoTaq 5U/μL	2.5 U/μL
DMSO	1.2 % v/v
H <sub>2</sub> O ultrapura	hasta un volumen final de 50μL

Para cada una de las reacciones se realizaron controles con cada uno de los oligonucleótidos por separado. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador “2720 Thermal Cycler” (Applied Biosystems) y el programa de PCR utilizado se recoge en la Figura 16.

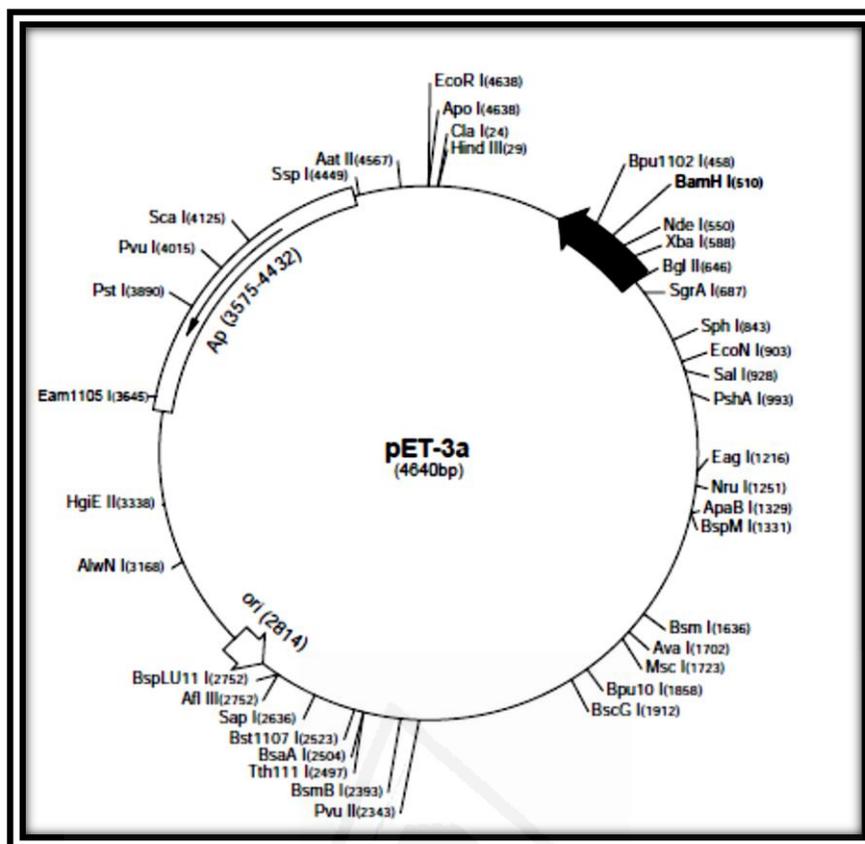


**Figura 16:** Programa de PCR de amplificación del gen *glnA* de *Hfx. mediterranei*.

Después se realizó una electroforesis de los productos de la PCR en un gel de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X, y fue teñido con RedSafe. Los productos se visualizaron en el transiluminador UV Spectroline TC-312A. Posteriormente, los fragmentos de PCR se purificaron con los kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

Estos fragmentos de PCR purificados se clonaron en el vector pGEM utilizando pGEM®-T Easy Vector System I (Promega). Se preparó la reacción de ligación del vector con los fragmentos de PCR como inserto, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. A continuación, se transformaron las células de *E. coli* cepa JM109 (Stratagene), con el producto de ligación mediante electroporación que se realizó siguiendo el método descrito por (Dower *et al.*, 1988). Seguidamente las células transformadas se sembraron en placas de LB (Luria-Bertani) (Anexo II) con agar al 1.5 %, ampicilina 100 µg/mL, IPTG 0.5 mM y X-Gal 0.01 % (p/v) para seleccionar recombinantes por actividad β-galactosidasa. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se inocularon las colonias blancas en medio LB líquido suplementado con ampicilina 100 µg/mL y se dejaron crecer durante la noche a 37 °C con agitación. Posteriormente se procedió al aislamiento y purificación de los plásmidos a partir de las células crecidas, utilizando para ello el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Diagnostics). Los plásmidos junto con una alícuota de pGEM sin inserto como control, se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) con tampón TAE 1X y para su tinción se utilizó RedSafe 260X (iNtRON Biotechnology). Finalmente uno de los plásmidos que contenía el inserto se secuenció con los oligonucleótidos universales para comprobar que el gen de la GS no había mutado.

El vector de expresión pET3a (Novagen) tiene un tamaño de 4.6 Kb, confiere resistencia frente al antibiótico ampicilina, que sirve como método de selección de positivos y presenta un promotor para la T7 RNA polimerasa. El vector se muestra a continuación (Figura 17).



**Figura 17:** Mapa del vector de expresión pET3a.

Tras secuenciar y comprobar que el plásmido con inserto contenía correctamente el gen de la glutamina sintetasa, dicho plásmido se utilizó como material de partida para clonar el gen *glnA* en el vector de expresión pET3a (Novagen). Para ello se digirió una alícuota del vector de expresión y del plásmido pGEM-*glnA* con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* Fast Digest (Fermentas), siguiendo las indicaciones de la casa comercial para las digestiones dobles. Posteriormente se cargaron en un gel de agarosa al 1 % (p/v) cada uno de los productos de las digestiones, y se recortaron y purificaron el fragmento de *glnA*, y el pET3a digerido.

Los pasos siguientes (ligación, transformación y aislamiento y purificación del plásmido) se realizaron de la misma forma que lo descrito para el clonaje en pGEM, con la excepción de que las células *E. coli* JM109 transformadas, se sembraron en placas de medio LB con agar al 1.5 % y ampicilina 100 µg/mL pero sin IPTG ni X-Gal, ya que el plásmido pET3a no permite diferenciación por color blanco-azul de las colonias con presencia y ausencia de inserto.

Los plásmidos pET3a-*glnA* se visualizaron por electroforesis de agarosa al 1% (p/v) y uno de ellos se secuenció con oligos universales del plásmido para verificar que no existiera ninguna mutación en el gen, y que la posición relativa entre el promotor y el ATG de inicio del gen fuera la correcta.

### 3.3.5. Clonaje de los genes *glnA-2* y *glnA-3* en pET3a

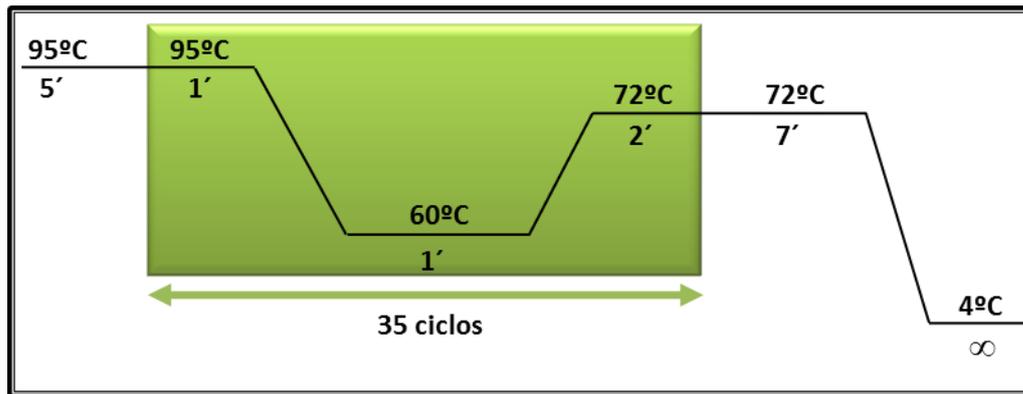
Para sobreexpresar heterológicamente las isoformas de GS (GlnA-2 y GlnA-3) de *Hfx. mediterranei*, *glnA-2* y *glnA-3* se clonaron directamente en el plásmido de expresión pET3a. Para la amplificación de cada uno de los genes *glnA-2* y *glnA-3* (que codifican las isoformas de GS) se diseñó dos oligonucleótidos específicos con sitios de corte para las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*. Los cebadores GSA2expF (directo) y GSA2expR (reverso) se utilizaron para el gen *glnA-2*, y los cebadores GSA3expF y GSA3 expR (directo y reverso, respectivamente) se emplearon para *glnA-3* (Anexo III).

Mediante PCR se amplificaron los genes de las isoformas de GS de *Hfx. mediterranei* a partir de DNA genómico. Se preparó una mezcla de reacción que contenía los reactivos que se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4:** Concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de los genes *glnA-2* y *glnA-3* de *Hfx. mediterranei*.

Reactivos	Concentración
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 mM
10X buffer PCR	1 X
dNTPs 100 mM	1.6 mM
GSA2expF /GSA3expF 20 pmol/μL	1 pmol/μL
GSA2expR/GSA3expR 20 pmol/μL	1 pmol/μL
DNA genómico <i>Haloferax</i>	200 ng
EcoTaq 5U/μL	1 U/μL
H <sub>2</sub> O ultrapura	hasta un volumen final de 50μL

Para cada una de las reacciones se realizaron también controles con cada uno de los oligonucleótidos por separado. El programa de PCR empleado se muestra en la Figura 18. Una vez obtenidos los productos de DNA, cada uno de ellos fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* al igual que los plásmidos pET3a.



**Figura 18:** Programa de PCR para la amplificación de los genes *glnA-2* y *glnA-3* de *Hfx. mediterranei*.

Los pasos siguientes (ligación, transformación, aislamiento y purificación del plásmido) se realizaron de la misma forma que lo descrito anteriormente para la GS con el plásmido pET3a.

Una vez obtenidas las construcciones pET3a-*glnA-2* y pET3a-*glnA-3* se visualizaron por electroforesis en agarosa al 1 % (p/v) y se secuenciaron con los oligonucleótidos GSA2-seq500F para el gen *glnA-2* y GSA-3-seq500 para el gen *glnA-3* (Anexo III), para secuenciar la región central de ambos genes y también con los oligonucleótidos universales para verificar que no existiera ninguna mutación en cada uno de los genes *glnA-2* y *glnA-3*, y que la posición relativa entre el promotor y el ATG de inicio de los diferentes genes fuera la correcta.

### 3.4. Expresión heteróloga de las proteínas recombinantes

Las construcciones pET3a-*glnA*, pET3a-*glnA-2* y pET3a-*glnA-3* se utilizaron para la sobreexpresión heteróloga de las proteínas GlnA, GlnA-2 y GlnA-3 en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Se transformaron las células de expresión con el producto de ligación de cada una de las construcciones pET3a-inserto mediante electroporación y siguiendo el método descrito por (Dower *et al.*, 1988). Posteriormente, se sembraron las células transformadas en placas de medio LB con agar al 1.5 % y ampicilina 100 µg/mL. Los resultados de la expresión se visualizaron por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12 %. Los gels fueron teñidos con azul Coomassie (R-250, AppliChem).

### 3.4.1. Crecimiento e inducción de la expresión

Cada una de las colonias de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con la construcción adecuada se crecieron en 5 mL de medio líquido LB con ampicilina 100 µg/mL y glucosa 40 mM. Se incubaron a 37 °C con agitación hasta una  $DO_{600}$  entre 0.5-1.0. Con 1 mL de estos preinóculos, se sembraron 30 mL de LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron a 37 °C con una agitación de 180 rpm hasta una  $DO_{600}$  entre 0.5-1.0. Posteriormente se añadieron los 30 mL de LB a 1L de medio LB con ampicilina 100 µg/mL, los cuales se incubaron a 37 °C con una agitación de 200 rpm hasta una  $DO_{600}$  entre 0.5-1.0. Una vez que se alcanzó la densidad óptica deseada, se llevaron a cabo las inducciones de los diferentes cultivos durante 3 horas a 37 °C con agitación, mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0.4 mM.

### 3.4.2. Aislamiento de fracciones celulares

Para comprobar si se había sobreexpresado cada una de las proteínas recombinantes (GlnA, GlnA-2 y GlnA-3) se aislaron las siguientes fracciones celulares: fracción del medio extracelular, fracción celular total, fracción citoplasmática soluble y fracción citoplasmática insoluble o cuerpos de inclusión, siguiendo el manual pET System (Novagen). Para cada aislamiento de las fracciones se empleó un protocolo distinto en base al tipo de fracción:

a) Fracción del medio extracelular:

- Tras centrifugar el cultivo a 6500 x g a 4 °C durante 15 minutos, se guardó 1 mL del sobrenadante para analizarlo mediante SDS-PAGE.
- Esa cantidad de sobrenadante se precipitó con ácido tricloroacético al 10 % (p/v). Se realizaron tres lavados con 0.5 mL de acetona fría y 0.5 mL de agua destilada.
- Se añadieron 100 µL de PBS 1X (Anexo II) y 100 µL de tampón de muestra 2X (Anexo II)
- Se incubó durante 10 minutos a 95 °C y se guardó a -20°C hasta que se realizó la electroforesis SDS-PAGE.

b) Fracción celular total:

- El pellet obtenido en el paso anterior se resuspendió en 100 mL Tris-HCl pH 7.5, NaCl 2M y se añadieron lisozima hasta una concentración de 100 µg/mL y Triton X-100 al 0.1 % (v/v).
- Se incubó a 30 °C durante 1 hora. Posteriormente se enfrió 15 minutos en hielo.
- Las células se sonicaron, se tomaron 100 µL del lisado celular y se le añadieron 100 µL de tampón de muestra 2X.
- Se incubó durante 10 minutos a 95 °C y se guardó a -20°C hasta que se analizó mediante SDS-PAGE.

c) Fracción citoplasmática soluble:

- El resto del lisado celular se centrifugó a 10 000 x g a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante era la fracción citoplásmica soluble y el precipitado los cuerpos de inclusión.
- Se tomaron 100 µL de la fracción citoplásmica soluble y 100 µL de tampón de muestra 2X.
- Se incubó durante 10 minutos a 95 °C y se guardó a -20°C hasta que se analizó mediante SDS-PAGE.

d) Fracción citoplasmática insoluble:

- El precipitado del paso c se lavó dos veces con el tampón Tris-HCl pH 7.5, NaCl 2M.
- Se solubilizó con 80 mL de Tris-HCl 20mM, pH 7.5 conteniendo urea 8 M, DTT 50 mM y EDTA 2 mM (tampón de solubilización) a 37 °C durante 5 horas.
- Se tomaron 100 µL de esta fracción y 100 µL de tampón de muestra 2X.
- Se incubó durante 10 minutos a 95 °C y se guardó a -20 °C hasta que se analizó mediante SDS-PAGE.

Estas fracciones se aislaron de los cultivos empleados para la expresión de las proteínas recombinantes, así como de los cultivos control (células transformadas con plásmido sin inserto) para cada una de ellas. Finalmente se realizaron los geles SDS-PAGE al 12 %.

### 3.4.3. Solubilización de los cuerpos de inclusión y renaturalización de la glutamina sintetasa recombinante y de sus isoformas

La solubilización de los cuerpos de inclusión se llevó a cabo utilizando tampones que se componen de agentes caotrópicos con un alto poder desnaturalizante o detergentes, agentes reductores que evitan la formación de puentes disulfuro, agentes quelantes de metales e inhibidores de proteasas (De Bernardez, 2001).

Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, conteniendo urea 8 M, DTT 50 mM y EDTA 2 mM. Se incubaron a 37 °C para conseguir su completa disolución.

La renaturalización se realizó a temperatura ambiente en distintos tampones en los que su composición variaba en la concentración de sal, en la presencia o ausencia de agentes reductores y en el pH.

### 3.4.4. Purificación de la glutamina sintetasa recombinante y de las isoformas GlnA-2 y GlnA-3

La purificación de la glutamina sintetasa y de las isoformas GS, se realizó en dos etapas. Primero, las diferentes muestras se precipitaron en presencia de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 M, para eliminar las proteínas de *E. coli* (no halófilas) por precipitación, mientras se mantenían en disolución cada una de las proteínas halófilas GSs. En segundo lugar, se realizó una cromatografía en DEAE-celulosa. A cada una de las muestras de proteína se le añadió sulfato amónico en sólido, hasta alcanzar una concentración de 2.5 M antes de ser introducidas en las columnas. Dichas muestras, se introdujeron en la columna con ayuda de una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 69 mL/h recogiendo fracciones de 10 mL. Las proteínas retenidas, se lavaron con tres volúmenes de columna con Tris-HCl 20 mM pH 7.5  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 M. Después, la elución se llevó a cabo con Tris-HCl 20 mM pH 7.5 NaCl 2 M recogándose fracciones de 2.5 mL. Por último se midió la absorbancia a 280 nm y la actividad glutamina sintetasa de cada una de las proteínas.

### 3.4.5. Caracterización cinética de la glutamina sintetasa recombinante y efecto de sales, temperatura, pH y efectores

#### 3.4.5.1. Parámetros cinéticos: $K_m$ y $V_{m\acute{a}x}$

Para determinar los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , se analizaron las velocidades iniciales mediante las actividades transferasa (apartado 3.2.4.1.) y biosintética (apartado 3.2.4.2). Para ello, los experimentos se realizaron por triplicado, utilizando diferentes concentraciones para el sustrato de interés de estudio hasta concentraciones saturantes, y manteniendo fijas las concentraciones del resto de sustratos. Las diferentes concentraciones utilizadas fueron: para glutamato entre 1 y 100 mM, para amonio entre 12.5  $\mu$ M y 1.25 mM y entre 2.5 y 50 mM, para ATP entre 0.1 y 5 mM, para glutamina entre 5 y 200 mM, para ADP entre 0.5 y 30  $\mu$ M y para hidroxilamina entre 0.5 y 20 mM. Los parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de regresiones lineales mediante la ecuación (3) de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (3)$$

#### 3.4.5.2. Efecto de la concentración de sal y temperatura sobre la actividad enzimática

Para analizar el efecto de las concentraciones de sal y temperatura sobre la GS, se realizaron medidas de actividad transferasa GS a diferentes concentraciones de sal (bien con NaCl o KCl entre 0.25-2 M) y a distintas temperaturas en un rango que comprendía entre 30 y 60 °C.

