

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 63 número 91
correspondiente a
Sevilla, 1997

El Jefe del Negociado de Tesis,
Ángeles López

**SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS, AMONIO Y UREA EN
CIANOBACTERIAS**

R.15776



Trabajo presentado para optar al grado de
Doctora en Biología por la Licenciada
María de la Luz Montesinos Gutiérrez

Sevilla, Octubre de 1997

Director:

Dr. Enrique Flores García
Investigador Científico del C.S.I.C.

Directora:

Dra. Antonia Herrero Moreno
Colaboradora Científica del C.S.I.C.

Tutor:

Dr. Pedro Candau Chacón
Profesor Titular de Bioquímica
y Biología Molecular

TD 379



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOACIDOS, AMONIO Y UREA EN CIANOBACTERIAS sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

MONTESINOS GUTIERREZ, M^{ra} DE LA LUZ

Por indicación de M^{ra} Luz Montesinos,
en su ausencia.

Firmado: Emilia Flores

Sevilla, a 27 de enero de 1998

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS	13
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. BIOLOGÍA DE LAS CIANOBACTERIAS	17
1.2. DIFERENCIACIÓN DEL HETEROCISTO Y RELACIONES INTERCELULARES EN CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS	20
1.3. HERRAMIENTAS DE GENÉTICA MOLECULAR DISPONIBLES PARA EL ESTUDIO DE LAS CIANOBACTERIAS	22
1.4. ESTRUCTURA Y FISIOLÓGIA DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA	23
1.4.1. Sistemas monocomponente de transporte secundario	25
1.4.2. Sistemas de transporte "tipo ABC" o multicomponente	26
1.4.3. Transporte de aminoácidos, amonio y urea en cianobacterias	30
2. MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	35
2.1.1. Cianobacterias	35
2.1.1.1. Estirpes empleadas	35
2.1.1.2. Condiciones de cultivo	35
2.1.1.3. Curvas de crecimiento	36
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	38
2.1.2.1. Estirpes empleadas	38
2.1.2.2. Condiciones de cultivo	38
2.1.3. Método de recogida y lavado de células	39
2.2. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS DE CIANOBACTERIAS RESISTENTES A ANÁLOGOS TÓXICOS DE AMINOÁCIDOS	39
2.3. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS	39
2.3.1. Determinación de la actividad de transporte de aminoácidos	39
2.3.2. Determinación de la linealidad de los ensayos	40
2.3.3. Determinación de los parámetros K_S y V_{max}	40
2.3.4. Determinación del efecto de la adición de aminoácidos no marcados radiactivamente sobre el transporte de aminoácidos marcados (ensayos de competencia)	41

2.4. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE UREA, CIANATO Y METILAMONIO	41
2.4.1. Transporte de urea	41
2.4.2. Transporte de cianato	41
2.4.3. Transporte de metilamonio	41
2.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD NITROGENASA Y DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE HETEROCISTOS	42
2.6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA	43
2.7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD UREASA	44
2.8. RESOLUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y OTROS COMPUESTOS METABÓLICOS	44
2.8.1. Obtención y preparación de las muestras	44
2.8.2. Cromatografía en capa fina (TLC)	45
2.8.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	46
2.8.4. Determinación de aminoácidos totales con ninhidrina	47
2.9. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CELULARES	47
2.9.1. Determinación de proteína	47
2.9.2. Determinación de clorofila	47
2.10. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA	48
2.10.1. Plásmidos utilizados	48
2.10.2. Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a pequeña escala	49
2.10.3. Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i> a gran escala	49
2.10.4. Aislamiento de DNA total de cianobacterias	50
2.10.5. Determinación de la concentración de DNA	50
2.10.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	50
2.10.7. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa	51
2.10.8. Restricción del DNA	51
2.10.9. Desfosforilación del DNA	51
2.10.10. Relleno de extremos 5' protuberantes	52
2.10.11. Ligación del DNA	52
2.10.12. Marcaje radiactivo de sondas de DNA	52
2.10.13. Transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nylon e hibridación con sondas radiactivas de DNA (análisis de Southern)	52
2.10.14. Transferencia de DNA plasmídico de colonias de <i>E. coli</i> a filtros de nitrocelulosa e hibridación con sondas radiactivas	53

2.10.15. Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
2.10.16. Secuenciación de DNA	55
2.10.17. Ensayos de retardo en gel	56
2.11. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE RNA	56
2.11.1. Aislamiento de RNA de cianobacterias	56
2.11.2. Determinación de la concentración de RNA	57
2.11.3. Electroforesis de RNA en geles de agarosa	57
2.11.4. Transferencia de RNA de geles de agarosa a filtros de nylon e hibridación con sondas radiactivas de DNA (análisis de "Northern")	57
2.11.5. Ensayos de extensión de cebadores	58
2.11.6. Marcaje de RNA e hibridación con DNA unido a filtros de nitrocelulosa	59
2.12. MÉTODOS GENÉTICOS	59
2.12.1. Transferencia de DNA a <i>E. coli</i> mediante transformación	59
2.12.2. Transferencia de DNA a <i>Synechocystis</i> sp. mediante transformación	60
2.12.3. Transferencia de DNA a <i>Anabaena</i> sp. mediante conjugación	60
2.13. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEÍNAS	61
3. RESULTADOS	63
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS DE DIVERSAS CIANOBACTERIAS	65
3.1.1. Transporte de aminoácidos en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	65
3.1.2. Transporte de aminoácidos en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7937, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7413, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7107, <i>Calothrix</i> sp. PCC 7601, <i>Fischerella muscicola</i> UTEX 1829, <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903, <i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942 y <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	71
3.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS DE DIVERSAS CIANOBACTERIAS	75
3.2.1. Mutantes de transporte de aminoácidos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	76

3.2.2. Mutantes de transporte de aminoácidos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7937, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7413, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7107, <i>Calothrix</i> sp. PCC 7601 y <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	81
3.2.3. Estudio de la capacidad de crecimiento diazotrófico de algunos mutantes de cianobacterias afectados en el transporte de aminoácidos	84
3.2.4. Acumulación de aminoácidos en el medio de cultivo de los mutantes de transporte de aminoácidos neutros de diversas estirpes de cianobacterias	87
3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES <i>natA</i> Y <i>natB</i> DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS DE <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE LOS MISMOS	95
3.3.1. Generación de los mutantes <i>natA</i> y <i>natB</i> derivados de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y actividades de transporte de aminoácidos de los mismos	95
3.3.2. Acumulación de aminoácidos en el medio de cultivo de los mutantes <i>natA</i> y <i>natB</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	103
3.3.3. Presencia de secuencias homólogas a los genes <i>natA</i> y <i>natB</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en otras estirpes de cianobacterias	103
3.4. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE GENES <i>nat</i> DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	104
3.4.1. Clonación y secuenciación de los genes <i>natA</i> y <i>natC</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	104
3.4.2. Inactivación de los genes <i>natA</i> y <i>natC</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes generados	112
3.4.3. Crecimiento diazotrófico de los mutantes <i>natA</i> y <i>natC</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	114
3.5. IDENTIFICACIÓN DEL GEN <i>urtA</i> DE TRANSPORTE DE UREA DE <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	116
3.6. TRANSPORTE DE AMONIO/METILAMONIO: CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES <i>amt1</i> , <i>amt2</i> Y <i>amt3</i> DE <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	118
3.6.1. Caracterización del transporte de amonio/metilamonio en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	118
3.6.2. Inactivación de las ORFs <i>sll0108</i> , <i>sll1017</i> y <i>sll0537</i> y actividades de transporte de metilamonio de los mutantes generados	121

3.6.3. Regulación por nitrógeno de la expresión de los genes <i>amt1</i> , <i>amt2</i> y <i>amt3</i>	127
3.6.4. Determinación del nucleótido de inicio de la transcripción del gen <i>amt1</i>	128
3.6.5. Ensayos de retardo en gel de la región promotora del gen <i>amt1</i>	131
3.6.6. Presencia de secuencias homólogas a los genes <i>amt1</i> , <i>amt2</i> y <i>amt3</i> en otras estirpes de cianobacterias	132
4. DISCUSIÓN	135
4.1. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EN CIANOBACTERIAS	137
4.1.1. Transporte de aminoácidos en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	137
4.1.2. Transporte de aminoácidos en otras estirpes de cianobacterias	139
4.1.3. Identificación de genes de sistemas de transporte de aminoácidos	143
4.1.4. Funciones fisiológicas del transporte de aminoácidos en cianobacterias	147
4.1.4.1. Utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno	147
4.1.4.2. Retención cíclica de aminoácidos hidrofóbicos	148
4.1.4.3. Papel en el crecimiento diazotrófico de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	150
4.2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE UREA Y AMONIO EN <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	153
4.2.1. Transporte de urea	153
4.2.2. Transporte de amonio	154
5. CONCLUSIONES	157
6. BIBLIOGRAFÍA	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Algunas cianobacterias empleadas en este trabajo	37
Figura 2.	Dependencia de la actividad de transporte de aminoácidos con respecto al tiempo en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	66
Figura 3.	Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Arg sobre la tasa de transporte de Arg en <i>Nostoc</i> sp. PCC 7413	73
Figura 4.	Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Asp sobre la tasa de transporte de Asp en <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	74
Figura 5.	Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Glu sobre la tasa de transporte de Glu en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	75
Figura 6.	Cromatogramas de muestras de extractos celulares de las estirpes <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y CS343	79
Figura 7.	Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Asp sobre la tasa de transporte de Asp en los mutantes CS448 y CS446 derivados de <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	83
Figura 8.	Efecto del Glu sobre el transporte de Asp en <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	84
Figura 9.	Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS389 y CS349 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	85
Figura 10.	Crecimiento en medio con nitrato o sin nitrógeno combinado de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS349 y CS389 derivados de la misma	86
Figura 11.	Fotografías al microscopio óptico de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS389 y CS349 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 cultivados en medio sin nitrógeno combinado	88
Figura 12.	Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CS440, CS454, CS447 y CS453 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7937	89