#### 3.4.5.3. Efecto del pH sobre la actividad

Para el estudio del efecto del pH sobre la actividad transferasa de la enzima recombinante, se utilizó un rango de pH entre 6.0 y 9.0. Las medidas de actividad se efectuaron a una temperatura de 40 °C durante 40 minutos. Para ello, se utilizaron tampones con NaCl 2 M usando MOPS 0.25 M para valores de pH entre 6.0 y 8.0 y Tris-HCl 0.3 M para rangos de pH entre 7.0 y 9.0.

#### **3.4.5.4. Efecto de iones divalentes, 2-oxoglutarato y glutamina sobre la actividad**

Se analizaron diferentes concentraciones de iones metálicos mediante la actividad biosintética empleando por una parte, distintas concentraciones de magnesio en el rango de 0 a 50 mM y por otra, diferentes concentraciones de manganeso entre 0 y 10 mM. Además, se estudió el efecto del 2-oxoglutarato determinando la actividad GS a concentraciones entre 0 y 30 mM del mismo, y en presencia de manganeso 50 mM. Para determinar el efecto que ejerce la glutamina sobre la enzima recombinante se utilizaron diferentes concentraciones entre 0 y 20 mM.

### **3.5. Propiedades moleculares y estructura cuaternaria**

#### **3.5.1. Determinación del tamaño de subunidad mediante PAGE-SDS**

Se realizó un gel de poliacrilamida en presencia de SDS, cargando las muestras de interés (GS recombinante y las isoformas de glutamina sintetasa) junto con los patrones de proteínas de masa molecular ( $M_r$ ) de subunidad conocida. Se han utilizado patrones de la casa Thermo Scientific (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) constituidos por una mezcla de nueve proteínas recombinantes con un rango entre 10-250 kDa. Tras realizar la electroforesis y teñir el gel con azul Coomassie, se determinó la movilidad electroforética relativa ( $R_f$ ) de cada una de las proteínas patrón y la de las proteínas recombinantes. Las masas moleculares de subunidad se calcularon a partir de la recta obtenida, al representar el logaritmo de la masa molecular de subunidad frente a  $R_f$ .

#### **3.5.2. Determinación de la masa molecular mediante filtración en gel**

La masa molecular de la glutamina sintetasa recombinante se determinó mediante una cromatografía de exclusión molecular. Este tipo de cromatografía permite la separación de moléculas en función del tamaño y la obtención de la masa molecular de las mismas mediante una calibración previa. Para determinar la  $M_r$  de la proteína GS recombinante se calibró la columna de exclusión molecular Sephacryl S-300, con proteínas de  $M_r$  conocida. Se calcularon los coeficientes de partición ( $K_{av}$ ) a partir de los volúmenes de elución de cada una de las proteínas patrón, mediante la siguiente expresión (4):

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

$V_e$  = volumen de elución de la proteína

$V_o$  = volumen muerto de la columna (4)

$V_t$  = volumen total de la columna

Después, se realizó la representación del logaritmo de la masa molecular frente al  $K_{av}$  para determinar el peso molecular de la proteína recombinante.

### 3.5.3. Determinación de la masa molecular mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

La masa molecular de la proteína se estimó empleando una columna BioSep-SEC-S4000 (7.8 mm x 300 mm), que consiste en una columna de filtración en gel basada en sílica-gel. El análisis se realizó con un sistema Agilent 1100 equipado con un detector de ultravioleta y de fluorescencia.

La cromatografía de filtración en gel BioSep-SEC-S4000 (Phenomenex, CA) se realizó a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min con una fase móvil de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.8, utilizando proteínas de  $M_r$  conocida para su calibración. Se calcularon los coeficientes de partición ( $K_{av}$ ) a partir de los tiempos de retención de cada una de las proteínas patrón.

Después, se realizó la representación del logaritmo de la masa molecular frente al  $K_{av}$  para determinar el peso molecular de la proteína GS, tanto recombinante como nativa.

### 3.5.4. Cross-linking de la glutamina sintetasa

Para determinar la estructura cuaternaria de la GS recombinante se realizaron estudios de *cross-linking*. Esta técnica permite unir químicamente dos o más moléculas mediante un enlace covalente. Se utilizaron los *crosslinkers* 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y dimetilsuberimidato (DMS). En cuanto al DMS, primeramente la proteína se dializó frente a Trietanolamina-HCl 0.2 M pH 8.5. A continuación, se probaron concentraciones crecientes de proteína, entre 1 y 8 mg/mL con una cantidad fija de DMS (3 mg/mL). Posteriormente, la enzima recombinante purificada a

una concentración de 15 mg/mL fue entrecruzada con dimetilsuberimidato a una concentración final de 3 mg/mL. Se llevó simultáneamente una muestra control en ausencia de DMS. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 3 h. Finalmente, las proteínas se desnaturalizaron a 37 °C durante 2 h en el tampón de muestra (Anexo II) y se cargaron en un PAGE-SDS en gradiente 4-20 %. Respecto al *crosslinker* EDC, la proteína GS se cambió al tampón fosfato 20 mM pH 7.5 NaCl 2M mediante la columna Sephadex-G50 fina (GE Healthcare). A continuación, se ensayaron diferentes concentraciones (entre 0.5 y 2 mg/mL) de la enzima recombinante purificada para entrecruzarla con una concentración fija de EDC (8mM). También se analizaron distintas concentraciones de EDC (entre 4 y 15 mM) dejando fija la concentración de proteína recombinante (0.5 mg/mL), y se llevó simultáneamente un control en ausencia de EDC. Por último, las reacciones de entrecruzamiento se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se terminó mediante la adición de ácido tricloroacético al 10 %, y se continuó con el tratamiento de precipitación de proteínas (apartado 3.4.2.a) para finalmente añadir el tampón de muestra (Anexo II).

### **3.5.5. Determinación de la masa molecular mediante ultracentrifugación analítica (velocidad de sedimentación) y dispersión de luz dinámica (DLS)**

La masa molecular de la GS recombinante se determinó mediante la combinación del coeficiente de sedimentación (S) (obtenido a partir de la velocidad de sedimentación), y el coeficiente de difusión (D) (proporcionado mediante la dispersión de luz dinámica). Por lo tanto, el tamaño de la proteína se calculó con la ecuación de Svedberg (Ec. (5)), la cual permite relacionar ambos parámetros con la masa molecular de la enzima recombinante. La AUC es una técnica que permite determinar el tamaño y la forma aproximada de las proteínas así como la detección y cuantificación de las interacciones macromoleculares en solución combinando dos técnicas, la velocidad de sedimentación y el equilibrio de sedimentación (Cole *et al.*, 2008).

$$S = MD \frac{(1-\bar{v}\rho)}{RT} \quad (5)$$

S: Coeficiente de sedimentación (en segundos  $1S = 10^{-13}$  s)

M: Masa molecular

D: Coeficiente de difusión ( $m^2/s$ )

$\bar{v}$ : Volumen específico parcial de la proteína (mL/g)

$\rho$ : Densidad del solvente (g/mL)

R: Constante universal de los gases (8.31 J/Kmol)

Los experimentos de velocidad de sedimentación se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A I equipada con un sistema óptico de medida UV-visible o en una Optima XL-I equipada también con un sistema de detección mediante interferencia. Las muestras se centrifugaron a 35 000 rpm a 20 °C durante 4 h y se midió la absorbancia a 280 nm. Los datos de los perfiles de sedimentación obtenidos, se analizaron utilizando el modelo de distribución  $c(s)$  (concentración de especies que sedimentan con un coeficiente de sedimentación  $S$ ) proporcionado por el programa SEDFIT (Schuck, 2000). Dichos valores de  $S$  de cada una de las especies, se corrigieron a las condiciones estándar de agua y 20 °C con el programa SEDNTERP, obteniéndose así el correspondiente  $S_{20,w}$  (van Holde y Miller, 1985).

Posteriormente, el experimento de DLS, se realizó a las dos fracciones de GS recombinante (31 y 32) en presencia de ADP y  $MgCl_2$  en un aparato Protein Solution DynaPro MS/X equipado con un láser de longitud de onda de 824.7 nm. Se calcularon los coeficientes de difusión a partir de a partir del análisis mediante regularización de las curvas de autocorrelación con el programa Dynamics V6 Software (Wyatt Technology Corp.).

Ambas técnicas se realizaron en colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) en la unidad de Ultracentrifugación Analítica y Dispersión de Luz.

### 3.6. Identificación de glutaminas sintetasas mediante espectrometría de masas

#### 3.6.1. Digestión de proteínas en gel con tripsina

Las proteínas recombinantes recuperadas de los geles de acrilamida son digeridas de manera automática mediante el empleo de proteasas, generalmente tripsina, con el equipo de digestión ProGest (Genomic solutions, Cambridgeshire, UK) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para muestras teñidas con azul *Coomassie* R-250. Las bandas del gel se lavaron con bicarbonato de amonio 25 mM y agua, eliminando así las impurezas del colorante y del detergente SDS, previamente a su reducción con DTT 10 mM y alquilación con yodoacetamida 100 mM en 50 mM de bicarbonato amónico. A continuación, estas bandas fueron digeridas con tripsina porcina modificada (Promega, Madison WI) a una concentración final de 0.15 µg en bicarbonato amónico 25 mM a 37 °C durante 6-7 horas (Shevchenko *et al.*, 1996). Finalmente, los péptidos obtenidos de la digestión de proteínas se extrajeron con bicarbonato de amonio, posteriormente se trataron con acetonitrilo (ACN) al 70 % y finalmente con ácido fórmico al 1 %. Los péptidos extraídos se secaron en una centrífuga de mesa a vacío, y posteriormente se resuspendieron en 10 µL de ácido fórmico al 0.1 %. A continuación, se procedió al análisis nano-ESI LC-MS/MS.

#### 3.6.2. Separación y detección de péptidos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Los análisis de LC-MS/MS se realizaron utilizando un sistema de Agilent 1100 series nano-HPLC en línea con un espectrómetro de trampa de iones XCT plus (Agilent) equipado con una fuente nano-ESI. De hecho, tras la desalación y concentración de la muestra en una columna de enriquecimiento Zorbax 300SB-C18 (0.3 x 5 mm, 5 µm), se realizó la separación de los péptidos en una columna de fase reversa Zorbax 300SB-C18 (75 mm ID x 15 cm, 3.5 µm) mediante el empleo de un gradiente lineal de ACN 5-40 % frente a ácido fórmico 0.1 % (v/v).

La digestión de proteínas en gel con tripsina y esta técnica se realizaron en los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Alicante.

### 3.6.3. Identificación de péptidos y proteínas

Tras la obtención de los espectros de masas se utilizó el *software* Spectrum Mill Proteomics Workbench, para la identificación de las proteínas de interés. Para ello, mediante la herramienta de extracción de Spectrum Mill Proteomics Workbench se combinan los conjuntos de espectros MS/MS que contienen el mismo precursor para crear espectros de mayor calidad. La combinación de estos espectros se efectúa considerando los espectros en donde la diferencia en  $m/z$  sea inferior a 1.4 y la diferencia en el tiempo de elución se encuentre por debajo de 15 segundos. Cada uno de los espectros se comparó frente a la base de datos de proteínas NCBI de *Haloflex* en modo identidad, utilizando la herramienta de búsqueda MS/MS de dicho programa y empleando las condiciones que se enumeran a continuación: digestión con tripsina, se permitían dos fallos como máximo en el corte con tripsina, modificación fija de carbamidometilación en cisteína y oxidación de metionina, masas monoisotópicas y una tolerancia de masa del precursor  $< 2.5$  Da. Posteriormente, los péptidos obtenidos se validaron primero en modo péptido (fdr 1.2%) y después en modo proteína, en el cual el *score* de la proteína debe ser mayor de 20.

El *score* en MS/MS se calcula a partir de la suma de cada una de las masas interpretadas del espectro experimental respecto del espectro teórico que se obtiene a partir de las bases de datos. El SPI (%) se refiere al porcentaje de intensidad del espectro interpretado. Por lo que, una buena interpretación del espectro se basa en que contenga un *score*  $> 13$  y un SPI  $> 70$  % (espectro muy bueno). O un *score*  $> 10$  y un SPI  $> 70$  % (buen espectro). Los espectros de calidad media pueden ser validados en modo proteína si la misma acumula un *score* superior a 20.

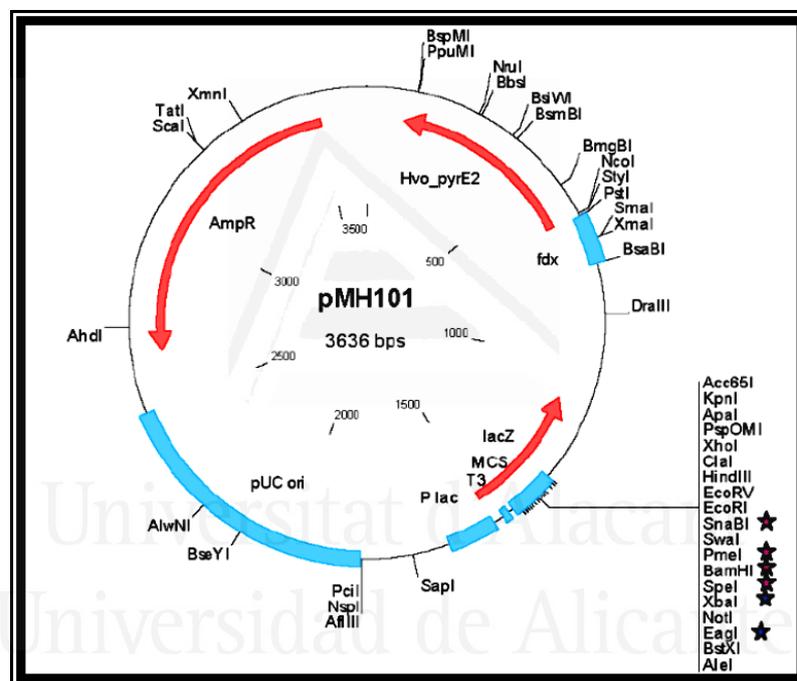
## 3.7. Construcción de mutantes de delección de *glnA* y *glnA-3* de *Hfx. mediterranei*

### 3.7.1. Construcción del plásmido suicida

Se utilizó el plásmido pMH101N el cual es incapaz de replicarse de manera autónoma puesto que no contiene origen de replicación en haloarqueas y además presenta un gen de resistencia a novobiocina (*gyrB* de *Hfx. lucentense*). Dicho plásmido se generó a partir del plásmido pMH101 (Figura 19) que a su vez era un derivado del plásmido pTA131 con sitios de reconocimiento para *Sna*BI, *Swa*I y *Pme*I, y contiene una copia del

gen *pyrE2* (marcador de selección) (Pedro-Roig, 2012). Por lo tanto, el plásmido suicida se caracterizaba porque contenía la versión deletada del gen de interés, en este caso, *glnA* y *glnA-3*, que codifican GS y la isoforma de GS respectivamente.

Finalmente, para la construcción del plásmido suicida se realizó la ligación del plásmido pMH101N con el fragmento de 1000 pb (generado tras fusionar dos fragmentos de 500 pb que flanqueaban al gen de interés) permitiendo así la generación de los mutantes *knockout* para GS y GlnA-3.



**Figura 19:** Mapa del plásmido pMH101. Los sitios de clonación de extremos romos se muestran con estrellas de color púrpura (Pedro-Roig, 2012).

### 3.7.2. PCR de amplificación del DNA genómico

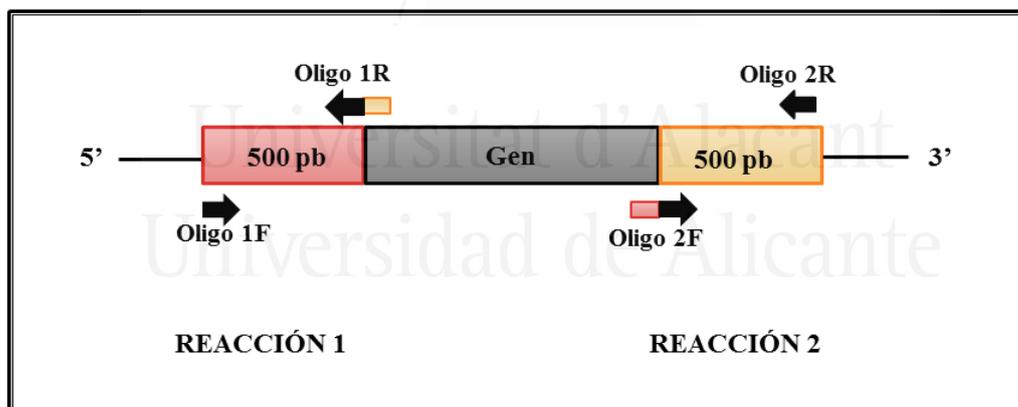
Inicialmente se realizó la PCR de amplificación del DNA genómico de *Hfx. mediterranei* (previamente aislado como se ha descrito en el apartado 3.3.1.) para amplificar dos fragmentos de 500 pb aguas arriba y aguas abajo tanto del gen *glnA* como

de *glnA-3* (Figura 20). Los oligonucleótidos y las temperaturas de hibridación se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Condiciones de PCR para la amplificación de DNA genómico de los genes *glnA* y *glnA-3*.

Deleción del gen	Nº de fragmento	Cebadores	T hibridación (°C)	Producto (pb)
<i>glnA</i>	PCR1	GS1F y GS1R	60	502
	PCR2	GS2F y GS2R	60	501
<i>glnA-3</i>	PCR3	GSA3-1F y GSA3-1R	60	509
	PCR4	GSA3-2F y GSA3-2R	60	509

Se realizaron 2 reacciones de PCR utilizando la DNA polimerasa de alta fidelidad KOD Hot Start (Novagen) (Tabla 6). Para cada una de las reacciones se utilizó los cebadores del gen *glnA* (GS1F, GS1R y GS2F, GS2R) y los cebadores del gen *glnA-3* (GSA3-1F, GSA3-1R y GSA3-2F y GSA3-2R). Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en el Anexo III.

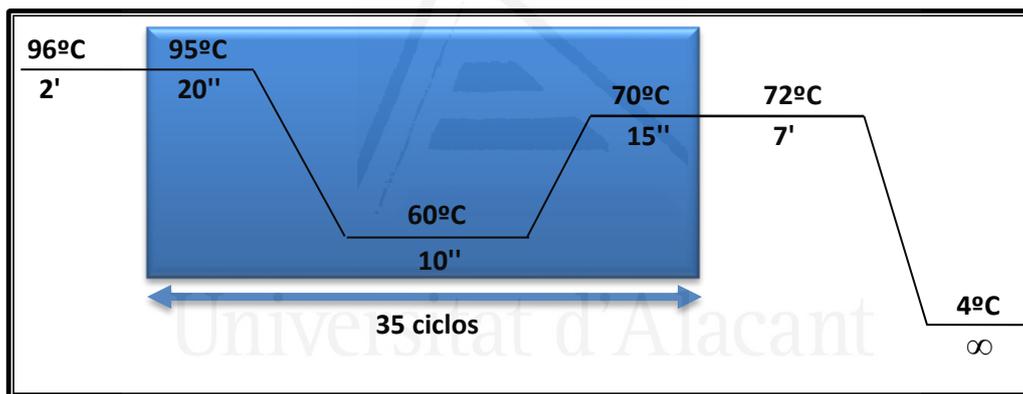


**Figura 20:** Amplificación de las bandas de 500 pb.

**Tabla 6:** Concentración de los reactivos empleados para la amplificación de las bandas de 500 pb.

Reactivos	Reacción 1	Reacción 2
	Concentración	Concentración
Tampón PCR 10X	1X	1X
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	1.5 mM	1.5 mM
dNTPs (2 mM)	0.2 mM	0.2mM
Oligo 1F (100 pmol/μL)	2 pmol/μL	-
Oligo 1R (100 pmol/μL)	2 pmol/μL	-
Oligo 2F (100 pmol/μL)	-	2 pmol/μL
Oligo 2R (100 pmol/μL)	-	2 pmol/μL
DNA genómico	1 μg	1 μg
DNA polimerasa (5 U/μL)	1 U/ μL	1 U/ μL
Agua ultrapura	Hasta un volumen de 50 μL	Hasta un volumen de 50 μL

Las condiciones que se usaron para la realización de la PCR se describen en la Figura 21.



**Figura 21:** Programa de PCR para la amplificación de los fragmentos de 500 pb de los genes *glnA* y *glnA-3* de *Hfx. mediterranei*.

Después, tras la finalización de la PCR se realizó una electroforesis de agarosa al 1% (p/v) para comprobar si cada uno de los fragmentos de 500 pb se habían amplificado, para después purificarlos mediante el kit “Gel extraction-Spin protocol” (Omega Biotek).

### 3.7.3. PCR de fusión

Una vez se obtuvieron las bandas de 500 pb para cada uno de los genes, se realizó la PCR de fusión a partir de las mismas, generándose así el producto de 1000 pb (versión delecionada de cada uno de los genes). Dicha PCR se efectuó mediante dos etapas, en la primera, en ausencia de cebadores, se produjo la hibridación entre ambas bandas (*fill-in*) a partir de las secuencias conservadas de los extremos, formándose el fragmento de 1000 pb. La reacción de PCR utilizada para el *fill-in* se describe en la Tabla 7. Posteriormente, en la segunda etapa, mediante la adición de los oligonucleótidos para cada uno de los genes (Tabla 8) se realizó la amplificación de dicho fragmento de 1000 pb.

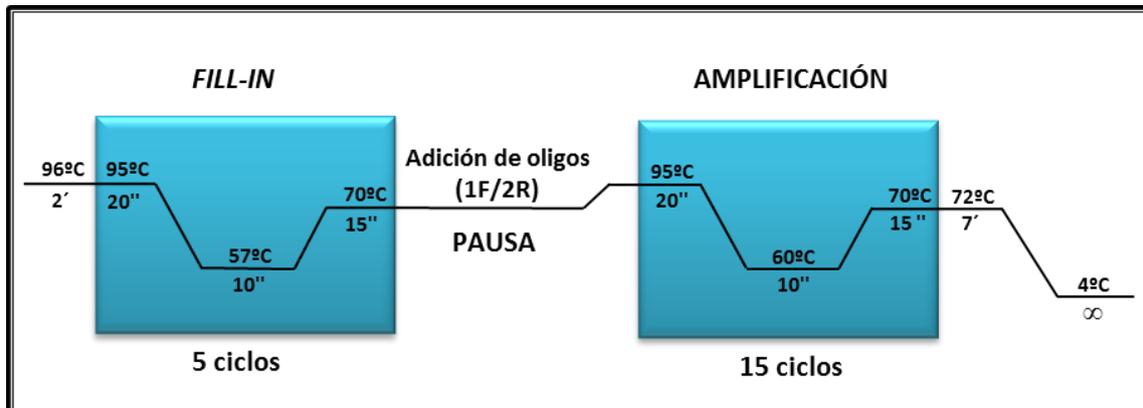
**Tabla 7:** Concentración de los reactivos empleados para la etapa de *fill-in*.

Reactivos	Concentración
Tampón PCR (10X)	1 X
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	1.5 mM
dNTPs (2 mM)	0.2 mM
Fragmento 500 pb (reacción1)	100 ng
Fragmento 500 pb (reacción 2)	100 ng
DNA polimerasa (5 U/μL)	1 U/ μL
Agua ultrapura	Hasta un volumen final de 50 μL

**Tabla 8:** Condiciones de la PCR de fusión.

Delección del gen	Cebadores	T hibridación (°C): Fill-in/amplificación	Producto (pb)
<i>glnA</i>	GS1F y GS2R	57/60	1003
<i>glnA-3</i>	GSA3-1F y GSA3-2R	57/60	1018

El programa de PCR empleado para la generación del fragmento de 1000 pb se muestra en la Figura 22.



**Figura 22:** Programa de PCR para la generación de la banda de 1000 pb.

De nuevo se llevó a cabo una electroforesis de agarosa al 1 % para la posterior purificación de las bandas de 1000 pb para cada uno de los genes *glnA* y *glnA-3* mediante el kit “Gel extraction-Spin protocol” de Omega Biotek.

#### 3.7.4. Ligación del producto de fusión en el vector pMH101N

El paso previo a la reacción de ligación, fue la digestión del vector pMH101N con la enzima de restricción *SnaBI* (Thermo Scientific), la cual generaba extremos romos, produciendo una versión lineal de dicho vector. La digestión se incubó a 37 °C durante 2 horas (Tabla 9).

**Tabla 9:** Concentraciones de los componentes de la reacción de digestión del vector pMH101N.

Reactivos	Concentración
pMH101 N	1 µg
<i>Fast digest buffer</i> (10X)	1 X
<i>SnaBI</i> (10 U/ µL)	1 U/ µL
Agua ultrapura	Hasta un volumen final de 20 µL

Posteriormente se realizó una electroforesis del producto de digestión en un gel de agarosa 1 % en tampón TAE 1X. A continuación, una vez se comprobó que el plásmido se había digerido correctamente, se purificó la banda con el kit “Gel extraction-Spin protocol” (Omega Biotek).

La ligación se realizó, en presencia de la enzima de restricción *SnaBI*, evitando así la posible recircularización del vector, con el tampón de dicha enzima, y adicionando 0.5 mM de ATP, necesario para el funcionamiento de la T4 DNA Ligasa (Roche). La reacción de ligación se realizó a temperatura ambiente durante 4 horas en un volumen final de 20  $\mu$ L (Tabla 10).

**Tabla 10:** Concentración de los componentes de la reacción de ligación del producto de fusión con el vector pMH101N.

Reactivos	Concentración
pMH101N	100 ng
Producto de fusión	50 ng
<i>Fast digest buffer</i> (10X)	1 X
<i>SnaBI</i>	1 U
ATP	0.5 mM
T4 DNA ligasa	1 U/ $\mu$ L
Agua ultrapura	Hasta un volumen final de 20 $\mu$ L

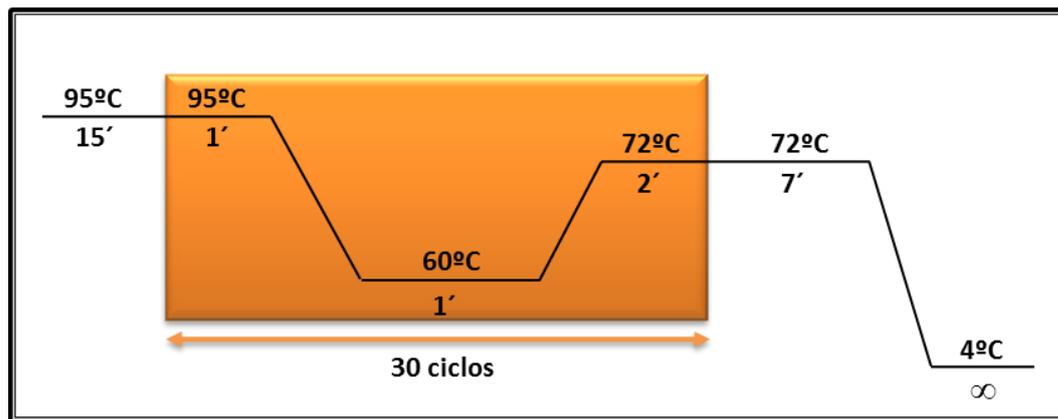
Después se procedió a la transformación de células *E. coli* JM110 con la reacción de ligación y se sembraron en placas de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Se utilizó esta cepa porque era deficiente en metilasas, permitiendo así la posterior transformación en *Hfx. mediterranei*. Debido a que el plásmido confería resistencia a ampicilina, sólo crecieron aquellas colonias que incorporaron dicho plásmido con el producto de fusión. Posteriormente, para descartar los falsos positivos se llevó a cabo una PCR *screening* de las colonias, para comprobar que las que habían crecido contenían el fragmento de 1000 pb. Para ello, se utilizaron los oligos de los extremos GS1F y GS2R, para GS y GSA3-1F y GSA3-2R para GlnA-3.

Con la amplificación del DNA a partir de las colonias, se pretendía obtener un fragmento de 1000 pb (producto de fusión) que se correspondía con la versión delecionada del gen. Para ello, cada colonia, se replicó en una placa nueva de LB con ampicilina 100 µg/ml, y se resuspendió en 10 µl de agua ultrapura (lisis osmótica). Además, el programa de PCR contenía 15 minutos iniciales a 95 °C para la lisis de las colonias también mediante choque térmico, y 60 °C de *annealing*. Se preparó una mezcla de PCR (Tabla 11) repartiendo 12 µl de la mezcla en cada tubo que contenía los 10 µl de las colonias.

**Tabla 11:** Concentraciones de los componentes de la mezcla de PCR para la reacción de PCR *screening* de las colonias.

Reactivos	Concentración
Tampón PCR (10X)	1X
dNTPs (10mM)	0.16 mM
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 mM
Oligo 1F (100 pmol/µL)	2 pmol/µL
Oligo 2R (100 pmol/µL)	2 pmol/µL
DNA polimerasa (2.5 U/ µL)	1 U/µL
Agua ultrapura	Hasta un volumen final de 400 µL

La reacción de PCR se realizó en las condiciones que se muestran en la Figura 23. Después se llevó a cabo una electroforesis de agarosa al 1 %, y se procedió a la selección de las colonias que contenían el inserto de 1000 pb. Posteriormente, se crecieron en medio líquido LB con ampicilina 100 µg/ml para el posterior aislamiento de los plásmidos. Por último, se secuenciaron los plásmidos con los oligos M13-20 y pMH101N-RevSeq que flanqueaban el *cassette* de deleción para comprobar que el inserto de 1000 pb estaba completo y situado correctamente en el vector.



**Figura 23:** Programa empleado para la PCR *screening* de las colonias.

### 3.7.5. Transformación de las células HM26 ( $\Delta pyrE2$ ) con el plásmido suicida

Tras la construcción del plásmido suicida, se realizó la transformación de las células de *Hfx. mediterranei* cepa HM26 con las construcciones pMH101N- $\Delta glnA$  y pMH101N- $\Delta glnA-3$ . El protocolo de transformación se realizó siguiendo el método descrito por Pedro-Roig (Pedro-Roig, 2012). Posteriormente, las células transformadas se sembraron en medio definido para *Hfx. mediterranei* (Anexo II) y se incubaron a 42°C durante 3-4 días. En este medio sólo crecieron aquellas colonias que contenían el plásmido suicida, puesto que la cepa HM26 ( $\Delta pyrE2$ ) era incapaz de crecer en medio definido en ausencia de uracilo. Una vez crecieron dichas colonias, se realizaron réplicas en placa, y se eligieron 6 colonias, que se correspondían con los mutantes 7, 17, 19, 31, 32 y 33 para la construcción pMH101N- $\Delta glnA$  y 4 colonias que se correspondían con los mutantes 1, 2, 3 y 4 para la construcción pMH101N- $\Delta glnA-3$ .

### 3.7.6. Cultivo de los mutantes *pop-in* en medio definido

Cada una de las colonias elegidas (7, 17, 19, 31, 32 y 33) para el gen *glnA*, y cada una de las 4 colonias seleccionadas (1, 2, 3 y 4) para *glnA-3*, se inocularon en medio líquido definido para *Hfx. mediterranei* en ausencia de uracilo. En el caso de *glnA-3*, el medio se suplementó con gln 40 mM. Se incubaron 42 °C con una agitación de 180 rpm durante 7 días. A partir de este cultivo inicial de cada uno de los mutantes *pop-in*, se

llevaron a cabo un total de 5 subcultivos que se dejaron crecer hasta la fase estacionaria con  $DO_{600}$  alrededor de 4.

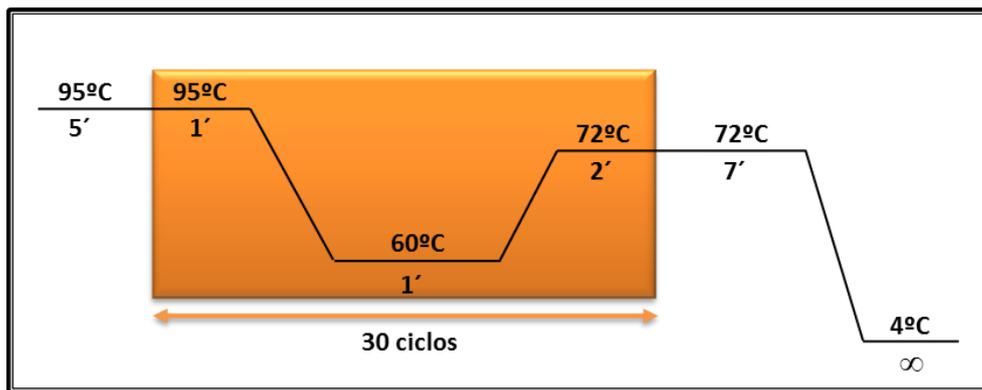
### 3.7.7. Comprobación de los mutantes *pop-in* mediante PCR screening

La PCR *screening* se efectuó para la comprobación de los mutantes *pop-in* para el gen *glnA* y el *glnA-3*. Primeramente se aisló el DNA de cada uno de los seis mutantes de la GS y cada uno de los cuatro para la GlnA-3 en el quinto subcultivo, para poder confirmar si las células contenían tanto la versión original como la delecionada para el gen *glnA* y para el gen *glnA-3* de *Hfx. mediterranei*. Posteriormente, los DNAs se visualizaron en un gel de agarosa al 1 % (p/v). Seguidamente, se amplificó el DNA genómico de cada uno de los mutantes *pop-in* y de la cepa HM26 (DNA control) empleando los oligos de los extremos 1F y 2R, se utilizó la reacción de PCR que se describe en la Tabla 12.

**Tabla 12:** Concentraciones de los componentes de la reacción de PCR screening.

Reactivos	Concentración
Tampón PCR (10X)	1X
dNTPs (10mM)	0.16 mM
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.5 mM
DNA genómico mutantes	800 ng
Oligo 1F (100 pmol/μL)	2 pmol/μL
Oligo 2R (100 pmol/μL)	2 pmol/μL
DNA polimerasa (5 U/ μL)	1 U/ μL
Agua ultrapura	Hasta un volumen final de 400 μL

Dicha reacción de PCR se realizó en las condiciones que se muestran en la Figura 24.



**Figura 24:** Programa de PCR *screening* a partir del DNA aislado, que se empleó para los mutantes *pop-in*, *pop-out* y HM26.

Posteriormente, tras finalizar la PCR, los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa 1 % para comprobar así la presencia del gen *glnA* y *glnA-3* y cada una de sus versiones delecionadas.

### 3.7.8. Cultivo de los mutantes *pop-out* en medio complejo con 5-FOA

En el caso del mutante de *glnA*, tras comprobar cada uno de los mutantes *pop-in* a partir del quinto subcultivo, cada uno de ellos se sembró en placas de medio complejo para *Hfx. mediterranei* (Anexo II) suplementado con 5-FOA (750 µg/mL). Después, se incubaron a 42 °C durante 3 días. Posteriormente, se inocularon en medio complejo líquido con 5-FOA (750 µg/mL), cada una de las colonias aisladas de cada una de las placas de los 6 mutantes. A continuación, se incubaron a 42 °C y con una agitación de 180 rpm, creciendo los mutantes *pop-out* durante varias generaciones para que se produjera el segundo evento de recombinación homóloga, eliminándose así el plásmido suicida y junto con él una de las copias del gen, la delecionada o la original. A partir de este cultivo inicial, se realizaron un total de 5 subcultivos. Finalmente, el quinto subcultivo de los mutantes *pop-out* de la glutamina sintetasa se pasó a placas de medio complejo para *Hfx. mediterranei* suplementado con 5-FOA (750 µg/ml) para obtener colonias aisladas de cada uno de los mutantes y comprobar que se había delecionado el gen *glnA*. Por otro lado, en el caso del mutante de *glnA-3*, una vez comprobados los mutantes *pop-in*, cada uno de ellos se sembró en placas de medio complejo para *Hfx. mediterranei* suplementado con 5-FOA (750 µg/mL) y *gln* 40 mM realizándose el mismo proceso que el empleado para el otro mutante.