Figura 13.	Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CS441 y CS456 derivados de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7413	89
Figura 14.	Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CS442 y CS457 derivados de <i>Nostoc</i> sp. PCC 7107	90
Figura 15.	Cromatogramas de muestras del medio extracelular de cultivos de la estirpe <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de los mutantes CS326 y CS343	91
Figura 16.	Cromatografía en capa fina (TLC) bidimensional de muestras del medio extracelular de cultivos de las estirpes <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y CS326 incubadas en medio con bicarbonato radiactivo	92
Figura 17.	Cromatogramas de muestras del medio extracelular de cultivos de las estirpes <i>Anabaena</i> sp. PCC 7937, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7413, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7107, <i>Calothrix</i> sp. PCC 7601, <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903 y de los mutantes de transporte de aminoácidos derivados de las mismas CS440, CS441, CS442, CS451 y CS446	93
Figura 18.	Representación esquemática de las ORFs del genomio de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 inactivadas mediante inserción de la casete C.K3	98
Figura 19.	Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Glu sobre la tasa de transporte de Glu en el mutante CSX28a derivado de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	102
Figura 20.	Cromatogramas de muestras del medio de cultivo de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de los mutantes CSX28a (<i>natA</i>) y CSX18b (<i>natB</i>)	104
Figura 21.	Presencia de secuencias homólogas a los genes <i>natA</i> y <i>natB</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en otras estirpes de cianobacterias	105
Figura 22.	Hibridación del inserto del plásmido pCSX36 con DNA total de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	106
Figura 23.	Representación esquemática de la región genómica que contiene los genes <i>natC</i> y <i>natA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	107
Figura 24.	Secuencia de nucleótidos de la región genómica de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 que contiene los genes <i>natC</i> y <i>natA</i> y secuencias de aminoácidos de las proteínas deducidas	109

Figura 25.	Comparación de la secuencia de aminoácidos del producto del gen <i>natC</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 con la del producto hipotético de la ORF <i>sll0146</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y con las de las proteínas BraE de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y LivM de <i>Salmonella typhimurium</i>	110
Figura 26.	Perfil de hidrofobicidad de la proteína NatC de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	111
Figura 27.	Comparación de la secuencia de aminoácidos del producto del gen <i>natA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 con la de las proteínas NataA de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, BraF de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y LivG de <i>Salmonella typhimurium</i>	111
Figura 28.	Estructura cromosómica de los mutantes CSX60 y CSX62 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 en la zona que contiene los genes <i>natC</i> y <i>natA</i>	113
Figura 29.	Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CSX60 y CSX62 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	115
Figura 30.	Inducción del crecimiento diazotrófico de los mutantes CSX60 y CSX62 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	115
Figura 31.	Presencia de secuencias homólogas al gen <i>urtA</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en otras estirpes de cianobacterias	118
Figura 32.	Cinética de la actividad de transporte de metilamonio en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	119
Figura 33.	Inhibición por amonio del transporte de metilamonio en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	120
Figura 34.	Representación esquemática de las ORFs <i>sll0108</i> , <i>sll0107</i> y <i>sll0537</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de las inserciones llevadas a cabo en las mismas	122
Figura 35.	Estructura genómica de los mutantes CSX47a, CSX47b, CSX57, CSX201, CSX56 y CSX200 derivados de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	124
Figura 36.	Transporte de metilamonio, suministrado a baja concentración, en los mutantes CSX47a, CSX200 y CSX201 derivados de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	126
Figura 37.	Análisis de "Northern" de la expresión de los genes <i>amt1</i> , <i>amt2</i> y <i>amt3</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno	127

Figura 38.	Expresión relativa de los genes <i>amt1</i> , <i>amt2</i> y <i>amt3</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno	129
Figura 39.	Determinación del nucleótido de inicio de la transcripción del gen <i>amt1</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	130
Figura 40.	Ensayos de retardo en gel, provocado por la proteína NtcA, de fragmentos de DNA de la zona 5' del gen <i>amt1</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	131
Figura 41.	Presencia de secuencias homólogas a los genes <i>amt1</i> , <i>amt2</i> y <i>amt3</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 en otras estirpes de cianobacterias	133

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo	35
Tabla 2.	Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo	38
Tabla 3.	Plásmidos utilizados en este trabajo	48
Tabla 4.	Actividades de transporte de aminoácidos de células de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 cultivadas con distintas fuentes de nitrógeno	67
Tabla 5.	Características de las actividades de transporte de aminoácidos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	68
Tabla 6.	Efecto de diversos aminoácidos sobre el transporte de Asn, Leu, Met y Thr en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	69
Tabla 7.	Destino metabólico de los aminoácidos suministrados en los ensayos de transporte en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	70
Tabla 8.	Actividades de transporte de aminoácidos de distintas estirpes de cianobacterias	72
Tabla 9.	Mutantes de diversas estirpes de cianobacterias resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos	76
Tabla 10.	Actividades de transporte de aminoácidos de diversos mutantes resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	78
Tabla 11.	Concentraciones intracelulares de Met, Gly, Ser, Thr e Ile en los mutantes CS341 y CS342 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	80
Tabla 12.	Actividades de transporte de algunos aminoácidos de los mutantes CS341 y CS342 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	80
Tabla 13.	Características cinéticas del transporte de Ala, Asn, Gln y Ser en el mutante CS343 derivado de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	81
Tabla 14.	Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7937, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7413, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7107, <i>Calothrix</i> sp. PCC 7601 y <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	82
Tabla 15.	Frecuencia de heterocistos y actividad nitrogenasa de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS389 y CS349 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	86

Tabla 16.	Concentraciones de aminoácidos en el medio extracelular de cultivos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 y de mutantes de transporte de aminoácidos derivados de la misma	91
Tabla 17.	Concentraciones de aminoácidos en el medio extracelular de cultivos de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7937, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7413, <i>Nostoc</i> sp. PCC 7107, <i>Calothrix</i> sp. PCC 7601 y <i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903 y de mutantes de transporte de aminoácidos derivados de dichas cianobacterias	94
Tabla 18.	ORFs de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 seleccionadas para su estudio en este trabajo cuyos productos hipotéticos muestran homología con proteínas de transporte de otros organismos	96
Tabla 19.	Plásmidos construidos para la inactivación insercional de las ORFs <i>slr0075</i> , <i>sll0484</i> , <i>slr0467</i> , <i>sll0374</i> , <i>sll0064</i> , <i>sll0606</i> , <i>slr0559</i> , <i>slr0700</i> y <i>slr0468</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	99
Tabla 20.	Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX15, CSX29b, CSX26, CSX13, CSX19 y CSX39 derivados de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	100
Tabla 21.	Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes de las ORFs <i>slr0467</i> y <i>slr0559</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	101
Tabla 22.	Características cinéticas del transporte de Glu en presencia de diferentes concentraciones de Gln en el mutante CSX28a derivado de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	103
Tabla 23.	Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX60 y CSX62 derivados de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	114
Tabla 24.	Actividades de transporte de urea y cianato de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 y de los mutantes CSX15, CSX29b, CSX26, CSX13 y CSX19 derivados de la misma	116
Tabla 25.	Destino metabólico del metilamonio suministrado en los ensayos de transporte en <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	121
Tabla 26.	ORFs del genomio de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 cuyos productos hipotéticos muestran homología con la permeasa AMT1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	121
Tabla 27.	Plásmidos construidos para la inactivación insercional de las ORFs <i>sll0108</i> , <i>sll1017</i> y <i>sll0537</i> de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	123
Tabla 28.	Actividades de transporte de metilamonio de los mutantes CSX47a, CSX47b, CSX57, CSX56, CSX201 y CSX200 derivados de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, cultivados con distintas fuentes de nitrógeno	124

Tabla 29.	Niveles de actividad glutamina sintetasa de los mutantes CSX47a y CSX47b derivados de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 cultivados con distintas fuentes de nitrógeno	125
Tabla 30.	Sistemas o actividades de transporte de aminoácidos presentes en las cianobacterias incluidas en este trabajo	143