### 3.7.9. Comprobación de los mutantes *pop-out* mediante PCR *screening* y *Southern blot*

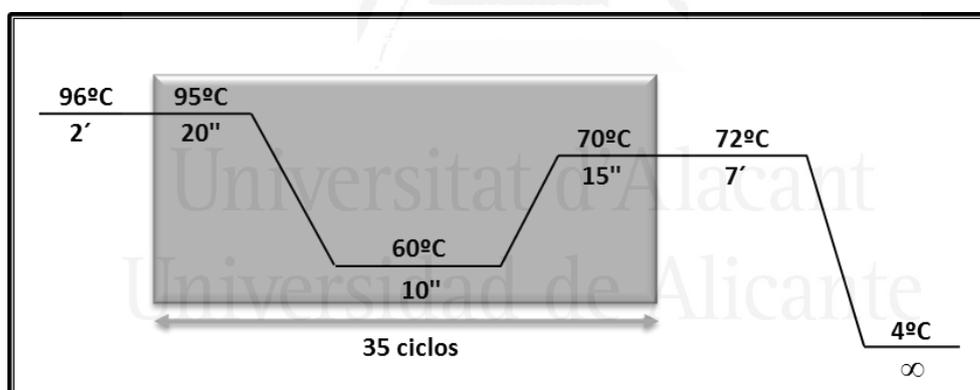
Para comprobar los mutantes *pop-out* por PCR *screening*, en el caso de la glutamina sintetasa, se escogieron primero 42 colonias (7 colonias de cada uno de los seis mutantes *pop-out*), y se crecieron en medio complejo líquido suplementado con 5-FOA 750 µg/mL para después proceder al aislamiento del DNA genómico de los 42 cultivos. Posteriormente, se realizó la PCR *screening*, en las mismas condiciones que con los mutantes *pop-in* (Figura 24) y utilizando las mismas concentraciones de reactivos y los mismos oligos. Sin embargo, para GlnA-3 se eligieron un total de 20 colonias que procedían de los cuatro mutantes *pop-out*. A continuación, se aisló el DNA a partir de cada una de las colonias mediante un método rápido alternativo descrito en el manual “Halohandbook” (Dyall-Smith, 2009), y se realizó la PCR *screening* en las mismas condiciones que en la Figura 23, a excepción de que se utilizaron 2 µL del lisado de células para la amplificación de los productos de PCR. Finalmente, se realizaron las electroforesis de agarosa al 1 % para la visualización de los fragmentos obtenidos con la PCR *screening*.

El *Southern blot* es una técnica que permite transferir fragmentos de DNA contenidos en un gel de electroforesis de agarosa a una membrana de nylon. Después, mediante la desnaturalización del DNA por tratamiento alcalino, el DNA se hibridará con una sonda marcada (Southern, 1975). Se procedió a la generación de dicha sonda mediante marcaje inmunológico. Para ello, se amplificó un fragmento de 490 pb situado aguas abajo del gen *glnA* mediante PCR, empleando los oligos GS2F/GS2R y los nucleótidos marcados con digoxigenina mediante el kit “PCR DIG Probe Synthesis” de Roche Molecular Biochemicals (Tabla 13).

**Tabla 13:** Concentraciones de los componentes de la reacción de PCR para sintetizar la sonda de GS.

Reactivos	Concentración
Tampón PCR (10X)	1 X
dNTPs (2mM)	0.2 mM
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	1.5 mM
DIG-dUTPs	0.1 mM
DNA genómico <i>Hfx. mediterranei</i>	1 µg
Oligo GS2F (100 pmol/µL)	2 pmol/µL
Oligo GS2R (100 pmol/µL)	2 pmol/µL
DNA polimerasa (5 U/ µL)	1 U/ µL
Agua ultrapura	Hasta un volumen final de 50 µL

La reacción de PCR se realizó en las condiciones que se describen a continuación (Figura 25).

**Figura 25:** Programa de PCR para la generación de la sonda de la glutamina sintetasa.

Posteriormente, se llevó a cabo el *Dot blot* para saber que concentración de la sonda se tenía que emplear. Dicha técnica consistía en fijar en una membrana de nylon Hybond H+ (GE Healthcare) 1 µl de las diluciones de un DNA control marcado de concentración conocida desde 1 ng/µL hasta 0.05 pg/µL (Boehringer Mannheim) y diferentes diluciones de la sonda desde 1:10<sup>5</sup> hasta 1:10 y también sin diluir.

Se realizó un estudio bioinformático para que una vez se conociera el número de sitios de corte, elegir así la enzima de restricción apropiada. De hecho, se eligió la enzima *PdmI* que presentaba 3 sitios de corte en la secuencia de interés de estudio cuando contenía el gen *glnA*, y 2 sitios de corte cuando presentaba la delección del mismo. Es decir, si había delección de *glnA* se generaba un fragmento de 4580 pb que hibridaba con la sonda. En cambio, si no se producía la delección, se generaban 3 fragmentos de un tamaño de 2340 pb, 5940 pb y 3600 pb, pudiéndose detectar únicamente los dos primeros fragmentos con la sonda de *glnA*.

A continuación, se realizó la digestión de los DNAs aislados (procedentes de los mutantes *pop-out*) con la enzima de restricción *PdmI* (Thermo Scientific) a 37 °C durante 2 horas. Se digirieron 3 µg de DNA, utilizando el tampón de la enzima (FastDigest). Seguidamente, se realizó una electroforesis en agarosa al 1 % para confirmar que la digestión del DNA se había producido correctamente. Finalmente, se realizó la desnaturalización y neutralización del gel siguiendo el protocolo descrito en el manual DIG Manual System de Roche. El gel se transfirió a una membrana de nylon (Hybond H+, GE Healthcare) empleando el tampón 2X SSC (NaCl 300 mM, citrato sódico 30 mM, pH 7.0) mediante capilaridad *overnight*. Posteriormente, los fragmentos de DNA se fijaron en la membrana con radiación UV antes de la hibridación. Por último, la prehibridación, hibridación y detección quimioluminiscente se llevó a cabo como se describe en DIG Manual System (Roche), empleando un tiempo de prehibridación de 2 horas a 65 °C y un tiempo de hibridación *overnight* a la misma temperatura.

### 3.8. Caracterización fisiológica del mutante HM26-A ( $\Delta$ *pyrE2* $\Delta$ *glnA*)

La caracterización de los mutantes para el gen *glnA* se efectuó estudiando el crecimiento fisiológico y la estabilidad de la mutación frente a la cepa parental HM26 ( $\Delta$ *pyrE2*). Todos los cultivos se inocularon con células preadaptadas al medio, inoculadas en mitad de fase exponencial y con DO<sub>600</sub> iniciales de 0.02. Los inóculos previamente a ser utilizados, se sembraban en placas de medio definido para *Hfx. mediterranei* carentes de uracilo, para confirmar que dichas cepas eran incapaces de crecer en un medio carente de uracilo y descartar así la contaminación de los inóculos. Para confirmar que la delección de *glnA* era estable durante el crecimiento en los diferentes medios de cultivo analizados, se

realizó PCR *screening*, *Southern blot* y/o *Western blot*, a partir de alícuotas tomadas en las distintas fases de crecimiento.

Primeramente, se estudió la estabilidad de la mutación mediante PCR *screening* tras el cultivo en medio definido con glucosa al 1 % como fuente de carbono, NH<sub>4</sub>Cl 40 mM como fuente de nitrógeno y uracilo 50 µg/ml, suplementado o no con Gln 5 mM. Posteriormente, se analizó el efecto de la concentración de Gln (0, 1, 3 y 5 mM) en la estabilidad de la delección en medio definido con glucosa 1 %, NH<sub>4</sub>Cl 10 mM y uracilo 50 µg/ml, mediante PCR *screening* y *Southern blot*.

Finalmente, se analizó también la estabilidad de la delección en medio carente de nitrógeno durante 24, 48 y 72 horas mediante las técnicas de PCR *screening*, *Southern blot* y *Western blot*. A partir de estos cultivos, se tomaron alícuotas a las 24, 48 y 72 h de carencia de nitrógeno, para la posterior extracción de DNA y para la preparación de los extractos de proteína.

### **3.9 Análisis del transcriptoma de *Hfx. mediterranei* en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno**

#### **3.9.1. Arrays de expresión**

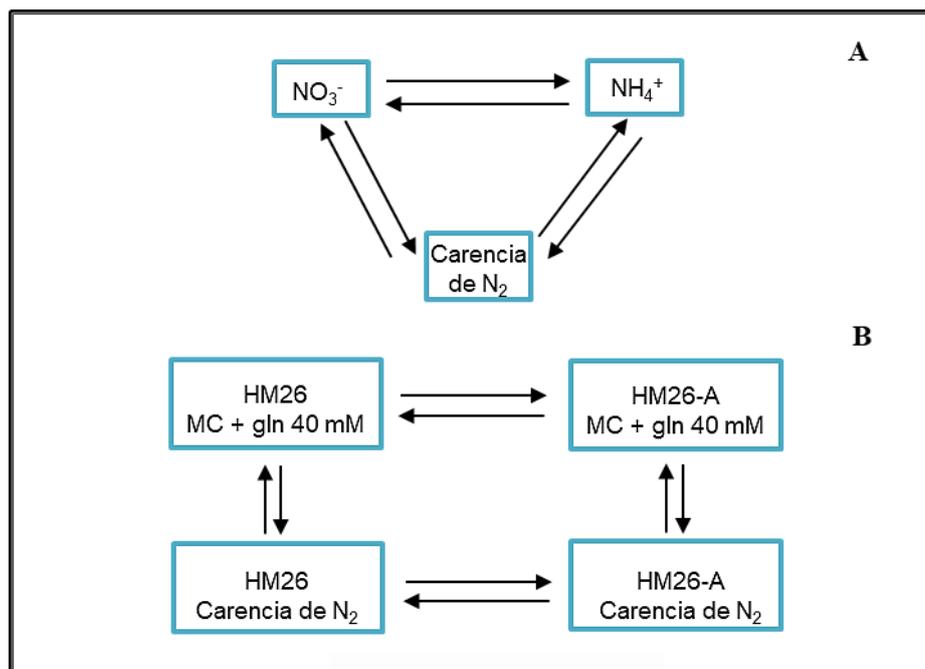
Las cepas empleadas para llevar a cabo el análisis de expresión mediante microarrays fueron por una parte, la cepa R4 (silvestre), y por otra parte las cepas HM26-A ( $\Delta pyrE2 \Delta glnA$ ) y HM26 ( $\Delta pyrE2$ ) como control de HM26-A.

Para el análisis de expresión en función de la fuente de nitrógeno de la cepa R4 de *Hfx. mediterranei*, se realizaron tres condiciones de cultivo, en las que se cambiaba la fuente de nitrógeno manteniendo fija la concentración de la fuente de carbono (1 %). Las tres condiciones de cultivo fueron las siguientes: 40 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 40 mM de KNO<sub>3</sub>, y carencia de nitrógeno, en esta última condición, se creció un cultivo con amonio hasta la mitad de fase exponencial, para después someter a las células a una situación de carencia de nitrógeno durante 48 horas. Para ello se centrifugaron las células, se lavaron con agua de sales al 25 %, y se inocularon en un medio definido con la misma fuente de carbono, pero en ausencia de nitrógeno.

Para el análisis de expresión de las cepas HM26 (control) y HM26-A se realizaron dos condiciones de cultivo: medio complejo suplementado con glutamina 40 mM y medio en carencia de nitrógeno durante 72 horas. Este último cultivo se llevó a cabo como se ha explicado anteriormente con la cepa R4.

En ambos casos se emplearon 4 réplicas biológicas independientes de cada una de las condiciones. A partir de cada uno de los cultivos, se tomaron alícuotas para la posterior extracción de RNA (kit Qiagen RNeasy). En el caso de la cepa R4 se extrajo RNA de los cultivos de amonio en mitad de la fase exponencial y estacionaria, de los cultivos de nitrato en mitad de la fase exponencial y de los cultivos sometidos a carencia de nitrógeno durante 48 horas. Mientras que en el caso de las cepas HM26 y HM26-A, previamente al aislamiento del RNA, se comprobó la estabilidad de las cepas mediante PCR *screening*. Posteriormente, se procedió a la extracción del RNA de los cultivos en medio complejo con gln 40 mM en mitad de fase exponencial y del cultivo en carencia de nitrógeno durante 72 horas.

El diseño del microarray (Figura 26) en ambos casos se realizó en base al genoma de *Hfx. mediterranei* y mediante el uso de la plataforma de Agilent (Esclapez *et al.*, 2015). Todas las sondas se diseñaron con una longitud de 60 nucleótidos, y se diseñaron tres sondas para cada gen. El marcaje de RNA, procesamiento y análisis de microarrays, se llevó a cabo en colaboración con la empresa Bioarray, S.L.



**Figura 26:** Diseño experimental en loop de los arrays de expresión. (A) Cepa R4 con tres grupos de muestras. (B) Cepas HM26 y HM26-A con cuatro grupos de muestras. Cada flecha negra es un array. MC: Medio complejo.

### 3.9.2. Validación mediante qRT-PCR

Los resultados obtenidos mediante microarrays para la cepa R4 de *Hfx. mediterranei* se validaron por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Como paso previo a la síntesis de cDNA, las muestras de RNA se trataron con la DNasa (TURBO, Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Posteriormente, para la síntesis de cDNA se utilizaron entre 0.5 y 0.6  $\mu\text{g}$  de RNA (libre de DNA) utilizando la transcriptasa inversa *M-MuLV* (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron controles negativos: en ausencia de RNA y en ausencia de enzima. A continuación se realizó una PCR de comprobación de ausencia de DNA contaminante, para llevar a cabo la qRT-PCR. Se prepararon controles negativos en ausencia de la transcriptasa inversa. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en el Anexo III. Como control endógeno se empleó RNA 16S (Esclapez *et al.*, 2015).

La qRT-PCR se realizó en un Sistema de detección de secuencia ABIPRISM 7000 (Applied Biosystems). Las reacciones de amplificación se prepararon en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  conteniendo 2  $\mu\text{L}$  de 2X *SYBR*<sup>®</sup> *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

1  $\mu\text{L}$  de cada cebador (concentración final: 250/250nM) y 1  $\mu\text{L}$  cDNA diluido 1/9 en agua libre de DNA. Las condiciones del termociclador fueron 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 30 segundos a 72 °C. Posteriormente, la curva de la temperatura de fusión se registró entre 65 y 95°C. Todas las reacciones de qRT-PCR se realizaron por triplicado.

### 3.10. Métodos bioinformáticos

Durante este trabajo se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas, las bases de datos que se utilizaron fueron las siguientes:

- GenBank: que proporciona una descripción de la secuencia, el nombre científico y taxonómico del organismo del que procede, y una tabla de datos que incluye la localización de la región codificadora y otras indicaciones que pueden tener importancia biológica.
- NCBI: (National Center for Biotechnology Information): proporciona acceso a información biomédica y genómica.
- HaloLex: aporta información de genomas de arqueas y otros procariontes, como por ejemplo, representación de localizaciones genéticas y generación de mapas genómicos.
- Genoma de *Hfx. mediterranei*

Para la manipulación y análisis de secuencias de proteínas se utilizaron las siguientes herramientas:

- FASTA: realiza una búsqueda de Pearson y Lipman por similitud entre la secuencia a analizar y las bases de datos de secuencias del mismo tipo (ácidos nucleicos o proteínas).
- BLAST: alinea la secuencia con las de las bases de datos.
- Clustal Omega: se emplea para el alineamiento de múltiples secuencias tres o más.
- Pairwise Sequence Alignment: para el alineamiento de pares de secuencias.
- ProtParam: aporta información sobre los parámetros bioquímicos de una proteína a partir de su secuencia.

- PROSITE: base de datos de familias de proteínas y dominios. Describe dominios de proteínas, familias y sitios funcionales, así como patrones y perfiles asociados para identificarlos.
- SWISS-MODEL: predice la estructura tridimensional de la proteína a partir de su secuencia.
- Swiss-Pdb Viewer: se emplea para la visualización de estructuras tridimensionales de proteínas.



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

# CONCLUSIONES



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 5. CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se resumen en:

1. La glutamina sintetasa recombinante codificada por *glnA*, contiene las tres regiones conservadas en la familia de las glutamina sintetasas, entre las que se incluye la región de adenililación.
2. El gen *glnA* codifica una enzima tipo GSI- $\alpha$  ya que no presenta la inserción de 25 nucleótidos, y la estructura oligomérica de la proteína se organiza en 12 subunidades.
3. La actividad de la glutamina sintetasa tipo I recombinante aumenta a elevadas concentraciones de 2-oxoglutarato, que puede interpretarse como señal de deficiencia de nitrógeno en *Hfx. mediterranei*.
4. La glutamina y el AMP son inhibidores de la glutamina sintetasa tipo I, lo que se podría interpretar como señal de exceso de nitrógeno y de deficiencia energética, respectivamente.
5. La enzima glutamina sintetasa (GlnA) es esencial en la asimilación de amonio y en la síntesis de glutamina en *Hfx. mediterranei*.
6. Las proteínas GlnA-2 y GlnA-3 no son esenciales en la ruta asimilativa del metabolismo del nitrógeno en *Hfx. mediterranei*, y podrían participar como proteínas reguladoras de GlnA a concentraciones elevadas de amonio, ejerciendo un papel regulador sobre ésta.



# **BIBLIOGRAFÍA**



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Adul Rahman, R. N., Jongsareejit, B., Fujiwara, S. e Imanaka, T. (1997). Characterization of recombinant glutamine synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. strain KOD1. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(6), pp. 2472-2476.
- Al-Mailem, D. M., Hough, D. W. y Danson, M. J. (2008). The 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complex of *Haloferax volcanii*. *Extremophiles*, 12(1), pp. 89-96.
- Allers, T., Ngo, H.-P., Mevarech, M. y Lloyd, R. G. (2004). Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), pp. 943-953.
- Almassy, R. J., Janson, C. A., Hamlin, R., Xuong, N. H. y Eisenberg, D. (1986). Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature*, 323, pp. 304-309.
- Amiour, N., Imbaud, S., Clément, G., Agier, N., Zivy, M., Valot, B., Balliau, T., Quilleré, I., Tercé-Laforgue, T., Dargel-Graffin, C. y Hirel, B. (2014). An integrated “omics” approach to the characterization of maize (*Zea mays* L.) mutants deficient in the expression of two genes encoding cytosolic glutamine synthetase. *BMC genomics*, 15(1005), pp. 1-19.
- Antón, J., Meseguer, I., Anton, J. y Meseguer, I. (1988). Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), pp. 2381-2386.
- Alvarez-Ossorio, M. C., Muriana, F. J. G., de la Rosa, F. F. y Relimpio, A. M. (1992). Purification and characterization of nitrate reductase from the halophile archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 47, pp. 670-676.
- Baker, B. J., Tyson, G. W., Webb, R. I., Flanagan, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E. y Banfield, J. F. (2006). Lineages of acidophilic *Archaea* revealed by community genomic analysis. *Science*, 314 (5807), pp. 1933-1935.

- Baker, B. J., Comolli, L. R., Dick, G. J., Hauser, L. J., Hyatt, D., Dill, B. D., Land, M. L., VerBerkmoes, N. C., Hettich, R. L. y Banfield, J. F. (2010). Enigmatic, ultrasmall, uncultivated *Archaea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (19), pp. 8806-8811.
- Bao, A., Zhao, Z., Ding, G., Shi, L., Xu, F. y Cai, H. (2014). Accumulated expression level of cytosolic glutamine synthetase 1 gene (OsGS1;1 or OsGS1;2) alter plant development and the carbon-nitrogen metabolic status in rice. *PLoS ONE*, 9(4), pp.1-14.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. y Pace, N. R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (17), pp. 9188-9193.
- Batas, B., Schiraldi, C. y Chaudhuri, J. B. (1999). Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography. *Journal of Biotechnology*, 68(2-3), pp. 149-158.
- Bautista Saiz, V. (2010) Caracterización génica y bioquímica de una ciclodextrin glucanotransferasa, enzima implicada en metabolismo del almidón en *Haloferax mediterranei*. Tesis doctoral Universidad de Alicante, España.
- Bautista, V., Esclapez, J., Pérez-Pomares, F., Martínez-Espinosa, R. M., Camacho, M. y Bonete, M. J. (2012). Cyclodextrin glycosyltransferase: A key enzyme in the assimilation of starch by the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 16(1), pp. 147-159.
- Bell, S. D. y Jackson, S. P. (1998). Transcription and translation in *Archaea*: A mosaic of eukaryal and bacterial features. *Trends in Microbiology*, 6 (6), pp. 222-228.

- Bertini, I., Cowan, J. A., Luchinat, C., Natarajan, K. y Piccioli, M. (1997). Characterization of a partially unfolded high potential iron protein. *Biochemistry*, 36(31), pp. 9332-9339.
- Bickel-Sandkötter, S. y Ufer, M. (1995). Properties of a dissimilatory nitrate reductase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 50(5–6), pp. 365-372.
- Bitan-Banin G., Ortenberg R. y Mevarech M. (2003). Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon. *Journal of Bacteriology*, 185(3), pp. 772-778.
- Blecher, O., Goldman, S. y Mevarech, M. (1993). High expression in *Escherichia coli* of the gene coding for dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii*. Reconstitution of the active enzyme and mutation studies. *European Journal of Biochemistry*, 216(1), pp. 199-203.
- Boeke, J.D., LaCroute, F. y Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoroorotic acid resistance. *Molecular and General Genetics*, 197(2), pp. 345-346.
- Boksha, I.S., Schönfeld, H. J., Langen, H., Müller, F., Tereshkina, E. B. y Burbaeva, G.S. (2002). Glutamine synthetase isolated from human brain: octameric structure and homology of partial primary structure with human liver glutamine synthetase. *Biochemistry*, 67(9), pp. 1012-1020.
- Bonete, M. J., Pire, C., LLorca, F. I. y Camacho, M. L. (1996). Glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS letters*, 383 (3), pp. 227-229.
- Bonete, M. J., Martínez-Espinosa, R. M., Pire, C., Zafrilla, B. y Richardson, D. J. (2008). Nitrogen metabolism in haloarchaea. *Saline Systems*, 4(9), pp. 1-12.
- Bowers, K. y Wiegel, J. (2011). Temperature and pH optima of extremely halophilic archaea: a mini-review. *Extremophiles*, 15(2), pp.119-128.
- Bozouklian, H. y Elmerich, C. (1986). Nucleotide sequence of the *Azospirillum brasilense* Sp7 glutamine synthetase structural gene. *Biochimie*, 68(10–11), pp. 1181-1187.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248-254.
- Bravo-Barrales, G. (2011). Estudios fisiológicos, genómicos y proteómicos aplicados al metabolismo del nitrógeno en *Haloferax mediterranei*. Tesis doctoral Universidad de Alicante, España.
- Bressler, S. L. y Ahmed, S. I. (1984). Detection of glutamine synthetase activity in marine phytoplankton: optimization of the biosynthetic assay. *Marine Ecology Progress Series*, 14(2-3), pp. 207-217.
- Breuert, S., Allers, T., Spohn, G. y Soppa, J. (2006). Regulated polyploidy in halophilic archaea. *PLoS ONE*, 1, pp. 1-10.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. y Forterre, P. (2008a). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (3), pp. 245-252.
- Brochier-Armanet, C., Gribaldo, S. y Forterre, P. (2008b). A DNA topoisomerase IB in *Thaumarchaeota* testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of *Archaea* and *Eucarya*. *Biology Direct*, 3(1), 54.
- Brown, J. R., Masuchi, Y., Robb, F. T. y Doolittle, W. F. (1994). Evolutionary relationships of bacterial and archaeal glutamine synthetase genes. *Journal of Molecular Evolution*, 38(6), pp. 566-576.
- Brown, J. R. y Doolittle, W. F. (1997). *Archaea* and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiology and Molecular Biology*, 61 (4), pp. 456-502.
- Brügger, K., Redder, P., She, Q., Confalonieri, F., Zivanovic, Y. y Garrett, R. A. (2002). Mobile elements in archaeal genomes. *FEMS Microbiology Letters*, 206 (2), pp. 131-141.
- Bullock, C. (2000). The *Archaea* - a biochemical perspective. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 28(4), pp. 186-191.

- Burgess, R. R. (2009). Chapter 17. Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. *Methods in Enzymology*, 463, pp. 259-282.
- Cabello, P., Roldán, M. D. y Moreno-Vivián, C. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in Archaea. *Microbiology*, 150(11), pp. 3527-3546.
- Camacho, M. L., Brown, R. A., Bonete, M. J., Danson, M. J. y Hough, D. W. (1995). Isocitrate dehydrogenases from *Haloferax volcanii* and *Sulfolobus solfataricus*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 134 (1), pp. 85-90.
- Camacho, M. L., Rodríguez-Arnedo, A. y Bonete, M. J. (2002). NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*: Cloning, sequence determination and overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), pp. 155-160.
- Castelle, C. J., Wrighton, K. C., Thomas, B. C., Hug, L. A., Brown, C. T., Wilkins, M. J., Frischkorn, K. R., Tringe, S. G., Singh, A., Markillie, L. M., Taylor, R. C., Williams, K. H. y Banfield, J. F. (2015). Genomic expansion of Domain Archaea highlights roles for organisms from new *phyla* in anaerobic carbon cycling. *Current Biology*, 25 (6), pp. 690-701.
- Castro-Rodríguez, V., García-Gutiérrez, A., Cañas, R. A., Pascual, M. B., Avila, C. y Cánovas, F. M. (2015). Redundancy and metabolic function of the glutamine synthetase gene family in poplar. *BMC Plant Biology*, 15(20), pp. 1-14.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), pp. 7-76.
- Cendrin, F., Chroboczek, J., Zaccari, G., Eisenberg, H. y Mevarech, M. (1993). Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*, 32(16), pp. 4308-13.
- Charlesworth, J. C. y Burns, B. P. (2015). Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in Archaea. *Archaea 2015*, pp. 1-7.

- Chuprom, J., Bovornreungroj, P., Ahmad, M., Kantachote, D. y Dueramae, S. (2016). Approach toward enhancement of halophilic protease production by *Halobacterium* sp. strain LBU50301 using statistical design response surface methodology. *Biotechnology Reports*, 10, pp. 17-28.
- Clark J.M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNAPolymerases. *Nucleic Acids Research*, 16, pp. 9677-9686.
- Cohen-Kupiec, R., Marx, C.J. y Leigh, J. A. (1999). Function and regulation of *glnA* in the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Bacteriology*, 181(1), pp. 256-261.
- Cole, J. L., Lary, J. W., Moody, T. y Laue, T. M. (2008). Analytical Ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods in Cell Biology*, 84, pp. 143-179.
- Connaris, H., Chaudhuri, J. B., Danson, M. J. y Hough, D. W. (1999). Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(1), pp. 38-45.
- Creighton, T.E. (1986). Folding of proteins adsorbed reversibly to ion-exchange resins. In *Protein Structure, Folding and Design* (ed. D.L. Oxender), pp. 249-257.
- Cupp, J.R. y McAlister-Henn, L. (1993). Kinetic analysis of NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase with altered isocitrate binding sites: contribution of IDH1 and IDH2 subunits to regulation and catalysis. *Biochemistry*, 32(36), pp. 9323-9328.
- Dambeck, M. y Soppa, J. (2008). Characterization of a *Haloferax volcanii* member of the enolase superfamily: deletion mutant construction, expression analysis, and transcriptome comparison. *Archives of Microbiology*, 190(3), pp. 341-353.
- Danson, M. J. (1989). Central metabolism of the archaeobacteria: an overview. *Canadian Journal of Microbiology*, 35(1), pp. 58-64.
- Darrow, R. A. y Knotts, R. R. (1977). Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 78(2), pp. 554-559.

- De Bernardez, E., Schwarz, E. y Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods in Enzymology*, 309, pp. 217-236.
- De Bernardez, E. (2001). Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, pp. 202-207.
- De Moreno, M.R., Smith, J.F. y Smith, R.V. (1985). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. *Analytical Biochemistry*, 151(2), pp. 466-470.
- Deuel, T. F., Ginsburg, A., Yeh, J., Shelton, E., y Stadtman, E. R. (1970). *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. Purification and physical characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(20), pp. 5195-5205.
- Deuel, T. F. y Prusiner, S. (1974). Regulation of glutamine synthetase from *Bacillus subtilis* by divalent cations, feedback inhibitors, and L-glutamine. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(1), pp. 257-264.
- Díaz, S., Pérez-Pomares, F., Pire, C., Ferrer, J. y Bonete, M. J. (2006). Gene cloning, heterologous overexpression and optimized refolding of the NAD-glutamate dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*, *Extremophiles*, 10(2), pp. 105-115.
- Domínguez-Martín, M. A., Díez, J. y García-Fernández, J. M. (2016). Physiological studies of glutamine synthetases I and III from *Synechococcus* sp. WH7803 reveal differential regulation. *Frontiers in Microbiology*, 7(969), pp. 1-15.
- Dong, J., Wang, G., Zhang, C., Tan, H., Sun, X., Wu, M. y Xiao, D. (2013). A two-step integration method for seamless gene deletion in baker's yeast. *Analytical Biochemistry*, 439(1), pp. 30-36.
- Dower, W. J., Miller, J. F. y Ragsdale C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), pp. 6127-6145.
- D'Souza, S. E., Altekhar, W. y D'Souza, S. F. (1997). Adaptive response of *Haloferax mediterranei* to low concentrations of NaCl (< 20%) in the growth medium. *Archives of Microbiology*, 168(1), pp. 68-71.

- Dyall-Smith, M.L. y Doolittle, W.F. (1994). Construction of composite transposons for halophilic *Archaea*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40 (11), pp. 922-929.
- Dyall-Smith, M. L. (2009). The Halohandbook: protocols for haloarchaeal genetics. p.70.
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A. y Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), pp. 1-23.
- Edmands, J., Noridge, N. A and Benson, D. R. (1987). The actinorhizal root-nodule symbiont *Frankia* sp. strain CpII has two glutamine synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(17), pp. 6126-6130.
- Ehlers, C., Weidenbach, K., Veit, K., Forchhammer, K. y Schmitz, R. A. (2005). Unique mechanistic features of post-translational regulation of glutamine synthetase activity in *Methanosarcina mazei* strain Gö1 in response to nitrogen availability. *Molecular Microbiology*, 55(6), pp. 1841-1854.
- Eisenberg, H. (1995). Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318 (1), pp. 1-5.
- Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. U. y Rotstein, S. H. (2000). Structure–function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477(1-2), pp. 122-145.
- El Alaoui, S., Diez, J., Toribio, F., Gómez-Baena, G., Dufresne, A. y García-Fernández, J. M. (2003). Glutamine synthetase from the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* spp.: characterization, phylogeny and response to nutrient limitation. *Environmental Microbiology*, 5(5), pp. 412-423.
- Elkins, J. G., Podar, M., Graham, D. E., Makarova, K. S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B. P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E. V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M. y Stetter, K. O. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into

- the evolution of the *Archaea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (23), pp. 8102-8107.
- Esclapez, J., Bonete, M. J., Camacho, M., Pire, C., Ferrer, J., Bautista, V., Martínez-Espinosa, R. M., Zafrilla, B., Pérez-Pomares, F. y Díaz, S. (2006). An optimized method to produce halophilic proteins in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 5, pp. 21-22.
- Esclapez, J., Pire, C., Camacho, M., Bautista, V., Martínez-Espinosa, R. M., Zafrilla, B., Vegara, A., Alcaraz, L. A., Bonete, M. J. (2015). Transcriptional profiles of *Haloferax mediterranei* based on nitrogen availability. *Journal of Biotechnology*, 193, pp. 100-107.
- Espinosa, J., Castells, M. A., Laichoubi, K. B. y Contreras, A. (2009). Mutations at pipX suppress lethality of P<sub>II</sub>-deficient mutants of *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Journal of Bacteriology*, 191(15), pp. 4863-4869.
- Fedorova, K., Kayumov, A., Woyda, K., Ilinskaja, O. y Forchhammer, K. (2013). Transcription factor TnrA inhibits the biosynthetic activity of glutamine synthetase in *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters*, 587(9), pp. 1293-1298.
- Ferguson, S. J., Richardson, D. J. y van Spanning, R. J. M. (2007). Biochemistry and molecular biology of nitrification. In *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J. and Newton, W.E., eds), pp. 209-222, Elsevier, Amsterdam.
- Fernández-Murga, M.L., Gil-Ortiz, F., Llácer, J.L. y Rubio, V. (2004). Arginine biosynthesis in *Thermotoga maritima*: Characterization of the arginine-sensitive N-acetyl-L-glutamate kinase. *Journal of Bacteriology*, 186(18), pp. 6142-6149.
- Ferrer, J., Pérez-Pomares, F. y Bonete, M. J. (1996). NADP-glutamate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, N-terminal sequence and stability. *FEMS Microbiology Letters*, 141(1), pp. 59-63.
- Fillol, M., Auguet, J.-C., Casamayor, E. O. y Borrego, C. M. (2016). Insights in the ecology and evolutionary history of the miscellaneous crenarchaeotic group lineage. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 10 (3), pp. 665-677.

- Fisher, R., Tuli, R. y Haselkorn, R. (1981). A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in *Escherichia coli*, but the enzyme is not adenylylated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(6), pp. 3393-3397.
- Flores, E., Ramos, J.L., Herrero, A. y Guerrero, M.G. (1983) Nitrate assimilation by cyanobacteria. In *Photosynthetic Prokaryotes: cell differentiation and function* Edited by: Papageorgiu GC, Packer L. Elsevier Scientific Publishing Co., New York; pp, 363-387.
- Forchhammer, K. y De Marsac, N. T. (1995). Phosphorylation of the P<sub>II</sub> protein (*glnB* gene product) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: analysis of in vitro kinase activity. *Journal of Bacteriology*, 177(20), pp. 5812-5817.
- Forchhammer, K. (2004). Global carbon/nitrogen control by P<sub>II</sub> signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(3), pp. 319-333.
- Forchhammer, K. (2007). Glutamine signalling in bacteria. *Frontiers in Bioscience*. 12(1), pp. 358-370.
- Forterre, P. (1997). *Archaea*: what can we learn from their sequences?. *Current opinion in genetics & development*, 7 (6), pp. 764-70.
- Forterre, P., Brochier, C. y Philippe, H. (2002). Evolution of the *Archaea*. *Theoretical Population Biology*, 61(4), pp. 409-422.
- Forterre, P. (2013) .The common ancestor of *archaea* and *eukarya* was not an archaeon. *Archaea*, 13, pp.1-18.
- Frackman, S. y Kephart, D. (1999). Rapid Ligation for the pGEM<sup>®</sup> -T and pGEM<sup>®</sup> -T Easy Vector Systems. *Promega Notes*, (71), pp. 8–11.
- García-Domínguez, M., Reyes, J. C. y Florencio, F. J. (1999). Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, pp. 7161-7166.

- Ginsburg, A., Yeh, J., Hennig, S.B., y Denton, M.D. (1970). Some effects of adenylation on the biosynthetic properties of the glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 9, pp. 633-649.
- Gómez-Baena, G., Diez, J., García-Fernández, J. M., El Alaoui, S. y Humanes, L. (2001). Regulation of glutamine synthetase by metal-catalyzed oxidative modification in the marine oxyphotobacterium *Prochlorococcus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1568(3), pp. 237-244.
- Gómez-Baena, G., Domínguez-Martín, M. A., Donaldson, R. P., García-Fernández, J. M. y Diez, J. (2015). Glutamine synthetase sensitivity to oxidative modification during nutrient starvation in *Prochlorococcus marinus* PCC 9511, *PLoS ONE*, 10(8), pp. 1-14.
- Guerrero, M. G., Vega, J. M. y Losada, M. (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 32(1), pp. 169-204.
- Gupta, R. S. (1998). What are archaeobacteria: Life's third domain or monoderm prokaryotes related to Gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Molecular Microbiology*, 29 (3), pp. 695-707.
- Gupta, R. S., Naushad, S. y Baker, S. (2015). Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class *Halobacteria* and its two major clades: a proposal for division of the class *Halobacteria* into an emended order *Halobacteriales* and two new orders, *Haloferacales* ord. nov. and *Natrialbales* ord. nov., containing the novel families *Haloferacaceae* fam. nov. and *Natrialbaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3), pp. 1050-1069.
- Gupta, R. S., Naushad, S., Fabros, R. y Adeolu, M. (2016). Erratum to: A phylogenomic reappraisal of family-level divisions within the class *Halobacteria*: proposal to divide the order *Halobacteriales* into the families *Halobacteriaceae*, *Haloarculaceae* fam. nov., and *Halococcaceae* fam. nov., and the order *Haloferacales* into the families, *Haloferacaceae* and *Halorubraceae* fam. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109 (4), pp. 565-587.

- Habibi, N., Samian, M.R., Hashim, S.Z.M. and Norouzi, A. (2014). EcoliOverExpressionDB: A database of recombinant protein overexpression in *E. coli*. *Protein Expression and Purification*. Elsevier Inc., 95, pp. 92-95.
- Hammelmann, M. y Soppa, J. (2008). Optimized generation of vectors for the construction of *Haloferax volcanii* deletion mutants. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), pp. 201-204.
- Han, J., Zhang, F., Hou, J., Liu, X., Li, M., Liu, H., Cai, L., Zhang, B., Chen, Y., Zhou, J., Hu, S. y Xiang, H. (2012). Complete genome sequence of the metabolically versatile halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, a poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) producer. *Journal of Bacteriology*, 194(16), pp. 4463-4464.
- Harth, G., Clemens, D.L. y Horwitz, M.A. (1994). Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(20), pp. 9342-9346.
- Harth, G., Masleša-Galić, S., Tullius, M. V. y Horwitz, M. A. (2005). All four *Mycobacterium tuberculosis* *glnA* genes encode glutamine synthetase activities but only GlnA1 is abundantly expressed and essential for bacterial homeostasis. *Molecular Microbiology*, 58(4), pp. 1157-1172.
- He, Y. X., Gui, L., Liu, Y. Z., Du, Y., Zhou, Y., Li, P. y Zhou, C. Z. (2009). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* glutamine synthetase Gln1 suggests a nanotube-like supramolecular assembly. *Proteins*, 76(1), pp. 249-254.
- Hildenbrand, C., Stock, T., Lange, C., Rother, M. y Soppa, J. (2011). Genome copy numbers and gene conversion in methanogenic *Archaea*. *Journal of Bacteriology*, 193(3), pp. 734-743.
- Hochman, A., Nissany, A. y Amizur, M. (1988). Nitrate reduction and assimilation by a moderately halophilic, halotolerant bacterium Ba<sub>1</sub>. *Biochimica et Biophysica Acta*, 965(1), pp. 82-89.

- Hochstein, L. I. y Lang, F. (1991). Purification and properties of a dissimilatory nitrate reductase from *Haloferax denitrificans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288(2), pp. 380-385.
- Huang, X., Lin, J., Ye, X. y Wang, G. (2015). Molecular characterization of a thermophilic and salt- and alkaline-tolerant xylanase from *Planococcus* sp. SL4, a strain isolated from the sediment of a soda lake. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(5), pp. 662-671.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C. y Stetter, K. O. (2002). A new phylum of *Archaea* represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 417(6884), pp. 63-67.
- Huguet, C., Fietz, S., Rosell-Mellé, A., Daura, X. y Costenaro, L. (2017). Molecular dynamics simulation study of the effect of glycerol dialkyl glycerol tetraether hydroxylation on membrane thermostability. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1859(5), pp. 966-974.
- Hunt, H. B y Ginsburg, A. (1972). Some kinetics of the interaction of divalent cations with glutamine synthetase from *Escherichia coli*. Metal ion induced conformational changes. *Biochemistry*, 11(20), pp. 3723-3735.
- Hunt, J. B., Smyrniotis, P. Z., Ginsburg, A. y Stadtman, E. R. (1975). Metal ion requirement by glutamine synthetase of *Escherichia coli* in catalysis of gamma-glutamyl transfer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 166(1), pp. 102-124.
- Hunt, J. B. y Ginsburg, A. (1980).  $Mn^{2+}$  and substrate interactions with glutamine synthetase from *Escherichia coli* \*. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), pp. 590-594.
- Jetten, M. S. M., Niftrik, L., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J. T. y Op den Camp, H. J. M. (2009). Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(2-3), pp. 65-84.
- Jormakka, M., Richardson, D., Byrne, B. e Iwata, S. (2004). Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes. *Structure*, 12(1), pp. 95-104.

- Karadzic, I., Maupin-Furlow, J., Humbard, M., Prunetti, L., Singh, P. y Goodlett, D. R. (2012). Chemical cross-linking, mass spectrometry, and in silico modeling of proteasomal 20S core particles of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Proteomics*, 12(11), pp. 1806-1814.
- Kozubal, M. A., Macur, R. E., Jay, Z. J., Beam, J. P., Malfatti, S. A., Tringe, S. G., Kocar, B. D., Borch, T. y Inskeep, W. P. (2012). Microbial iron cycling in acidic geothermal springs of Yellowstone National Park: Integrating molecular surveys, geochemical processes, and isolation of novel Fe-active microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 3(109), pp. 1-16.
- Kozubal, M. A., Romine, M., Jennings, R. deM, Jay, Z. J., Tringe, S. G., Rusch, D. B., Beam, J. P., McCue, L. A. e Inskeep, W. P. (2013). *Geoarchaeota*: a new candidate phylum in the Archaea from high-temperature acidic iron mats in Yellowstone National Park. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 7(3), pp. 622-634.
- Krajewski, W. W., Collins, R., Holmberg-Schiavone, L., Jones, T. A., Karlberg, T. y Mowbray, S. L. (2008). Crystal structures of mammalian glutamine synthetases illustrate substrate-induced conformational changes and provide opportunities for drug and herbicide design. *Journal of Molecular Biology*, 375(1), pp. 217-228.
- Kumada, Y., Benson, D. R., Hillemann, D., Hosted, T. J., Rochefort, D. A, Thompson, C. J., Wohlleben, W. y Tateno, Y. (1993). Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), pp. 3009-3013.
- Kumar, V., Yadav, S., Soumya, N., Kumar, R., Babu, N. K. y Singh, S. (2017). Biochemical and inhibition studies of glutamine synthetase from *Leishmania donovani*. *Microbial Pathogenesis*, 107, pp. 164-174.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp. 680-685.
- Lange, C., Zerulla, K., Breuert, S. y Soppa, J. (2011). Gene conversion results in the equalization of genome copies in the polyploid haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Molecular Microbiology*, 80(3), pp. 666-677.

- Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriology Reviews*, 38 (3), pp. 272-290.
- Lei, M., Aebi, U., Heidner, E.G. y Eisenberg, D. (1979). Limited proteolysis of glutamine synthetase is inhibited by glutamate and by feedback inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. 254(8), pp. 3129-3134
- Leigh, J. A. y Dodsworth, J. A. (2007). Nitrogen Regulation in *Bacteria* and *Archaea*. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), pp. 349-377.
- Li, X., Liu, T., Wu, Y., Zhao, G. y Zhou, Z. (2010). Derepressive effect of  $\text{NH}_4^+$  on hydrogen production by deleting the *glnA1* gene in *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(4), pp. 564-572.
- Liaw, S.H., Villafranca, J.J., y Eisenberg, D. (1993). A model for oxidative modification of glutamine synthetase, based on crystal structures of mutant H269N and the oxidized enzyme. *Biochemistry*, 32, pp. 7999-8003.
- Liaw, S.H., Jun, G., y Eisenberg, D. (1994). Interactions of nucleotides with fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry*, 33(37), pp. 11184-11188.
- Liu, H., Han, J., Liu, X., Zhou, J. y Xiang, H. (2011) Development of pyrF-based gene knockout systems for genome-wide manipulation of the archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloarcula hispanica*. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(6), pp. 261-269.
- Lopez-García, P., Abad, J. P., Smith, C. y Amils, R. (1992). Genomic organization of the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*: physical map of the chromosome. *Nucleic Acids Research*, 20(10), pp. 2459-2464.
- Lledó, B., Martínez-Espinosa, R. M., Marhuenda-Egea, F. C. y Bonete, M. J. (2004). Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1674(1), pp. 50-59.
- Llorca, O., Betti, M., González, J. M., Valencia, A., Márquez, A. J. y Valpuesta, J. M. (2006). The three-dimensional structure of an eukaryotic glutamine synthetase:

- functional implications of its oligomeric structure. *Journal of Structural Biology*, 156(3), pp. 469-479.
- Mackwan, R. R., Carver, G. T., Drake, J. W. y Grogan, D. W. (2007). An unusual pattern of spontaneous mutations recovered in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Genetics*, 176(1), pp. 697-702.
- Madern, D., Pfister, C. y Zaccai, G. (1995). Mutation at a single acidic amino acid enhances the halophilic behaviour of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui* in physiological salts. *European Journal of Biochemistry*, 230 (3), pp. 1088-1095.
- Manitz, B. y Holldorf, A. W. (1993). Purification and properties of glutamine synthetase from the archaeobacterium *Halobacterium salinarium*. *Archives of Microbiology*, 159(1), pp. 90-97.
- Martínez-Espinosa, R. M., Marhuenda-Egea, F. C. y Bonete, M. J. (2001a). Purification and characterisation of a possible assimilatory nitrite reductase from the halophile archaeon *Haloferax mediterranei*. *FEMS Microbiology Letters*, 196 (2), pp. 113-118.
- Martínez-Espinosa, R. M., Marhuenda-Egea, F. C. and Bonete, M. J. (2001b). Assimilatory nitrate reductase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: purification and characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 204(2), pp. 381-385.
- Martínez-Espinosa, R. M., Marhuenda-Egea, F. C., Donaire, A. y Bonete, M. J. (2003). NMR studies of a ferredoxin from *Haloferax mediterranei* and its physiological role in nitrate assimilatory pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1623(1), pp. 47-51.
- Martínez-Espinosa, R. M., Esclapez, J., Bautista, V. y Bonete, M. J. (2006). An octameric prokaryotic glutamine synthetase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *FEMS Microbiology Letters*, 264(1), pp. 110-116.
- Martínez-Espinosa, R. M., Cole, J. A., Richardson, D. J. y Watmough, N. J. (2011). Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), pp. 175-178.

- Masalkar, P. D. y Roberts, D. M. (2015). Glutamine synthetase isoforms in nitrogen-fixing soybean nodules: distinct oligomeric structures and thiol-based regulation. *FEBS Letters*, 589(2), pp. 215-221.
- Mathis, R., Gamas, P., Meyer, Y. y Cullimore, J. V. (2000). The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes. *Journal of Molecular Evolution*, 50(2), pp. 116-122.
- McParland, R.H., Guevara, J.G., Becker, R.R. y Evans, H.J. (1976). The purification and properties of the glutamine synthetase from the cytosol of soya-bean root nodules. *The Biochemical journal*, 153(3), pp. 597-606.
- Meng, J., Xu, J., Qin, D., He, Y., Xiao, X. y Wang, F. (2014). Genetic and functional properties of uncultivated MCG *Archaea* assessed by metagenome and gene expression analyses. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 8(3), pp. 650-659.
- Merida, A., Leurentop, L., Candau, P. y Florencio, F. J. (1990). Purification and properties of glutamine synthetases from the cyanobacteria *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 and *Calothrix* sp. strain PCC 7601. *Journal of Bacteriology*, 172(8), pp. 4732-4735.
- Monstadt, G. M. y Holldorf, A. W. (1990). Arginine deiminase from *Halobacterium salinarium*. Purification and properties. *Biochemical Journal*, 273, pp. 739-745.
- Montalvo-Rodríguez, R., López-Garriga, J., Vreeland, R. H., Oren, A., Ventosa, A. y Kamekura, M. (2000). *Haloterrigena thermotolerans* sp. nov., a halophilic archaeon from Puerto Rico. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 (3), pp. 1065-1071.
- Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R. y Castillo, F. (1999). Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of Bacteriology*, 181(21), pp. 6573-6584.
- Moss, J., Stanley, S.J. y Levine, R.L. (1990). Inactivation of bacterial glutamine synthetase by ADP-ribosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 265(34), pp. 21056-21060.

- Moura, I., Bursakov, S., Costa, C. y Moura, J.J.G. (1997). Nitrate and nitrite utilization in sulfate-reducing *Bacteria*. *Anaerobe*, 3(5), pp. 279-290.
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. y Florencio, F. J. (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 83(2), pp. 135-150.
- Murphy, R. (1997). Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? *Analytical Biochemistry*, 8(1), pp. 25-30.
- Murray, D. S., Chinnam, N., Tonthat, N.K., Whitfill, T., Wray, L. V., Fisher, S. H. y Schumacher, M.A. (2013). Structures of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase dodecamer reveal large intersubunit catalytic conformational changes linked to a unique feedback inhibition mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 288(50), pp. 35801-35811.
- Mus, F., Tseng, A., Dixon, R. y Peters, J. W. (2017). Diazotrophy overcomes the deleterious growth phenotype of *glnE* deletion in *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(13), 13 e00808-17.
- Nájera-Fernández, C., Zafrilla, B., Bonete, M. J. y Martínez-Espinosa, R. M. (2012). Role of the denitrifying Haloarchaea in the treatment of nitrite-brines. *International Microbiology*, 15(3), pp. 111-119.
- Narasimharao, P., Podell, S., Ugalde, J. A., Brochier-Armanet, C., Emerson, J. B., Brocks, J. J., Heidelberg, K. B., Banfield, J. F. y Allen, E. E. (2012). De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of *Archaea* in hypersaline microbial communities. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 6(1), pp. 81-93.
- Ness, S. A. (2006). Basic Microarray Analysis: strategies for successful experiments. *Methods in Molecular Biology*, 316, pp. 13-33.
- Ng, W. V., Ciuffo, S. A., Smith, T. M., Bumgarner, R. E., Dale Baskin, J. F., Hall, B., Loretz, C., Seto, J., Slagel, J., Hood, L. y DasSarma, S. (1998). Snapshot of a large dynamic replicon in a halophilic archaeon: megaplasmid or minichromosome?. *Genome Research*, 8 (11), pp. 1131-1141.

- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G. J., Hattori, M., Kanai, A., Atomi, H., Takai, K. y Takami, H. (2011). Insights into the evolution of *Archaea* and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Research*, 39(8), pp. 3204-3223.
- Newton, W.E. (2007). Physiology, biochemistry and molecular biology of nitrogen fixation. In *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J. and Newton, W.E., eds), pp. 109-129, Elsevier, Amsterdam.
- Offre, P., Spang, A. y Schleper, C. (2013). *Archaea* in biogeochemical cycles. *Annual Review of Microbiology*, 67 (1), pp. 437-457.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63 (2), pp. 334-348.
- Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 28 (1), pp. 56-63.
- Ortiz-Alvarez, R. y Casamayor, E. O. (2016). High occurrence of *Pacearchaeota* and *Woesearchaeota* (*Archaea superphylum* DPANN) in the surface waters of oligotrophic high-altitude lakes. *Environmental Microbiology Reports*, 8(2), pp. 210-217.
- Pace, N. R. (2009). Mapping the tree of life: progress and prospects. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(4), pp. 565-576.
- Pedro-Roig, L., Camacho, M. y Bonete, M. J. (2011). In vitro proof of direct regulation of glutamine synthetase by GlnK proteins in the extreme halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), pp. 259-262.
- Pedro-Roig, L. (2012). GlnK regulatory proteins and their role in *Haloferax mediterranei* nitrogen metabolism. Tesis doctoral Universidad de Alicante, España.
- Pedro-Roig, L., Camacho, M. y Bonete, M. J. (2013a). *Haloferax mediterranei* GlnK proteins are post-translationally modified by uridylylation. *Proteomics*, 13(8), pp. 1371-1374.

- Pedro-Roig, L., Camacho, M. y Bonete, M. J. (2013b). Regulation of ammonium assimilation in *Haloferax mediterranei*: Interaction between glutamine synthetase and two GlnK proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(1), pp. 16-23.
- Pedro-Roig, L., Lange, C., Bonete, M. J., Soppa, J. y Maupin-Furlow, J. (2013c). Nitrogen regulation of protein-protein interactions and transcript levels of GlnK PII regulator and AmtB ammonium transporter homologs in *Archaea*. *MicrobiologyOpen*, 2(5), pp. 826–840.
- Pesole, G., Bozzetti, M. P., Lanave, C., Preparata, G. y Saccone, C. (1991). Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(2), pp. 522-526.
- Pfeifer, F., Krüger, K., Röder, R., Mayr, A., Ziesche, S. y Offner, S. (1997). Gas vesicle formation in halophilic *Archaea*. *Archives of Microbiology*, 167(5), pp. 259-268.
- Pire, C., Esclapez, J., Ferrer, J. y Bonete, M. J. (2001). Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS Microbiology Letters*, 200 (2), pp. 221-227.
- Pire, C., Martínez-Espinosa, R. M., Pérez-Pomares, F., Esclapez, J. y Bonete, M. J. (2014). Ferredoxin-dependent glutamate synthase: involvement in ammonium assimilation in *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 18(1), pp. 147-159.
- Pozdnyakova, I. y Wittung-stafshede, P. (2001). Biological relevance of metal binding before protein folding. *Journal of the American Chemical Society*, 123, pp. 10135-10136.
- Price, N.C. (1996). Cross-linking reagents for proteins in *Proteins labfax*, pp. 307-314. BIOS Scientific Publishers.
- PrüB, B., Meyer, H. E. y Holldorf, A. W. (1993). Characterization of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula vallismortis*. *Archives of Microbiology*, 160, pp. 5-11.

- Pushkin, A.V., Tsuprum, V.L., Dzhokharidze, T. Z., Evstigneeva, Z.G. y Kretovich, W.L. (1981). Glutamine synthetase from the pumpkin leaf cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 662(1), pp. 160-162.
- Pushkin, A.V., Antoniuk, L.P., Solovieva, N.A., Shubin, V.V., Evstigneeva, Z.G., Kretovich, W.L., Cherednikova, T.V., Tsuprum, V.L., Zograf, O.N. y Kiselev, N.A. (1985). Glutamine synthetases of pea leaf and seed cytosol. Structure and properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 828(3), pp. 336-350.
- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D. y Hatti-Kaul, R. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), pp. 1687-1696.
- Ravishankara, A. R., Daniel, J. S. y Portmann, R. W. (2009). Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O): the dominant ozone-depleting substance emitted in the 21st Century. *Science*, 326(5949), pp. 123-125.
- Raymann, K., Moeller, A. H., Goodman, A. L. y Ochman, H. (2017). Unexplored archaeal diversity in the great ape gut microbiome. *mSphere*, 2(1), pp. e00026-17.
- Reitzer, L. (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), pp. 155-176.
- Reyes, J. C. y Florencio, F. J. (1994). A new type of glutamine synthetase in cyanobacteria: the protein encoded by the *glnN* gene supports nitrogen assimilation in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 176(5), pp. 1260-1267.
- Reyes, J. C., Muro-Pastor, M. I. y Florencio, F. J. (1997). Transcription of glutamine synthetase genes (*glnA* and *glnN*) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is differently regulated in response to nitrogen availability. *Journal of Bacteriology*, 179(8), pp. 2678-2689.
- Richardson, D. J. y Watmough, N. J. (1999). Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 3(2), pp. 207-219.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N. N., Anderson, I. J., Cheng, J.-F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B. K., Gies, E. A., Dodsworth, J. A., Hedlund, B.

- P., Tsiamis, G., Sievert, S. M., Liu, W.-T., Eisen, J. A., Hallam, S. J., Kyrpides, N. C., Stepanauskas, R., Rubin, E. M., Hugenholtz, P. y Woyke, T. (2013). Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 499 (7459), pp. 431-437.
- Robertson, D. L. y Alberte, R. S. (1996). Isolation and characterization of glutamine synthetase from the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Plant Physiology*, 111(4), pp. 1169-1175.
- Robinson, P., Neelon, K., Schreier, H. J. y Roberts, F. (2001).  $\beta$ -Glutamate as a substrate for glutamine synthetase. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), pp. 4458-4463.
- Rodrigo-Baños, M., Garbayo, I., Vílchez, C., Bonete, M. J. y Martínez-Espinosa, R. M. (2015). Carotenoids from haloarchaea and their potential in biotechnology. *Marine Drugs*, 13(9), pp. 5508-5532.
- Rodríguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1980a). Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *Journal of General Microbiology*, 119, pp. 535-538.
- Rodríguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana A. (1980b). Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, 26(11), pp. 1259-1263.
- Rodríguez-Valera, F., Juez, G. y Kushner, D. J. (1983). *Halobacterium mediterranei* spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(3), pp. 369-381.
- Rossi, M., Defez, R., Chiurazzi, M., Lamberti, A., Fuggi, A., y Iaccarino, M. (1989). Regulation of glutamine synthetases isoenzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Journal of General Microbiology*, 135, pp. 629-637
- Saelices, L., Galmozzi, C. V., Florencio, F. J. y Muro-Pastor, M. I. (2011). Mutational analysis of the inactivating factors, IF7 and IF17 from *Synechocystis* sp. PCC 6803: critical role of arginine amino acid residues for glutamine synthetase inactivation. *Molecular Microbiology*, 82(4), pp. 964-975.

- Saelices, L., Robles-Rengel, R., Florencio, F. J. y Muro-Pastor, M. I. (2015). A core of three amino acids at the carboxyl-terminal region of glutamine synthetase defines its regulation in cyanobacteria. *Molecular Microbiology*, 96(3), pp. 483-496.
- Scheuch, S., Marschall, L., Sartorius-Neef, S. y Pfeifer, F. (2008). Regulation of gvp genes encoding gas vesicle proteins in halophilic Archaea. *Archives of Microbiology*, 190 (3), pp. 333-339.
- Schuck P. (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. *Biophysical Journal*, 78(3), pp. 1606-1619.
- Schumacher, M. A., Chinnam, N. B., Cuthbert, B., Tonthat, N. K. y Whitfill, T. (2015). Structures of regulatory machinery reveal novel molecular mechanisms controlling *B. Subtilis* nitrogen homeostasis. *Genes and Development*, 29(4), pp. 451-464.
- Seabra, A. R., Silva, L. S. y Carvalho, H. G. (2013). Novel aspects of glutamine synthetase (GS) regulation revealed by a detailed expression analysis of the entire GS gene family of *Medicago truncatula* under different physiological conditions. *BMC plant biology*, 13(137), pp. 1-15.
- Seitz, K. W., Lazar, C. S., Hinrichs, K.-U., Teske, A. P. y Baker, B. J. (2016). Genomic reconstruction of a novel, deeply branched sediment archaeal *phylum* with pathways for acetogenesis and sulfur reduction. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 10 (7), pp. 1696-1705.
- Sen, D., Nandakumar, D., Tang, G. Q. y Patel, S. S. (2012). Human mitochondrial DNA helicase TWINKLE is both an unwinding and annealing helicase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), pp. 14545-14556.
- Serrano, J. A., Camacho, M. y Bonete, M. J. (1998). Operation of glyoxylate cycle in halophilic archaea: presence of malate synthase and isocitrate lyase in *Haloferax volcanii*. *FEBS Letters*, 434 (1-2), pp. 13-16.
- Shapiro, B. M., Kingdon, H. S., y Stadtman, E. R. (1967). Regulation of glutamine synthetase. VII. Adenylyl glutamine synthetase: a new form of the enzyme with

- altered regulatory and kinetic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(2), pp. 642-649.
- Shapiro, B. M., y Ginsburg, A. (1968). Effects of specific divalent cations on some physical and chemical properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. Taut and relaxed enzyme forms. *Biochemistry*, 7(6), pp. 2153-2167.
- Shapiro, B. M y Stadtman, E. R. (1968). 5'-adenylyl-O-tyrosine. The novel phosphodiester residue of adenylylated glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 243(13), pp. 3769-3771.
- Shapiro BM. y Stadtman ER. (1970). Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). In *Methods in Enzimology*, 17A, pp. 910-922.
- Shatters, R. G. y Kahn, M. L. (1989). Glutamine synthetase II in *Rhizobium*: reexamination of the proposed horizontal transfer of DNA from eukaryotes to prokaryotes. *Journal of Molecular Evolution*, 29(5), pp. 422-428.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), pp. 850-858.
- Shiyan, A., Thompson, M., Köcher, S., Tausendschön, M., Santos, H., Hänel, I. y Müller, V. (2014). Glutamine synthetase 2 is not essential for biosynthesis of compatible solutes in *Halobacillus halophilus*. *Frontiers in Microbiology*, 5(168), pp. 1-11.
- Soppa, J. (2011). Ploidy and gene conversion in *Archaea*. *Biochemical Society Transactions*, 39(1), pp. 150-154.
- Soppa, J. (2013). Evolutionary advantages of polyploidy in halophilic archaea. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), pp. 339-343.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), pp. 503-517.
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L. y Etterna, T. J. G. (2015). Complex archaea

- that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521(7551), pp. 173-179.
- Sperling, R. A. y Parak, W.J. (2010). Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 368(1915), pp. 1333-1383.
- Stadtman, E.R y Ginsburg, A. (1974). The glutamine synthetase of *Escherichia coli*: structure and control. In *The Enzymes*. Boyer,ed., pp. 755-807. New York: Academic Press.
- Streicher, S. L. y Tyler, B. (1981). Regulation of glutamine synthetase activity by adenylation in the Gram-positive bacterium *Streptomyces cattleya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(1), pp. 229-233.
- Takai, K. E. N., Moser, D. P., Flaun, M. D. E., Onstott, T. C. y Fredrickson, J. K. (2001). Archaeal Diversity in Waters from Deep South African Gold Mines. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12), pp. 5750-5760.
- Thermo Scientific, C. T. H. (2012). Crosslinking Technology. *Thermo Scientific*, pp. 1-56.
- Thomson, A. J., Giannopoulos, G., Pretty, J., Baggs, E. M. y Richardson, D. J. (2012). Biological sources and sinks of nitrous oxide and strategies to mitigate emissions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367(1593), pp. 1157-1168.
- Tiboni, O., Cammarano, P. y Sanangelantoni, A. M. (1993). Cloning and sequencing of the gene coding glutamine synthetase I from the archaeum *Pyrococcus woesi*: anomalous phylogenies inferred from analysis of archael and bacterial glutamine synthetase I sequence. *Journal of Bacteriology*, 175(10), pp. 2961-2969.
- Tischner, R. y Kaiser, W. (2007) Nitrate assimilation in plants. In *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J. and Newton, W.E., eds), pp. 283-301, Elsevier, Amsterdam.
- Tomita, T., Miyazaki, T., Miyazaki, J., Kuzuyama, T. y Nishiyama, M. (2010). Hetero-oligomeric glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Microbiology*, 156(12), pp. 3801-3813.

- Torreblanca, M., Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. y Kates, M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 8(1–2), pp. 89-99.
- Torregrosa-Crespo, J., Martínez-Espinosa, R. M., Esclapez, J., Bautista, V., Pire, C., Camacho, M., Richardson, D. J. y Bonete, M. J. (2016). Anaerobic metabolism in *Haloferax* Genus: denitrification as case of study. *Advances in microbial physiology*, 68, pp. 41-85.
- Torreira, E., Seabra, A. R., Marriott, H., Zhou, M., Llorca, Ó., Robinson, C. V., Carvalho, H. G., Fernández-Tornero, C. y Pereira, P. J. B. (2014). The structures of cytosolic and plastid-located glutamine synthetases from *Medicago truncatula* reveal a common and dynamic architecture. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(4), pp. 981-993.
- Unno, H., Uchida, T., Sugawara, H., Kurisu, G., Sugiyama, T., Yamaya, T., Sakakibara, H., Hase, T. y Kusunoki, M. (2006). Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), pp. 29287-29296.
- van Holde KE, Miller KI. (1985). Association-dissociation equilibria of octopus hemocyanin. *Biochemistry*. 24(17), pp. 4577-4582.
- van Ooyen, J. y Soppa, J. (2007). Three 2-oxoacid dehydrogenase operons in *Haloferax volcanii*: expression, deletion mutants and evolution. *Microbiology*, 153(10), pp. 3303-3313.
- van Rooyen, J. M., Abratt, V. R. y Sewell, B. T. (2006). Three-dimensional structure of a type III Glutamine Synthetase by Single-particle Reconstruction. *Journal of Molecular Biology*, 361(4), pp. 796-810.
- van Rooyen, J. M., Abratt, V. R., Belrhali, H. y Sewell, T. (2011). Crystal structure of type III glutamine synthetase: surprising reversal of the inter-ring interface. *Structure*, 19(4), pp. 471-483.

- Van Spanning, R.J.M., Richardson, D.J. y Ferguson, S.J. (2007). Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. In *Biology of the Nitrogen Cycle* (Bothe, H., Ferguson, S.J. and Newton, W.E., eds), pp. 3-20, Elsevier, Amsterdam.
- Wang, J., Kan, J., Zhang, X., Xia, Z., Zhang, X., Qian, G., Miao, Y., Leng, X. y Sun, J. (2017). Archaea dominate the ammonia-oxidizing community in deep-sea sediments of the Eastern Indian Ocean-From the Equator to the Bay of Bengal. *Frontiers in Microbiology*, 8 (415), pp. 1-16.
- Williams, T. A., Foster, P. G., Cox, C. J. y Embley, T. M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*, 504 (7479), pp. 231-236.
- Wilson, C. J., Apiyo, D. y Wittung-Stafshede, P. (2004). Role of cofactors in metalloprotein folding. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 37(3-4), pp. 285-314.
- Wittung-Stafshede, P. (2004). Role of cofactors in folding of the blue-copper protein azurin. *Inorganic Chemistry*, 43(25), pp. 7926-7933.
- Woese, C. R. y Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (11), pp. 5088-5090.
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87 (12), pp. 4576-4579.
- Woese, C. R. (1996). Phylogenetic trees. Whither microbiology? *Current Biology*, 6 (9), pp. 1060-1063.
- Woese, C. R. (2000). Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), pp. 8392-8396.
- Woods, D. R. y Reid, S. J. (1993). Recent developments on the regulation and structure of glutamine synthetase enzymes from selected bacterial groups. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4), pp. 273-283.

- Woolfolk, C.A, Shapiro, B. y Stadtman, E.R. (1966). Regulation of glutamine synthetase I. Purification and properties of glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 116, pp. 177-192.
- Wray, L.V y Fisher, S.H. (1988). Cloning and nucleotide sequence of the *Streptomyces coelicolor* gene encoding glutamine synthetase. *Gene*, 71(2), pp. 247-256.
- Wray, L. V, Zalieckas, J. M. y Fisher, S. H. (2001). *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription Factor TnrA. *Cell*, 107, pp. 427-435.
- Wray, L. V. y Fisher, S. H. (2010). Functional roles of the conserved Glu304 loop of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. *Journal of Bacteriology*, 192(19), pp. 5018-5025.
- Wyatt, K., White, H. E., Wang, L., Bateman, O. A., Slingsby, C., Orlova, E. V. y Wistow, G. (2006). Lengsin is a survivor of an ancient family of class I glutamine synthetases re-engineered by evolution for a role in the vertebrate lens. *Structure*, 14(12), pp. 1823-1834.
- Youssef, N. H., Rinke, C., Stepanauskas, R., Farag, I., Woyke, T. y Elshahed, M. S. (2015). Insights into the metabolism, lifestyle and putative evolutionary history of the novel archaeal phylum “Diapherotrites”. The *International Society for Microbial Ecology Journal*, 9 (2), pp. 447-460.
- Zafrilla, B., Martínez-Espinosa, R. M., Esclapez, J., Pérez-Pomares, F. y Bonete, M. J. (2010). SufS protein from *Haloferax volcanii* involved in Fe-S cluster assembly in haloarchaea. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804 (7), pp. 1476-1482.
- Zafrilla, B. (2011). Expresión recombinante de proteínas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno en *Hfx. mediterranei*. Tesis doctoral Universidad de Alicante, España.
- Zerulla, K. y Soppa, J. (2014). Polyploidy in haloarchaea: advantages for growth and survival. *Frontiers in Microbiolog*, 5(274), pp. 1-8.
- Zhang, G., Huihua, G. y Yi, L. (2013). Stability of halophilic proteins: from dipeptide attributes to discrimination classifier. *International Journal of Biological Macromolecules*, 53, pp. 1-6.

- Zhang, G. y Ge, H. (2013). Protein hypersaline adaptation: Insight from amino acids with machine learning algorithms. *Protein Journal*, 32(4), pp. 239-245.
- Zhang, G., Gu, J., Zhang, R., Rashid, M., Haroon, M. F., Xun, W., Ruan, Z., Dong, X. y Stingl, U. (2017). *Haloprofundus marisrubri* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from a brine-seawater interface. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(1), pp. 9-16.
- Zhang, S., Han, Y., Kumar, A., Gao, H., Liu, Z. y Hu, N. (2017). Characterization of an L-phosphinothricin resistant glutamine synthetase from *Exiguobacterium* sp. and its improvement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(9), pp. 3653-3661.
- Zorgani, M. A., Patron, K. y Desvaux, M. (2014). New insight in the structural features of haloadaptation in  $\alpha$ -amylases from halophilic *Archaea* following homology modeling strategy: folded and stable conformation maintained through low hydrophobicity and highly negative charged surface. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 28 (7), pp. 721-734.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), pp. 533-616.



# ANEXOS



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 7. ANEXOS

### ANEXO I: DESCRIPCIÓN Y SIGNIFICADO DE MARCADORES GENÉTICOS

**JM109:** *end* A1, *rec* A1, *gyr* A96, *thi*1, *hsd* R17 ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ), *rel*A1, *sup* E44,  $\Delta$  (*lac-proAB*), [*F'**traD36*, *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup>, *laqI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15].

- *end* A1: mutación en endonucleasa A. Aumenta la calidad del DNA aislado a partir de esta cepa, impidiendo su degradación.
- *rec* A1: mutación en una ATPasa DNA dependiente, esencial para la recombinación genética en *E. coli*. Previene la recombinación del DNA introducido con el DNA de la célula, asegurando la estabilidad de los insertos.
- *gyr* A96: mutación en DNA girasa. Confiere resistencia al ácido nalidíxico, que en condiciones normales inhibiría la actividad enzimática.
- *thi*1: mutación en el metabolismo de la tiamina. Cuando se crece en medio mínimo este microorganismo requiere la presencia de tiamina, ya que es incapaz de sintetizarla.
- *hsd* R17 ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ): mutación que proporciona la pérdida en la actividad de restricción, pero no de modificación de la enzima Eco K, una enzima de restricción tipo I. El DNA clonado será metilado, por lo que está protegido frente a la restricción si el vector fuera después introducido en una cepa *hsd* +.
- *rel* A1: mutación que elimina el factor estricto que actúa en la inhibición de síntesis de rRNA cuando se detiene la síntesis de proteínas. Esta mutación permite la síntesis de rRNA en ausencia de síntesis de proteínas.
- *sup* E44: incluye un supresor para las mutaciones ámbar (mutaciones que convierten cualquier otro codón en el codón de terminación UAG) del tRNA. El supresor inserta una glutamina en el codón UAG.
- $\Delta$ (*lac-proAB*): delección del gen *lac-proAB*.
- *F'*: contiene el episoma *F'*, plásmido de *E. coli* con fragmentos del cromosoma bacteriano. El episoma *F'* presenta las características que se indican entre corchetes, cuyo significado es el siguiente:
  - *traD36*: mutación que elimina el factor de transferencia. Previene la transferencia por conjugación del factor *F*.

- *pro A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>*: mutación en el metabolismo de la prolina. Al crecer en medio mínimo dicho microorganismo necesita la presencia de prolina, debido a su incapacidad de sintetizarla.
- *lac I<sup>q</sup>*: mutante del gen *lac I* que sintetiza aproximadamente diez veces más represor que el tipo salvaje. Esta superproducción del represor inhibe la transcripción del operón *lac* en ausencia de inductor.
- *lac ZΔM15*: mutación por delección que elimina las secuencias del gen *lac Z* el cual, codifica para la porción amino-terminal de la β-galactosidasa. El péptido expresado puede formar parte en la α-complementación para formar la β-galactosidasa activa.

**BL21 (DE3):** *F<sup>-</sup> omp T, hsd S<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm* (DE3)

- *F<sup>-</sup>*: cepa que no contiene el episoma F.
- *omp T*: mutación que produce la carencia de una proteasa, de manera que favorece la obtención de proteínas recombinantes intactas.
- *hsd S<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>)*: mutación que elimina tanto la restricción como la metilación del DNA en la secuencia TGA(N)<sub>8</sub>TGCT.
- *gal*: muestra la incapacidad de dicha cepa para utilizar galactosa.
- *dcm*: mutación en la citosina metilasa. Bloquea la metilación de la citosina en la secuencia 5'...G<sup>m</sup>CAGG... 3' o 5'...C<sup>m</sup>CTGG... 3'.
- (DE3): el gen que codifica la T7 RNA polimerasa está integrado en el genoma del microorganismo.

**ANEXO II: MEDIOS DE CULTIVO Y DISOLUCIONES**➤ **Medios de cultivo**

<b>Agua de sales al 30 %</b>		
Sal inorgánica	g/L	
NaCl	234.0	
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	41.5	
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	59.3	
KCl	6.0	
NaHCO <sub>3</sub>	0.2	
NaBr	0.7	

<b>LB (Luria-Bertani)</b>
NaCl 1 %
Triptona 1 %
Levadura 0.5 %
pH 7.4 (NaOH)
Esterilizar

<b>Medio definido para <i>Hfx. mediterranei</i> (mutantes <i>pop in</i>)</b>	
Componentes	Concentración final
Agua de sales	25 %
Casaminoácidos	0.25 %
NH <sub>4</sub> Cl	10 mM
MOPS pH 7.3	100 mM
<b>Suplementos tras esterilizar</b>	
CaCl <sub>2</sub>	4 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mM
FeCl <sub>3</sub>	5 mg/L

<b>Medio complejo para <i>Hfx. mediterranei</i> (mutantes <i>pop out</i>)</b>	
Componentes	Concentración final
Agua de sales	25 %
Extracto de levadura	0.5 %
<b>Suplementos tras esterilizar</b>	
5-FOA (150 mg/mL)	750 µg/mL

➤ **Disoluciones empleadas en las medidas de actividad**

○ **Actividad transferasa**

<b>Reactivo de hierro (1L)</b>	
HCl concentrado	7.73 mL
Ácido tricloroacético	12.04 g
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	33.33 g

○ **Actividad biosintética**

<b>Componentes de la mezcla de reacción (sustratos)</b>	<b>Volumen (mL)</b>
<b>Imidazol-HCl 1M pH 7.0</b>	0.1
<b>ATP 0.06 M</b>	0.25
<b>Glutamato 1 M pH 7.0</b>	0.2
<b>NH<sub>4</sub>Cl 1M</b>	0.1
<b>MnCl<sub>2</sub> 0.1M / MgCl<sub>2</sub> 1.67M</b>	0.1/ 0.06
<b>Agua ultrapura</b>	Hasta un volumen final de 1mL

- **Sulfato ferroso:**

FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 0.8 % es disuelto en 0.015 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

- **Molibdato de amonio:**

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4 H<sub>2</sub>O 6.6 % es disuelto en 7.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

➤ **Disoluciones empleadas en las electroforesis de proteínas**

<b>Componentes</b>	<b>Concentrador 4%</b>	<b>Separador 12%</b>
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.65 mL	4 mL
Agua destilada	3.1 mL	3.35 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL	
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8		2.5mL
SDS 10%	50 µL	100 µL
Persulfato amónico	25 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5µL

**Tampón de recorrido 5X (1L)**

15 g Tris-HCl  
72 g Glicina  
5 g SDS  
pH 8.3 (HCl)

**Tampón de muestra  
(2X Sample buffer)**

Tris-HCl 0.125M pH 6.8  
Glicerol 20 %  
SDS 4 %  
β-Mercaptoetanol 10 %  
Azul de bromofenol 0.04 %

➤ **Disolución empleada en el aislamiento de fracciones**

<b>Tampón PBS</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaCl	8
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24
pH 7.4	
Esterilizar	

➤ **Disoluciones empleadas en electroforesis de agarosa**

<b>Tampón TAE 10X</b>	<b>Concentración</b>	<b>Tampón de carga 6X</b>	<b>Concentración</b>
Tris-Acetato	0.4 mM	Azul de bromofenol	0.03 %
EDTA	10 mM	Xileno cianol	0.03 %
Ácido acético	0.2 M	Tris-HCl pH 7.6	10 mM
pH 8.4		EDTA	60 mM
		Glicerol	60 %



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

**ANEXO III: OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS****➤ Expresión heteróloga de proteínas**

Gen	Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Longitud (pb)
<i>glnA</i>	GSexpF	5'- GAATCATATGACGGAAGACAACGTA -3'	59.7	25
	GSexpR	5'- CGGGATCCGAAAGATAAGAGACT-3'	60.6	23
<i>glnA-2</i>	GSA2expF	5'- GCGAGGAACATATGAGCGACACA-3'	62.4	23
	GSA2expR	5'- GGTCGTGTTCTCAGGATCCGTTTTTA-3'	63.0	25
<i>glnA-3</i>	GSA3expF	5'- ATGGCGTAAACTGCATATGGAACC-3'	61.0	24
	GSA3expR	5'- CGAGATTGCGGATCCGAGTTACC-3'	64.2	23

**➤ Secuenciación de región central de los genes *glnA-2* y *glnA-3***

Gen	Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Longitud (pb)
<i>glnA-2</i>	GSA2-seq500F	5'- GGGACGGAAGATAAACC GC-3'	59.4	20
<i>glnA-3</i>	GSA3-seq500F	5'-GAGTTCAACGACATCGTCTTAGAG-3'	61.0	24

**➤ Mutantes de delección**

Gen	Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Longitud (pb)
<i>glnA</i>	GS1F	5'-GGAGCTTCTTGATTTGCGTGTT-3'	53.0	22
	GS1R	5'-CGCTTAGAACGTTTCCGTCATTTTCTGAACATGCA-3'	64.4	36
<i>glnA</i>	GS2F	5'-AAATGACGGAACGTTCTAAGCGCGACGAACTCTC-3'	65.6	35
	GS2R	5'-TCGTCCATCGGCACGTGAAT-3'	53.8	20
<i>glnA-3</i>	GSA3-1F	5'-GTGCTGTTTTCGAGCTCCGACG-3'	58.6	22
	GSA3-1R	5'-ACTTTAGAACGCGGGTTCCATGCTCAGTTTACGCCA-3'	66.7	36
<i>glnA-3</i>	GSA3-2F	5'-GCATGGAACCCGCGTTCTAAAGTCCGGTAACTCGA-3'	67.9	35
	GSA3-2R	5'-AGCGACGTGCGGATGTCGTAG-3'	58.3	21

➤ **RT-qPCR**

Gen	Cebador	Secuencia	Amplicon (pb)
<i>glnA</i>	rRNA 16S for	5'-CACAAGAGTGCGGTGAATACGT -3'	66
	rRNA16S rev	5'-CCTCACTCGGGTGCTTTGAC -3'	
<i>glnA-2</i>	<i>glnA-2</i> for	5'-GGTCGACCCGTGTGACCTC -3'	51
	<i>glnA-2</i> rev	5'-TTGATCCCTTTGCGGTCC -3'	
<i>glnA-3</i>	<i>glnA-3</i> for	5'-CTGCTGTACGTCGGCAATGA -3'	51
	<i>glnA-3</i> rev	5'-CCGCTTTACCGAATGGCC -3'	
<i>gdhA1</i>	<i>gdhA1</i> for	5'-TGGATAACGGAGATGTCGGC-3'	55
	<i>gdhA1</i> rev	5'-GTCGCCGTTAAACTGCGAG-3'	
<i>nasA</i>	<i>nasA</i> for	5'-GACGACCTGTATGCGCTGTG-3'	53
	<i>nasA</i> rev	5'-CCAGTGCAAGTGAACCCAG-3'	
<i>nasD</i>	<i>nasD</i> for	5'-TCGCTGGCTCAGAGACAATG-3'	51
	<i>nasD</i> rev	5'-CTGCTGCAGGTGGTCAATT-3'	

**ANEXO IV:****Tabla 36:** Concentración y pureza de los DNAs aislados de cada uno de los mutantes *pop-out* y de la cepa control.

Muestra	Nombre	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	$A_{260}/A_{280}$
DNA control	HM26 1	1.95	1.68
	<b>HM26 2</b>	<b>2.05</b>	<b>1.68</b>
	HM26 3	0.98	1.56
	HM26 4	1.65	1.67
Mutante 7	<b>7.1</b>	<b>0.99</b>	<b>1.69</b>
	7.2	0.49	1.66
	7.3	0.31	1.63
	7.4	0.41	1.74
Mutante 17	17.1	0.27	1.62
	<b>17.2</b>	<b>0.32</b>	<b>1.57</b>
	17.3	0.30	1.69
	17.4	0.29	1.65
Mutante 19	19.1	0.33	1.62
	<b>19.2</b>	<b>0.36</b>	<b>1.72</b>
	19.3	0.29	1.73
	19.4	0.28	1.63
Mutante 31	31.1	0.36	1.56
	31.2	0.32	1.54
	31.3	0.25	1.64
	<b>31.4</b>	<b>0.37</b>	<b>1.73</b>
Mutante 32	32.1	0.28	1.74
	<b>32.2</b>	<b>0.42</b>	<b>1.57</b>
	32.3	0.37	1.66
	32.4	0.35	1.64
Mutante 33	<b>33.1</b>	<b>0.41</b>	<b>1.61</b>
	33.2	0.33	1.56
	33.3	0.27	1.60
	33.4	0.29	1.66



# ÍNDICE DE FIGURAS



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante

## 8. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Árbol filogenético universal basado en la comparación de secuencias de rRNA, tomado de Woese, 1996. ....	28
<b>Figura 2:</b> Árbol filogenético de los <i>phyla</i> del Dominio <i>Archaea</i> .....	32
<b>Figura 3:</b> Reacciones redox del ciclo del nitrógeno.....	38
<b>Figura 4:</b> Metabolismo del nitrógeno en <i>Hfx. mediterranei</i> .....	41
<b>Figura 5:</b> Mecanismo de reacción de la enzima glutamina sintetasa. ....	44
<b>Figura 6:</b> Estructuras de las enzimas glutamina sintetasa dodecámicas GSI- $\alpha$ de <i>Bacillus subtilis</i> y GSI- $\beta$ de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	47
<b>Figura 7:</b> Estructura de glutamina sintetasa bacteriana.....	49
<b>Figura 8:</b> Estructura de glutamina sintetasa del maíz (GSa1). (A) Estructura vista desde arriba, cada subunidad se muestra en un color diferente. (B) Vista lateral de la estructura de la GS del maíz. ....	51
<b>Figura 9:</b> Estructura tridimensional decaamérica de glutamina sintetasa canina, en la que cada subunidad muestra un color diferente. ....	52
<b>Figura 10:</b> Estructura cristalina tridimensional de GSIII de <i>Bacteroides fragilis</i> . Estructura dodecamérica coloreada según la posición de los residuos. A la derecha se muestra únicamente un solo monómero.....	53
<b>Figura 11:</b> Regulación de la actividad glutamina sintetasa y de la expresión de <i>glnA</i> en <i>E. coli</i> . El color azul indica exceso de nitrógeno y el color rojo deficiencia de nitrógeno.....	55
<b>Figura 12:</b> Regulación de la transcripción de genes de asimilación de nitrógeno y de la actividad NAGK en cianobacterias unicelulares. El color azul indica exceso de nitrógeno y el color rojo deficiencia de nitrógeno. ....	58

<b>Figura 13:</b> Regulación de la GS en <i>Methanosarcina mazei</i> mediante interacción directa de GlnK y 2-oxoglutarato sobre la enzima glutamina sintetasa.....	59
<b>Figura 14:</b> Regulación de <i>glnA</i> mediante interacción directa con el represor NrpR en <i>Methanococcus maripaludis</i> . .....	60
<b>Figura 15:</b> Mapa del vector pGEM®-T Easy.....	75
<b>Figura 16:</b> Programa de PCR de amplificación del gen <i>glnA</i> de <i>Hfx. mediterranei</i> . .....	76
<b>Figura 17:</b> Mapa del vector de expresión pET3a. ....	78
<b>Figura 18:</b> Programa de PCR para la amplificación de los genes <i>glnA-2</i> y <i>glnA-3</i> de <i>Hfx. mediterranei</i> . ....	80
<b>Figura 19:</b> Mapa del plásmido pMH101. Los sitios de clonación de extremos romos se muestran con estrellas de color púrpura.....	91
<b>Figura 20:</b> Amplificación de las bandas de 500 pb.....	92
<b>Figura 21:</b> Programa de PCR para la amplificación de los fragmentos de 500 pb de los genes <i>glnA</i> y <i>glnA-3</i> de <i>Hfx. mediterranei</i> . ....	93
<b>Figura 22:</b> Programa de PCR para la generación de la banda de 1000 pb.....	95.
<b>Figura 23:</b> Programa empleado para la PCR <i>screening</i> de las colonias. ....	98
<b>Figura 24:</b> Programa de PCR <i>screening</i> a partir del DNA aislado, que se empleó para los mutantes <i>pop-in</i> , <i>pop-out</i> y HM26. ....	100
<b>Figura 25:</b> Programa de PCR para la generación de la sonda de la glutamina sintetasa.....	102
<b>Figura 26:</b> Diseño experimental en loop de los arrays de expresión.....	106

# ÍNDICE DE TABLAS



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 9. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Genotipo y función de las cepas microbianas.....	68
<b>Tabla 2:</b> Mezcla de reacción de la actividad transferasa de la GS.....	70
<b>Tabla 3:</b> Concentración de los reactivos utilizados para la amplificación del gen de la glutamina sintetasa ( <i>glnA</i> ) de <i>Hfx. mediterranei</i> .....	76
<b>Tabla 4:</b> Concentración de los reactivos utilizados para la amplificación de los genes <i>glnA-2</i> y <i>glnA-3</i> de <i>Hfx. mediterranei</i> .....	79
<b>Tabla 5:</b> Condiciones de PCR para la amplificación de DNA genómico de los genes <i>glnA</i> y <i>glnA-3</i> .....	92
<b>Tabla 6:</b> Concentración de los reactivos empleados para la amplificación de las bandas de 500 pb.....	93
<b>Tabla 7:</b> Concentración de los reactivos empleados para la etapa de <i>fill-in</i> .....	94
<b>Tabla 8:</b> Condiciones de la PCR de fusión.....	94
<b>Tabla 9:</b> Concentraciones de los componentes de la reacción de digestión del vector pMH101N.....	95
<b>Tabla 10:</b> Concentración de los componentes de la reacción de ligación del producto de fusión con el vector pMH101N.....	96
<b>Tabla 11:</b> Concentraciones de los componentes de la mezcla de PCR para la reacción de PCR screening de las colonias.....	97
<b>Tabla 12:</b> Concentraciones de los componentes de la reacción de PCR <i>screening</i> .....	99
<b>Tabla 13:</b> Concentraciones de los componentes de la reacción de PCR para sintetizar la sonda de GS.....	102



# ABREVIATURAS



Universitat d'Alacant  
Universidad de Alicante



## 10. ABREVIATURAS

<b>ADP</b>	Adenosín 5'- difosfato
<b>Ae</b>	Actividad específica
<b>AUC</b>	Ultracentrifugación analítica
<b>2-BME</b>	2-mercaptoetanol
<b>DLS</b>	Dispersión de luz dinámica
<b>DMS</b>	Dimetilsuberimidato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDC</b>	1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreuro
<b>EDTA</b>	Ácido etilén-diamino-tetraacético
<b>5-FOA</b>	Ácido 5-fluororótico
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>Hfx.</b>	Haloferax
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactósido
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>MOPS</b>	Ácido 3-(n-morfolino)- propanosulfónico
<b>Mr</b>	Masa molecular
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>TAE</b>	Tampón Tris-acetato-EDTA
<b>TBST</b>	Tampón tris salino que contiene Tween 20 0.1 %
<b>TRIS</b>	Tri-(hidroximetil)-aminometano
<b>V<sub>máx</sub></b>	Velocidad enzimática máxima
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa