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
aa	Aminoácido
ADP	Difosfato de adenosina
Ap	Ampicilina
Ap ^r	Resistencia a la ampicilina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
ATP	Trifosfato de adenosina
Bis-acrilamida	N,N',-metilén-bis-acrilamida
CCCP	Carbonil-cianido- <i>m</i> -clorofenilhidrazona
Chl	Clorofila <i>a</i>
Cm	Cloranfenicol
Cm ^r	Resistencia al cloranfenicol
CPM	Cuentas por minuto
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DCCD	N,N'-diclorohexilcarbodiimida
dCTP	Trifosfato de desoxicitidina
DEAE	Dietilaminoetil
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina
DNasa	Desoxirribonucleasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Trifosfato de desoxitimidina
E	Einstein o coeficiente de extinción (según el contexto)
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
Etidio	3,8-diamino-6-etil-5-fenil fenantridio
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
HEPES	Ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	kilobase
Km	Kanamicina
Km ^r	Resistencia a la kanamicina
K _s	Constante de semisaturación
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Mb	Megabase
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MSX	L-metionina-D,L-sulfoximina
MTA	Mezcla de bromuros de alquiltrimetilamonio
NAD(P)H	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-(fosfato)-reducido
Nm	Neomicina
OPA	<i>o</i> -ftalaldehído
ORF	Pauta abierta de lectura
p/v	Relación peso/volumen
pb	Par de bases
PCC	Colección de Cultivos Tipo del Instituto Pasteur
PEG	Polietilenglicol
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Laurilsulfato sódico
Sm	Estreptomina
Sm ^r	Resistencia a la estreptomina
Sp	Espectinomina
Sp ^r	Resistencia a la espectinomina
Tc ^r	Resistencia a la tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina
TES	Ácido N-tris(hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfónico
TLC	Cromatografía en capa fina



Tricina	N-tris(hidroximetil) metilglicina
Tris	Tris-(hidroximetil) aminoetano
U	Unidad de actividad enzimática o marcaje radiactivo uniforme (según el contexto)
UTEX	Colección de cultivos de algas de la Universidad de Texas
v/v	Relación volumen/volumen
V_{max}	Velocidad máxima
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Bases nitrogenadas

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timina

Aminoácidos

A	Ala	alanina
R	Arg	arginina
N	Asn	asparragina
D	Asp	ácido aspártico
C	Cys	cisteína
E	Glu	ácido glutámico
Q	Gln	glutamina
G	Gly	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
K	Lys	lisina
M	Met	metionina
F	Phe	fenilalanina
P	Pro	prolina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
W	Trp	triptófano
Y	Tyr	tirosina
V	Val	valina

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOLOGÍA DE LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son organismos procarióticos que se caracterizan por realizar una fotosíntesis oxigénica similar a la que llevan a cabo las plantas superiores (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Un rasgo distintivo de las cianobacterias es la presencia en las mismas de clorofila *a* y de una serie de pigmentos antena denominados genéricamente ficobiliproteínas. Muchas estirpes cianobacterianas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones aeróbicas, siendo los únicos organismos que pueden realizar simultáneamente los procesos de fotosíntesis oxigénica y fijación de dinitrógeno.

El papel de las cianobacterias en la evolución de la vida en la Tierra ha sido notabilísimo, ya que estos microorganismos fueron los responsables de la aparición en la atmósfera del oxígeno, generado como subproducto de la fotólisis del agua que ocurre en el proceso de fotosíntesis (Buick, 1992). Por otra parte, la importancia ecológica de este grupo biológico se manifiesta, por ejemplo, en su contribución a la productividad primaria de los océanos que, dependiendo de la localización considerada, oscila entre un 10 y un 60%. Los hábitats que ocupan las cianobacterias son muy diversos, encontrándose no sólo en los océanos, sino también en los suelos y aguas continentales, e incluso en ambientes extremos como aguas termales y desiertos, así como en asociación simbiótica con plantas.

Las cianobacterias constituyen un grupo morfológicamente muy diverso, que incluye estirpes unicelulares y filamentosas. Muchas estirpes filamentosas son capaces de llevar a cabo procesos de diferenciación celular, como son el desarrollo de acinetos, hormogonios o heterocistos. Los acinetos son células de resistencia que se diferencian como respuesta a situaciones ambientales desfavorables (Nichols y Adams, 1982). Los hormogonios son pequeños filamentos móviles que tienen un papel en la dispersión de estos organismos (Tandeau de Marsac, 1994). Finalmente, los heterocistos son células especializadas en la fijación del nitrógeno atmosférico (Wolk *et al.*, 1994), siendo precisamente la diferenciación del heterocisto el proceso de desarrollo que se ha estudiado con mayor profusión, como se verá más adelante.

La heterogeneidad de este grupo de microorganismos también se manifiesta en el porcentaje de G+C de su DNA, que oscila entre un 35 y un 70% (Herdman *et al.*, 1979), rango sólo ligeramente menor al que muestran los organismos procarióticos en su conjunto (30-75%, aproximadamente).

Tradicionalmente las cianobacterias se han clasificado en cinco grupos taxonómicos (Rippka *et al.*, 1979). La Sección I incluye estirpes unicelulares que se dividen por fisión binaria o por gemación; a esta sección pertenecen los géneros *Synechococcus* y *Synechocystis*. La Sección II está formada por estirpes unicelulares que se dividen mediante fisión múltiple, como las de los géneros *Dermocarpa* o *Pleurocapsa*.

La Sección III agrupa a las estirpes filamentosas no formadoras de heterocistos, como las de los géneros *Pseudanabaena*, *Plectonema* y *Spirulina*, entre otros. La Sección IV está constituida por estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en un solo plano, por lo que los filamentos no presentan ramificaciones verdaderas; los géneros *Anabaena*, *Nostoc* y *Calothrix* están incluidos en esta sección. Finalmente, en la Sección V se agrupan las estirpes filamentosas formadoras de heterocistos cuyas células se dividen en más de un plano, dando lugar a filamentos ramificados, como las estirpes del género *Fischerella*.

Mediante la comparación de las secuencias de los RNAr 16S de estirpes representativas de estos grupos taxonómicos, se ha establecido que sólo la Sección II y, conjuntamente, las Secciones IV y V forman grupos filogenéticamente coherentes (Giovannoni *et al.*, 1988). Por otra parte, estos estudios también han puesto de manifiesto la relación filogenética que existe entre las cianobacterias, las proclorofitas, los cloroplastos de las plantas superiores y de las algas eucarióticas y el orgánulo fotosintético del fitoflagelado *Cyanophora paradoxa*. Estos resultados muestran el origen endosimbiótico del cloroplasto a partir de un organismo de tipo cianobacteriano.

Contrastando con su diversidad morfológica, las cianobacterias constituyen un grupo muy homogéneo desde el punto de vista metabólico. Así, la asimilación del carbono ocurre principalmente mediante el ciclo reductivo de las pentosas fosfato o ciclo de Calvin, que permite la fijación del CO₂ atmosférico gracias a dos enzimas clave, la fosforribulokinasa y la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Parte del CO₂ fijado se acumula como glucógeno, que sirve de material de reserva que se emplea en los períodos de vida en oscuridad, cuando no tiene lugar la fotosíntesis. Algunas cianobacterias son capaces también de asimilar glucosa o fructosa, necesitando o no iluminación para ello, por lo que pueden clasificarse como fotoheterótrofas o heterótrofas facultativas, respectivamente; esta capacidad depende fundamentalmente de la existencia de la permeasa correspondiente que facilite la entrada del azúcar en la célula. Tanto el glucógeno de reserva como los azúcares exógenos se metabolizan mediante el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). Cabe destacar el hecho de que las cianobacterias presenten un ciclo de Krebs incompleto, ya que no existe la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa (Stanier y Cohen-Bazire, 1977), por lo que en este caso la ruta tiene una función solamente anabólica, suministrando el α -cetoglutarato necesario para la síntesis de aminoácidos de la familia del Glu y la síntesis del δ -aminolevulinato, que es el precursor inmediato para la biosíntesis de porfirinas, ficobilinas y clorofila (Beale, 1994).

Un aspecto muy estudiado de la biología de las cianobacterias es la asimilación de nitrógeno (revisado recientemente por Flores y Herrero, 1994). Las principales fuentes de nitrógeno inorgánico utilizadas por las cianobacterias son el amonio, el nitrato y el

nitrito, pero, como ya se ha mencionado, muchas estirpes también pueden utilizar el nitrógeno atmosférico (régimen que se denomina crecimiento diazotrófico). Algunas cianobacterias son capaces de asimilar fuentes de nitrógeno orgánico como la urea o ciertos aminoácidos, entre los que se incluyen principalmente la Arg, la Asn y la Gln, aunque estos últimos son fuentes de nitrógeno pobres. La urea, sin embargo, es una buena fuente de nitrógeno para muchas cianobacterias y, aunque tradicionalmente no se le ha concedido mucha importancia, su abundancia en los hábitats naturales de estos organismos (0,1-5 μM en los mares) la convierten en una fuente de nitrógeno de importancia cuantitativamente similar a la del nitrato o el amonio (Flores y Herrero, 1994). El cianato también puede servir como fuente de nitrógeno para las cianobacterias (Miller y Espie, 1994).

En el proceso de asimilación de nitrato, éste se reduce hasta nitrito mediante la enzima nitrato reductasa, y el nitrito se reduce posteriormente hasta amonio con el concurso de la enzima nitrito reductasa. Las estirpes que son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico lo hacen mediante la enzima nitrogenasa, que reduce el dinitrógeno hasta amonio. La urea se hidroliza por la acción de la enzima ureasa, generando dióxido de carbono y amonio. Por último, la cianasa metaboliza el cianato, originando, como en el caso anterior, amonio y dióxido de carbono.

En todos los casos mencionados, el compuesto empleado como fuente de nitrógeno se convierte en el interior celular finalmente en amonio, que se asimila mediante la ruta denominada GS-GOGAT. En esta ruta, la glutamina sintetasa (GS) cataliza la formación, dependiente de ATP, de Gln a partir de Glu y amonio, que posteriormente pasa a reaccionar con α -cetoglutarato para originar dos moléculas de Glu mediante la acción de la enzima glutamato sintasa (GOGAT). De este modo, el nitrógeno queda asimilado en forma de Glu, que sirve como donador (junto con la Gln) para la síntesis de otros compuestos nitrogenados de la célula.

El hecho de que las distintas reacciones de asimilación de compuestos nitrogenados confluyan en la generación de amonio permite la existencia de un sistema de regulación general que consiste en la inhibición por amonio de la actividad y/o la expresión de las proteínas implicadas en la asimilación de fuentes de nitrógeno alternativas al propio amonio (Flores y Herrero, 1994). En los últimos años se ha identificado y caracterizado el gen *ntcA*, ampliamente distribuido entre las cianobacterias, que determina una proteína reguladora. La proteína NtcA presenta un dominio hélice-vuelta-hélice de unión a DNA y es un activador transcripcional que regula la expresión de los genes sometidos a control por nitrógeno en las cianobacterias (Vega-Palas *et al.*, 1992; Frías *et al.*, 1993). Se ha determinado la estructura de los promotores regulados por NtcA, que responde al consenso GTAN₈TAC...N₂₂...TAN₃TN₄₋₆+1 (Luque *et al.*, 1994), donde +1 indica el sitio de inicio de la transcripción del gen regulado y N representa

cualquier nucleótido.

1.2. DIFERENCIACIÓN DEL HETEROCISTO Y RELACIONES INTERCELULARES EN CIANOBACTERIAS FILAMENTOSAS

Como ya se ha indicado, algunas cianobacterias filamentosas son capaces de desarrollar, como respuesta a la falta de nitrógeno combinado en el medio, un tipo celular especializado en la fijación del nitrógeno atmosférico denominado heterocisto (revisado por Wolk *et al.*, 1994). En el heterocisto se confina, en condiciones de aerobiosis, la expresión de los genes *nifHDK* que determinan la nitrogenasa, el complejo enzimático que lleva a cabo la fijación del dinitrógeno. La nitrogenasa es muy sensible al oxígeno y se inactiva rápida e irreversiblemente en presencia del mismo. Este problema, común a todas las nitrogenasas conocidas, tiene especial importancia en el caso de las cianobacterias, ya que en el proceso de fotosíntesis que llevan a cabo estos organismos se genera oxígeno. Por lo tanto, la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis oxigénica son dos procesos metabólicos incompatibles, que deben separarse en el tiempo o en el espacio (Fay, 1992). Algunas cianobacterias unicelulares fijadoras realizan la fotosíntesis durante el día y la fijación de nitrógeno durante la noche, optando así por una separación temporal. En el caso de las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos, la separación es espacial, de modo que en condiciones aeróbicas la fotosíntesis oxigénica ocurre sólo en las células vegetativas y la fijación de nitrógeno en el heterocisto.

Los heterocistos presentan una serie de modificaciones encaminadas hacia la protección de la nitrogenasa frente al oxígeno y a aumentar la eficacia del proceso de fijación (Wolk *et al.*, 1994). Estas modificaciones son:

1) presencia de una envuelta constituida por una capa externa de polisacáridos y otra interna de glicolípidos que limita la entrada de gases a la célula,

2) carencia de actividad del fotosistema II, que es el responsable de la generación de oxígeno por fotólisis del agua, aunque se mantiene la actividad del fotosistema I, que genera ATP y poder reductor que pueden ser utilizados en la fijación del nitrógeno,

3) alta actividad de las enzimas del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, que permite un elevada tasa respiratoria, y

4) carencia de actividad ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, por lo que no se puede fijar CO₂ mediante el ciclo de Calvin, lo que permite que el poder reductor y la energía se destinen a la fijación de dinitrógeno y no de carbono.

El hecho de que la fotosíntesis y la fijación de dinitrógeno ocurran en células diferentes exige que haya una serie de relaciones de intercambio de metabolitos entre las células vegetativas y los heterocistos, ya que las células vegetativas deben proporcionar compuestos de carbono a los heterocistos que sirvan como sustratos respiratorios y

como esqueletos carbonados para la incorporación del nitrógeno fijado (Wolk, 1968; Jüttner, 1983) y éstos a su vez deben suministrar el nitrógeno fijado a las células vegetativas (Wolk *et al.*, 1974, 1976). La identidad de los compuestos transferidos, así como el mecanismo mediante el que se produce la transferencia, son aspectos desconocidos, aunque se han hecho algunas sugerencias.

A partir de los resultados de experimentos de marcaje con $^{14}\text{CO}_2$ (Jüttner, 1983), se ha propuesto que la Ala, el Glu y algunos azúcares podrían transferirse desde las células vegetativas hasta los heterocistos. Por otra parte, experimentos de marcaje con $^{13}\text{N}_2$ han permitido concluir que el nitrógeno fijado en los heterocistos debe transferirse a las células vegetativas en forma de aminoácidos (Wolk *et al.*, 1974), siendo la Gln el candidato principal, aunque también se han propuesto otros, como el Asp y la Arg, en base a la abundancia de cianoficina que existe en los heterocistos. La cianoficina es un polímero de reserva de nitrógeno exclusivo de las cianobacterias que está compuesto por arginina y aspartato (Simon, 1971). Aunque los gránulos de cianoficina existen tanto en las células vegetativas como en los heterocistos, en estos últimos son particularmente patentes, observándose al microscopio óptico como corpúsculos refringentes localizados cerca de las zonas de contacto con las células vegetativas.

En cuanto al mecanismo de transferencia intercelular, se ha sugerido que podría ocurrir por difusión a través de unas estructuras observadas al microscopio electrónico denominadas microplasmodesmos que se encuentran en las zonas de contacto entre las células del filamento (Giddings y Staehelin, 1981). Sin embargo, no existe ninguna prueba directa que confirme tal sugerencia.

La distribución de los heterocistos en el filamento no es aleatoria, sino que obedece a un patrón que varía de unas estirpes a otras. En las estirpes más estudiadas, los heterocistos se encuentran localizados a intervalos semirregulares a lo largo del filamento. Se desconoce el mecanismo molecular mediante el que se establece dicho patrón de distribución, pero se han propuesto diversos modelos teóricos (Wolk, 1991). Algunos de éstos implican el funcionamiento de sistemas de transporte de aminoácidos para establecer un gradiente morfogénico a lo largo del filamento, que determinaría qué célula se convierte en heterocisto y cuál no.

En los últimos años se han identificado algunos genes implicados en la diferenciación del heterocisto en la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 (revisado por Wolk, 1996). La mutación del gen *patA* afecta al patrón de desarrollo, impidiendo la diferenciación de heterocistos intercalares, pero no terminales (Liang *et al.*, 1992). El producto del gen *patA* muestra homología con el elemento regulador de los denominados sistemas reguladores de dos componentes. La mutación de otros genes, como *devA* y *hepA*, impide que se desarrollen heterocistos maduros. El producto del gen *devA* es homólogo al componente conservado de los sistemas de transporte tipo ABC (véase



apartado 1.4.2), aunque no se ha establecido la naturaleza del sustrato de este sistema (Maldener *et al.*, 1994). El producto del gen *hepA* también es un componente conservado de un sistema de transporte tipo ABC y se requiere para la síntesis o estabilización de la capa de polisacáridos de la envuelta del heterocisto (Holland y Wolk, 1990). La mutación de los genes *hetR*, *hetN*, *hetP* o *hetC* anula o retrasa notablemente el desarrollo de los heterocistos. Los genes *hetP* (Fernández-Piñas *et al.*, 1994) y *hetC* (Khudyakov y Wolk, 1994) están próximos en el genomio y su función podría estar relacionada. El producto del gen *hetC* es homólogo a proteínas de sistemas de transporte tipo ABC implicadas en la exportación de otras proteínas, mientras que el producto del gen *hetP* no muestra homología con ninguna proteína conocida. El producto del gen *hetN* (Black y Wolk, 1994) muestra homología con oxidorreductasas dependientes de NAD(P)H implicadas en la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios, lo que sugiere que algún compuesto de este tipo podría intervenir en la regulación del proceso de desarrollo de los heterocistos. Dos genes adyacentes a *hetN*, *hetM* y *hetI*, también están implicados en la biosíntesis de este tipo de compuestos (Wolk, 1996). Finalmente, el producto del gen *hetR* (Buikema y Haselkorn, 1991a) tampoco presenta homología con ninguna proteína conocida, pero se ha demostrado que se trata de un regulador positivo de la diferenciación que se activa tempranamente controlando la expresión de otros genes. La activación de la expresión de *hetR* exige la acción de la proteína NtcA (Frias *et al.*, 1994). La función del gen *hetR*, por otra parte, no parece ser específica para el desarrollo de los heterocistos, ya que también se requiere para la diferenciación de acinetos en *Nostoc ellipsosporum* (Leganés *et al.*, 1994).

1.3. HERRAMIENTAS DE GENÉTICA MOLECULAR DISPONIBLES PARA EL ESTUDIO DE LAS CIANOBACTERIAS

En los últimos 10-15 años se han desarrollado varios procedimientos que permiten la transferencia de DNA a diversas estirpes de cianobacterias mediante transformación, conjugación o electroporación (revisado por Thiel, 1994). Existen estirpes que son competentes de forma natural, como las unicelulares *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803, que al ser transformadas con un fragmento de DNA homólogo experimentan preferentemente una doble recombinación (o conversión génica) del mismo. En el caso de estirpes filamentosas como *Anabaena* sp., es posible la transferencia de DNA mediante conjugación desde una estirpe de *Escherichia coli* portadora, en un plásmido movilizable, del fragmento de DNA a transferir (Wolk *et al.*, 1984; Flores y Wolk, 1985). En este caso, es más frecuente la recombinación simple que la doble, por lo que no ocurre una sustitución del fragmento, sino una integración del plásmido transferido en el genomio de la célula receptora. Sin embargo, se han desarrollado vectores portadores del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* que facilitan la selección

de dobles recombinantes (Cai y Wolk, 1990). El gen *sacB* determina una sacarasa que en presencia de sacarosa provoca la muerte de la célula, lo que permite la selección de clones que, habiendo incorporado un inserto marcado genéticamente, no hayan incorporado el vector. También se han diseñado vectores replicativos, que se mantienen de forma autónoma en la célula receptora y sus descendientes gracias a que portan el origen de replicación del plásmido cianobacteriano pDU1 (Wolk *et al.*, 1984). Recientemente se ha empleado también la electroporación para introducir DNA en algunas estirpes de los géneros *Anabaena* (Thiel y Poo, 1989), *Plectonema* (Fujita *et al.*, 1992) y *Calothrix* (Chiang *et al.*, 1992).

Entre los métodos que se han empleado para la generación de mutantes de cianobacterias se incluyen la mutagénesis química y mediante luz ultravioleta, la inactivación génica dirigida mediante la inserción de casetes de resistencia a antibióticos y la utilización de transposones como Tn901 o derivados de Tn5 (Thiel, 1994). Debido a que las cianobacterias son organismos poliploides, que poseen hasta 10-15 copias de su genomio haploide por célula (Herdman *et al.*, 1979; Labarre *et al.*, 1989), un importante aspecto tras la generación de las mutaciones es la segregación de las mismas, lo cual requiere un número variable de rondas de replicación. En el caso de las estirpes filamentosas, la segregación se facilita mediante la fragmentación de los filamentos mediante sonicación, con objeto de reducir el número de células por filamento.

También se han desarrollado sistemas de genes testigo, como *luxAB*, *lacZ*, *cat* o GUS para estudiar la expresión de genes regulados por diversas condiciones ambientales (Thiel, 1994). Algunos de estos sistemas, combinados con técnicas de microscopía, han permitido detectar la expresión de algunos genes incluso en células individuales (Elhai y Wolk, 1990; Thiel *et al.*, 1995).

Finalmente, hay que destacar que la disponibilidad de la secuencia del genomio completo de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) está convirtiéndose en una poderosa herramienta no sólo para el estudio de la biología de esta estirpe, sino de otras cianobacterias, al facilitar la clonación e inactivación de los genes con objeto de estudiar sus funciones.

1.4. ESTRUCTURA Y FISIOLÓGÍA DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA

Como norma general, la utilización de los nutrientes disponibles en el medio (azúcares, aminoácidos, iones...) requiere la existencia de sistemas de transporte en la membrana plasmática que permitan su acumulación intracelular. En bacterias Gram negativas, como es el caso de las cianobacterias, el sustrato debe superar en primer lugar la barrera que supone la membrana externa, y una vez en el espacio periplásmico, atravesar la membrana plasmática.

La membrana externa es altamente impermeable a compuestos tóxicos como antibióticos, toxinas y enzimas líticas (proteasas, lipasas, peptidasas...), siendo una de sus principales misiones la protección de la célula frente a este tipo de compuestos. Esta membrana presenta una estructura completamente asimétrica, al estar constituida por una monocapa externa de lipopolisacáridos y una monocapa interna de fosfolípidos. Esta asimetría, junto con las características bioquímicas de los lipopolisacáridos, explican las propiedades de impermeabilidad de esta envuelta (Nikaido, 1993).

Sin embargo, en la membrana externa existen proteínas, denominadas porinas, que forman canales hidrofílicos que permiten la difusión, generalmente inespecífica, de moléculas pequeñas. Las porinas son proteínas triméricas, aunque también se han descrito algunas monoméricas, en las que cada subunidad presenta una estructura de barril- β , con 16 hojas plegadas β antiparalelas que atraviesan la membrana formando un canal (Nikaido, 1993). En algunas bacterias, como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se han descrito porinas específicas que presentan la misma estructura comentada pero poseen un sitio de unión específico para el sustrato. Ejemplos de este tipo de porinas son la proteína D1 para la glucosa (Hancock y Carey, 1980) y la proteína D2 para aminoácidos básicos de *P. aeruginosa* (Trias y Nikaido, 1990). En bacterias que, como *P. aeruginosa*, carecen prácticamente de porinas inespecíficas, la importancia de las porinas específicas en los procesos de transporte podría ser considerable.

En la membrana plasmática se encuentran los sistemas de transporte específicos para los distintos sustratos. Tradicionalmente los sistemas de transporte se han clasificado desde el punto de vista de la energetización del proceso, distinguiéndose entre transporte pasivo, que ocurre a favor del gradiente electroquímico del sustrato hasta alcanzarse el equilibrio, y transporte activo. El transporte activo permite la concentración del compuesto en contra de su gradiente electroquímico, lo cual requiere un gasto energético que puede efectuarse como hidrólisis de ATP (transporte primario) o como acoplamiento del transporte con un gradiente iónico (transporte secundario).

En cuanto al transporte pasivo en bacterias, sólo se han descrito algunas permeasas que median la difusión facilitada del sustrato, siendo los casos más representativos la permeasa GlpF para el glicerol de *E. coli* (Heller *et al.*, 1980) y el transportador de la glucosa Glf de *Zymomonas mobilis* (Barnell *et al.*, 1992).

Los denominados sistemas de translocación de grupo acoplan el transporte de un soluto a la modificación química del mismo. El único grupo de transportadores de este tipo que se ha encontrado en bacterias es el denominado sistema PTS (de "phosphotransferase system") para el transporte de carbohidratos (Postma *et al.*, 1996). En este caso la molécula de azúcar se transporta al tiempo que sufre una fosforilación, utilizándose fosfoenolpiruvato como donador del grupo fosfato.

Al margen de estas dos categorías, que podrían considerarse como minoritarias, en bacterias pueden definirse dos grandes grupos de sistemas de transporte, que se analizarán más detalladamente: los sistemas monocomponente de transporte secundario y los sistemas "tipo ABC" de transporte primario.

1.4.1. Sistemas monocomponente de transporte secundario

Los transportadores secundarios son sistemas de transporte monocomponente, constituidos por una proteína cuya característica fundamental estriba en que presenta 10-12 hélices α hidrofóbicas que constituyen dominios de expansión de la membrana. Normalmente estos sistemas acoplan el transporte del sustrato con el de iones H^+ o Na^+ , que se mueven a favor de un gradiente dirigido en el mismo sentido (simporte) o en sentido contrario (antiporte) que el sustrato. El análisis de la secuencia de varios cientos de permeasas de este tipo ha permitido establecer dos grupos. El grupo mayoritario, que engloba al 80% aproximadamente de las proteínas estudiadas, está integrado por proteínas monoméricas con 12 hélices α , e incluye a las proteínas de bacterias, hongos y células animales analizadas (Henderson, 1993). En el grupo minoritario, constituido por proteínas localizadas en orgánulos eucarióticos (mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas), los transportadores son dímeros en los que cada monómero presenta 5-7 hélices α (Kuan y Saier, 1993).

Dentro del grupo mayoritario, que incluye a los transportadores procarióticos, se ha definido recientemente un grupo de proteínas homólogas denominado MFS ("major facilitator superfamily"), que a su vez presenta cinco agrupaciones o subfamilias (Marger y Saier, 1993):

- Grupo 1: proteínas de transporte de azúcares mediante simporte con H^+ (en bacterias) o difusión facilitada (en animales).
- Grupo 2: proteínas de *E. coli* para el simporte de oligosacáridos con H^+ .
- Grupo 3: proteínas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* para el antiporte de ésteres de fosfato (hexosa-P, glicerol-P y fosfoglicerato) con fosfato.
- Grupo 4: proteínas de resistencia a drogas que median un antiporte de éstas con H^+ en bacterias y levaduras.
- Grupo 5: proteínas de *E. coli* y otras bacterias relacionadas para el transporte de citrato y α -cetoglutarato (intermediarios del ciclo de Krebs) mediante un simporte con H^+ .

Aunque inicialmente se propuso que las proteínas que acoplan el simporte de solutos con Na^+ no pertenecían a la superfamilia MFS (Marger y Saier, 1993), en un estudio posterior más completo se encontró una sexta agrupación dentro de la superfamilia que incluía a seis permeasas de este tipo (Reizer *et al.*, 1994). Cabe destacar

el hecho de que en el grupo 1 se incluyan transportadores que median difusión de glucosa, existiendo por lo tanto una relación filogenética entre este tipo de permeasas pasivas y los transportadores de tipo secundario (Nikaido y Saier, 1992).

Como puede observarse, la división de la familia MFS en grupos no permite establecer una distinción entre transportadores procarióticos y eucarióticos, sino más bien una agrupación en cuanto al sustrato o al mecanismo de acción del sistema, por lo que se ha propuesto que los eventos de duplicación que originaron los distintos grupos de transportadores ocurrieron antes de que se produjera la división entre organismos procarióticos y eucarióticos (Marger y Saier, 1993). Por otra parte, la similitud que existe entre el dominio N-terminal y el dominio C-terminal de estas proteínas, conteniendo cada uno de ellos seis hélices α , sugiere que podrían haberse originado mediante duplicación y fusión de un gen ancestral que determinaría un polipéptido con seis hélices α (Marger y Saier, 1993).

Sin duda, la permeasa monocomponente mejor caracterizada es la de la lactosa (LacY) de *E. coli*, que cataliza un simporte de lactosa y H^+ y sirve como paradigma de este tipo de sistemas de transporte (Maloney y Wilson, 1996).

1.4.2. Sistemas de transporte "tipo ABC" o multicomponente

Los sistemas de transporte multicomponente, también denominados sistemas dependientes de proteína periplásmica de unión de sustrato, son transportadores de tipo primario, energizados mediante la hidrólisis de ATP (Ames *et al.*, 1990; Higgins *et al.*, 1990). Estos sistemas muestran alta afinidad por el sustrato, presentando normalmente valores de K_S mucho menores que los sistemas monocomponente, y están constituidos por tres tipos de proteínas:

1) proteínas solubles de localización periplásmica, que tienen elevada afinidad por el sustrato,

2) proteínas de membrana, que poseen 6 hélices α hidrofóbicas y se presentan como homo o heterodímeros, dependiendo de la existencia de uno o dos genes distintos para las mismas, respectivamente, y

3) proteínas hidrofílicas, aunque con capacidad para interactuar con los componentes de membrana y asociarse a la misma en su lado citoplásmico, cuya característica principal es la presencia de un dominio de unión a ATP; pueden presentarse como homo o heterodímeros, según sean determinadas, como en el caso anterior, por uno o dos genes, aunque también se han descrito pseudodímeros, cuando se trata de un único polipéptido que presenta dos mitades homólogas entre sí. En este caso, representado por los sistemas de transporte de arabinosa (Scripture *et al.*, 1987), galactosa (Hogg *et al.*, 1991) y ribosa (Bell *et al.*, 1986) de *E. coli*, el gen procede probablemente de la duplicación y fusión de un gen ancestral.

La proteína de unión a ATP está enormemente conservada entre distintos sistemas de transporte, pertenecientes incluso a organismos diferentes, no sólo procarióticos sino también eucarióticos, por lo que este elemento se conoce también como "componente conservado" (Ames *et al.*, 1990). Así, existe una región de unos 200 aminoácidos, que contiene dos sitios conservados, el sitio A y el sitio B, que constituyen el dominio de unión al ATP. Esta región de 200 aminoácidos se denomina región ABC (de "ATP binding cassette") y por ello estas permeasas se conocen con el nombre general de transportadores "tipo ABC" (Higgins *et al.*, 1990).

Los transportadores tipo ABC engloban a los sistemas de transporte procarióticos dependientes de proteína periplásmica de unión de sustrato, a un gran número de sistemas procarióticos exportadores de diferentes compuestos (en los que no existe proteína periplásmica) y a una serie de proteínas de transporte eucarióticas de gran importancia, como la proteína de resistencia a múltiples drogas o glicoproteína-P, responsable de la resistencia de muchos tumores al tratamiento con agentes citotóxicos al provocar la extrusión de los mismos, o la proteína cuya mutación provoca la fibrosis quística (Fath y Kolter, 1993).

Aunque parece existir un mayor grado de similitud entre los componentes conservados de sistemas exportadores que entre los de sistemas importadores, a partir de su secuencia de aminoácidos no se puede predecir si un sistema particular pertenece a una categoría u otra ni la especificidad de sustrato del mismo (Higgins *et al.*, 1990).

Proteínas periplásmicas de unión de sustrato

La proteína de unión de sustrato localizada en el espacio periplásmico es muy abundante, hasta 50-100 veces más que los otros componentes del sistema (di Guan *et al.*, 1988). En algunas ocasiones existe más de una proteína periplásmica capaz de interactuar con un mismo complejo de membrana. Tal es el caso, por ejemplo, del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada de *E. coli*, en el que existen dos proteínas periplásmicas: LivK, que une específicamente Leu, y LivJ, que une Leu, Ile, Val y Thr (Adams *et al.*, 1990).

Algunas proteínas periplásmicas pueden actuar como receptores quimiotácticos, mostrando capacidad para interactuar no sólo con el sistema de transporte sino también con la proteína de membrana que constituye el sistema quimiorreceptor, disparando la respuesta celular a un gradiente químico determinado (Tam y Saier, 1993).

Se ha determinado la estructura tridimensional de doce proteínas periplásmicas (Quioco y Ledvina, 1996), concluyéndose que a pesar de la falta de un elevado grado de homología entre sus secuencias, la estructura está altamente conservada y consiste en dos dominios globulares, el lóbulo N y el lóbulo C, conectados por una charnela flexible. La unión del sustrato a la proteína periplásmica provoca un cambio conformacional de

la misma que ha de facilitar su interacción con los componentes de membrana del sistema.

Aunque los sistemas multicomponente se describieron inicialmente en bacterias Gram negativas, donde no era sorprendente la existencia de una proteína periplásmica, estos sistemas también se encuentran en bacterias Gram positivas, en las que no existe espacio periplásmico. En este caso, la proteína de unión de sustrato es una lipoproteína que está anclada a la membrana plasmática de la célula por su extremo amino (Gilson *et al.*, 1988).

Proteínas integrales de membrana

Las proteínas integrales de membrana, como ya se ha indicado, presentan varias hélices α hidrofóbicas de expansión de membrana, separadas por segmentos hidrofílicos. Típicamente poseen seis hélices α , de modo que existen cinco lazos hidrofílicos, dos de ellos en el lado citoplásmico y tres en el lado periplásmico, además de los extremos C- y N- terminales de la proteína, que se localizan en el lado citoplásmico (Higgins, 1992). Sin embargo, también se han encontrado proteínas con ocho, siete o cinco hélices α . Aunque no existe gran similitud entre las secuencias de estos componentes, mediante la comparación de 61 proteínas integrales de membrana pertenecientes a 35 sistemas de transporte distintos, se ha definido un motivo conservado situado a unos 90 aminoácidos del extremo carboxilo, denominado lazo EAA (Saurin *et al.*, 1994). Se trata de un lazo hidrofílico, cuya secuencia consenso es EAA---G-----I-LP, que podría constituir el sitio de interacción entre la proteína de membrana y el componente conservado (Mourez *et al.*, 1997).

No parece haber relación filogenética entre estas proteínas de membrana y las permeasas monocomponente que constituyen los sistemas de transporte secundarios, de manera que la estructura de 12 hélices que presentan ambos tipos de sistemas sería el resultado de una convergencia evolutiva hacia una estructura necesaria para provocar la expansión de la bicapa lipídica de la membrana (Henderson, 1993).

Proteína conservada de unión de ATP

El componente conservado constituye el elemento energizador del sistema de transporte. Aunque inicialmente hubo cierta controversia con respecto a si estos sistemas utilizaban o no directamente la energía resultante de la hidrólisis de ATP para el transporte, tras la reconstitución del sistema de transporte de la histidina de *S. typhimurium* en proteoliposomas se demostró que se producía hidrólisis de ATP concomitantemente con el transporte del sustrato (Bishop *et al.*, 1989). Posteriormente se ha empleado este acercamiento experimental con otros sistemas de transporte multicomponente, obteniéndose el mismo resultado (Hoshino *et al.*, 1992). No existen datos fiables, sin embargo, respecto a la estequiometría de hidrólisis de ATP por molécula de sustrato transportado. Trabajando con distintos sistemas reconstituidos *in vitro* se

han obtenido valores que oscilan entre 1 y 17 moléculas de ATP hidrolizadas por molécula de sustrato transportada (Boos y Lucht, 1996). No obstante, los valores obtenidos mediante procedimientos de medida *in vivo* han resultado más homogéneos, obteniéndose un número próximo a 2 moléculas de ATP por molécula de sustrato (Mimmack *et al.*, 1989), que estaría en consonancia con el hecho de que existan dos subunidades de ATPasa por complejo de membrana.

Aunque no se ha descrito la estructura tridimensional de ningún componente conservado, se ha propuesto un modelo estructural basado en la secuencia de 17 proteínas, superponiendo sus estructuras secundarias teóricas con la de la enzima adenilato quinasa, proteína que también posee un motivo de unión de ATP, cuya estructura terciaria se conoce (Mimura *et al.*, 1991).

Organización de los genes que determinan los sistemas de transporte tipo ABC

Los genes que determinan los distintos elementos de los sistemas multicomponente se presentan casi invariablemente formando operones, siendo pocos los ejemplos en los que un componente esencial del sistema está en otra unidad transcripcional (Ames, 1986). Esta organización aseguraría una estequiometría adecuada entre los componentes, ya que se necesita la misma cantidad de componente de membrana que de componente conservado. Sin embargo, como ya se ha comentado, la proteína periplásmica es mucho más abundante, y generalmente el gen que la determina se encuentra al principio del operón. Esta localización podría permitir una mayor expresión relativa de esta proteína, ya que la procesividad limitada de la RNA polimerasa, junto con la degradación preferente del RNAm en sentido 3'-5', pueden resultar en un gradiente de expresión, favoreciendo la de los genes situados en el extremo 5' del operón (Boos y Lucht, 1996).

Cuando existen dos proteínas periplásmicas para un mismo sistema de transporte, normalmente los genes no se encuentran en el operón principal, sino que son independientes del mismo, localizándose a veces en puntos alejados del genomio, aunque en este caso los dos genes sí suelen estar cercanos entre sí (Boos y Lucht, 1996).

Modelo del mecanismo de transporte

Teniendo en cuenta una serie de datos experimentales, se ha propuesto un modelo de funcionamiento de los sistemas de transporte multicomponente (Ames *et al.*, 1990). Una vez que el sustrato entra en el espacio periplásmico, se une, de manera reversible, a las proteínas de unión específicas allí presentes. La concentración de sustrato libre es la misma dentro y fuera del periplasma, pero la concentración total (sustrato libre y sustrato unido a proteína) es mayor dentro, siendo dependiente de la concentración de la proteína periplásmica y de su afinidad por el sustrato. La proteína periplásmica parece experimentar un cambio de conformación provocado por la unión del sustrato, aumentando su afinidad por el complejo de membrana con el que interacciona.

Esta interacción induciría a su vez un cambio de la conformación de los componentes de membrana, que daría lugar a la descarga del sustrato en el citoplasma de manera concomitante con la hidrólisis de ATP. Finalmente, la proteína periplásmica se disociaría del complejo de membrana.

1.4.3. Transporte de aminoácidos, amonio y urea en cianobacterias

Transporte de aminoácidos

Los datos que existían sobre la capacidad de transporte de aminoácidos de las cianobacterias en el momento de comenzar este trabajo eran escasos y fragmentarios. En las estirpes mejor estudiadas, *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis* (PCC 7937) y *Synechocystis* sp. PCC 6803, se habían caracterizado algunas actividades de transporte utilizando aminoácidos marcados radiactivamente y se habían obtenido mutantes espontáneos aislados como resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos, pero no se había identificado ningún gen ni se conocía la estructura (mono o multicomponente) de los posibles sistemas de transporte.

En la estirpe *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha descrito la existencia de dos sistemas de transporte para aminoácidos básicos (Herrero y Flores, 1990), uno activo de alta afinidad (K_S para la Arg 1,7 μM y para la Lys 1,9 μM) y otro pasivo de baja afinidad (K_S para la Arg 0,75 mM y para la Lys 0,11 mM), y se han aislado mutantes resistentes a la canavanina y a la hidroxilisina (análogos tóxicos de los aminoácidos Arg y Lys, respectivamente) afectados en el transporte de aminoácidos básicos de alta afinidad. Tanto el sistema de alta como el de baja afinidad contribuye al crecimiento de la estirpe PCC 7120 utilizando la Arg como fuente de nitrógeno (aunque la Arg no reprime las actividades nitrogenasa y nitrato reductasa de las células) (Herrero y Flores, 1990). También se ha demostrado que esta estirpe es capaz de transportar Gln, Glu (Flores y Muro-Pastor, 1988) y Phe (Xu y McAuley, 1990), y se han determinado los parámetros cinéticos correspondientes, resultando unos valores de K_S de 33 μM (Gln), 0,5 mM (Glu) y 6,7 μM (Phe).

En *Anabaena variabilis* (PCC 7937) se han encontrado sistemas de alta y baja afinidad para el transporte de Gln (K_S 13,8 μM y 1,1 mM) y Glu (K_S 100 μM y 1,4 mM) (Chapman y Meeks, 1983), y se ha aislado un mutante resistente a MSX (análogo tóxico de la Met y el Glu) afectado simultáneamente en el transporte de alta afinidad de Gln y Glu, lo que sugiere la existencia de un componente común para el transporte de ambos aminoácidos. Se ha demostrado también la capacidad de esta cianobacteria de transportar Leu (K_S 10,8 μM) en un proceso dependiente de energía (Thiel, 1988).

En *Synechocystis* sp. PCC 6803 se han determinado las actividades de transporte de aminoácidos básicos, neutros y ácidos, y se han obtenido mutantes resistentes a la canavanina, afectados en el transporte de Arg, Lys e His (y parcialmente en el de Gln), y

mutantes resistentes a la azaleucina (análogo tóxico de la Leu), afectados en el transporte de todos los aminoácidos neutros excepto la Gln (Labarre *et al.*, 1987). El análisis genético del sistema de transporte de aminoácidos básicos ha revelado la naturaleza compleja del mismo, existiendo elementos comunes para el transporte de Arg, Lys y Gln y elementos específicos, por lo que se ha propuesto que este sistema podría ser de tipo multicomponente (Flores y Muro-Pastor, 1990).

Transporte de amonio

El transporte de amonio en cianobacterias se ha estudiado en *Anabaena variabilis* (Rai *et al.*, 1984) y *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Boussiba *et al.*, 1984), utilizándose como sustrato metilamonio marcado radiactivamente. El metilamonio es un análogo estructural del amonio que se emplea de modo generalizado en este tipo de estudios debido a la dificultad de trabajar con amonio marcado en el átomo de N. En dichas cianobacterias se ha demostrado que el transporte de metilamonio es de tipo concentrativo, y que su acumulación en el interior celular se afecta por una serie de inhibidores metabólicos, incluyendo algunos ionóforos. Los datos disponibles sugieren que el transporte de metilamonio esté mediado por una permeasa que mediaría un transporte dependiente del potencial de membrana, con un valor de K_S de 7 μM (Boussiba *et al.*, 1984), aunque la K_S para el amonio, que sería el sustrato natural, habría de ser menor.

El sistema de transporte de amonio/metilamonio se reprime en células cultivadas con amonio (Boussiba y Gibson, 1987; Vega-Palas *et al.*, 1990). A altas concentraciones de amonio, la difusión en forma de amoniaco podría representar un mecanismo de entrada al interior celular suficiente para cubrir las necesidades de nitrógeno del organismo. No obstante, en los hábitats naturales, en los que el amonio se encuentra a bajas concentraciones, el sistema de transporte debe, lógicamente, ser necesario para mediar la entrada de este nutriente en la célula.

Transporte de urea

El transporte de urea en cianobacterias prácticamente no ha sido estudiado, y únicamente se ha descrito que la urea puede transportarse de modo activo y que el sistema de transporte podría estar sujeto a represión por amonio (Healey, 1977; Valladares *et al.*, 1995).

Los objetivos de esta tesis han sido:

- 1) caracterizar los sistemas de transporte de aminoácidos de las cianobacterias, tomando como modelo la estirpe filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120 y haciendo luego extensivo este estudio a otras estirpes de cianobacterias,
- 2) identificar algunos de los genes que determinan proteínas de transporte de aminoácidos en *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120,
- 3) establecer el papel fisiológico que desempeñan los sistemas de transporte de aminoácidos en las cianobacterias, con especial interés en la posible implicación de éstos en el proceso de diferenciación del heterocisto y
- 4) identificar y caracterizar los genes que determinan los sistemas de transporte de otros compuestos nitrogenados como la urea y el amonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Parte de los resultados que se presentan en este trabajo han sido ya publicados:

Montesinos ML, Herrero A y Flores E (1995) Amino acid transport systems required for diazotrophic growth in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **177**:3150-3157.

Montesinos ML, Herrero A y Flores E (1997) Amino acid transport in taxonomically diverse cyanobacteria and identification of two genes encoding elements of a neutral amino acid permease putatively involved in recapture of leaked hydrophobic amino acids. *J. Bacteriol.* **179**:853-862.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1.1. Cianobacterias

2.1.1.1. Estirpes empleadas

Las estirpes silvestres de cianobacterias empleadas en este trabajo, así como la Sección a la que pertenecen según la clasificación taxonómica propuesta por Rippka *et al.* (1979), se recogen en la Tabla 1. En la Fig. 1 se muestran fotografías de algunas de dichas estirpes tomadas al microscopio óptico.

La estirpe EF116, no incluida en la tabla, también se utilizó como control en algunos experimentos. Esta estirpe es un mutante derivado de *Anabaena* sp. PCC 7120 incapaz de fijar dinitrógeno en condiciones aeróbicas debido a un defecto en la envuelta del heterocisto (Wolk *et al.*, 1988).

Tabla 1. Estirpes de cianobacterias utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Sección
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (ATCC 27893)	IV
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7937 (ATCC 29413)	IV
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7601	IV
<i>Fischerella muscicola</i> UTEX 1829	V
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7413 (ATCC 29106)	IV
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7107 (ATCC 29150)	IV
<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903 (ATCC 27190)	III
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	I
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (ATCC 27184)	I

2.1.1.2. Condiciones de cultivo

Las cianobacterias se cultivaban en medio BG11₀ (Rippka *et al.*, 1979), que consta de los siguientes componentes: Na₂CO₃ 0,2 mM, MgSO₄ 0,3 mM, CaCl₂ 0,24 mM, K₂HPO₄ 0,2 mM, ácido cítrico 28,5 μM, citrato férrico amónico (17% Fe) 6 mg·l⁻¹, Na₂-EDTA 2,4 μM, H₃BO₃ 46 μM, MnCl₂ 9,1 μM, Na₂MoO₄ 1,6 μM, ZnSO₄ 0,8 μM, CuSO₄ 0,3 μM y CoCl₂ 0,2 μM. Los medios de cultivo se preparaban a partir de un concentrado (100x) que contenía todos los componentes excepto el K₂HPO₄, que se añadía antes de autoclavar el medio. Como fuente de nitrógeno se utilizaba NaNO₃ a concentración final 17,6 mM, denominándose entonces el medio BG11, o bien NH₄Cl a concentración final 2,5 ó 5 mM. En este último caso, el medio se tamponaba mediante la adición de TES-NaOH (pH 7,5), a doble concentración que la utilizada de NH₄Cl. Las disoluciones de NH₄Cl y TES se esterilizaban mediante filtración y se añadían al medio después de que

éste hubiera sido autoclavado. Cuando no se añadía ninguna fuente de nitrógeno combinado el medio se denominaba BG11₀.

En el caso de los cultivos líquidos, las cianobacterias se cultivaban en matraces Erlenmeyers de 100 ó 250 ml de capacidad, que contenían 50 ml del medio pertinente, incubados a 30°C con luz blanca ($75 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y agitación continua (80-90 rpm) en agitadores orbitales. Para la preparación de medios sólidos se utilizaba agar Difco al 1% (p/v) autoclavado por separado.

En el caso de los cultivos líquidos a emplear para el aislamiento de RNA, se utilizaban tubos de 70 ml de capacidad, conteniendo 40 ml de medio BG11C (de composición idéntica al medio BG11 pero suplementado con $0,84 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de NaHCO_3) o BG11₀C suplementado con 15 mM de NH_4Cl y 30 mM de TES-NaOH (pH 7,5), que se burbujeaban con una mezcla (1,5% v/v) de CO_2 y aire estéril.

Para cultivar los mutantes resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos, el medio se suplementaba con el análogo correspondiente a la concentración adecuada en cada caso (véase más adelante, Tabla 9). Los análogos se esterilizaban mediante filtración.

Para cultivar los mutantes resistentes a antibióticos, el medio se suplementaba con el antibiótico apropiado esterilizado mediante filtración, utilizándose las siguientes concentraciones: kanamicina (Km) $50\text{-}300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; cloranfenicol (Cm) $10\text{-}80 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; estreptomycin (Sm) $2\text{-}5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; espectinomicina (Sp) $2\text{-}5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2.1.1.3. Curvas de crecimiento

Para determinar la tasa de crecimiento de las distintas estirpes silvestres y mutantes de transporte de aminoácidos en medio BG11 y BG11₀, las cianobacterias se cultivaban inicialmente en medio BG11, suplementado con el análogo o antibiótico pertinente en el caso de los mutantes. Las células de dichos cultivos se recogían como se indica en el apartado 2.1.3, se lavaban con medio BG11₀ y se resuspendían en un pequeño volumen del mismo medio, empleándose esta suspensión celular para inocular matraces con 50 ml de medio BG11 o BG11₀ (sin análogos ni antibióticos añadidos), a razón de $0,2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tras distintos tiempos de incubación en condiciones de cultivo se tomaban y congelaban muestras de 200 μl de estos cultivos. La cantidad de proteína de dichas muestras se determinaba como se indica en el apartado 2.9.1. Para descartar cultivos en los que se hubieran acumulado revertientes, se medía la actividad de transporte de determinados aminoácidos utilizados como controles.

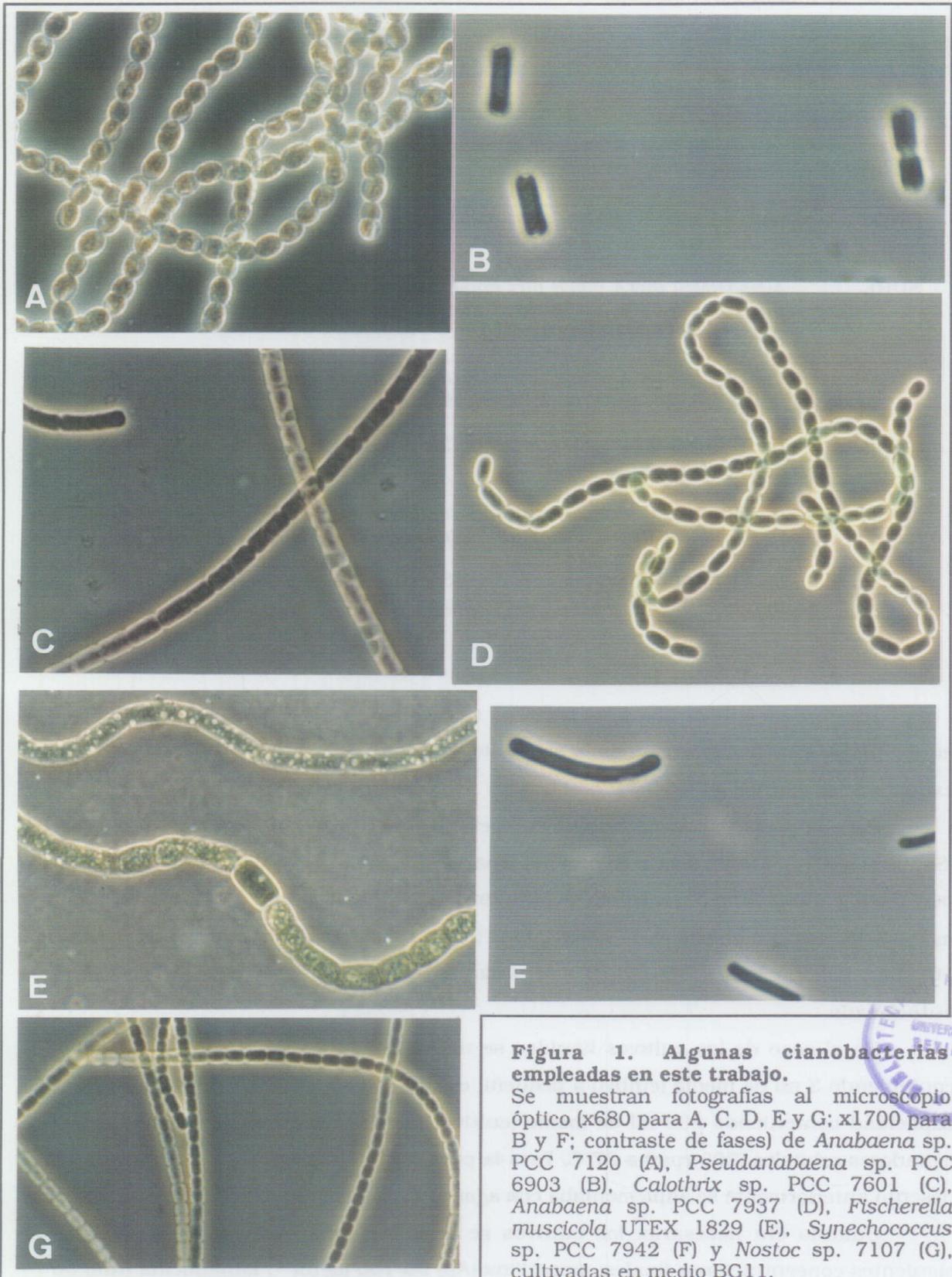


Figura 1. Algunas cianobacterias empleadas en este trabajo.

Se muestran fotografías al microscopio óptico (x680 para A, C, D, E y G; x1700 para B y F; contraste de fases) de *Anabaena* sp. PCC 7120 (A), *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 (B), *Calothrix* sp. PCC 7601 (C), *Anabaena* sp. PCC 7937 (D), *Fischerella muscicola* UTEX 1829 (E), *Synechococcus* sp. PCC 7942 (F) y *Nostoc* sp. 7107 (G), cultivadas en medio BG11.



2.1.2. *Escherichia coli*

2.1.2.1. Estirpes empleadas

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo y las características más relevantes de su genotipo se muestran en la Tabla 2.

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

Estirpe	Genotipo	Referencia o fuente
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lac</i> U169 (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hdsR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁻</i>) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
SURE	Δ (<i>hdsRMS</i>) <i>mcrA mcrB mrr endA1 supE44 thi-1</i> λ - <i>gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC uvrC</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> Δ M15 Tn10 (<i>tet^r</i>)]	Stratagene
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 mcrB_B leuB6 thi-1</i>	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969
GM48	<i>thr-1 leuB6 thi-1 lacY galk2 galT22 ara14 fhuA tsx dam3 dcm3 supE44</i>	Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985
ED8654	<i>lac-3 o lacY1 supE44 supF58 hsdR514</i> (<i>r_K⁻ m_K⁻</i>) <i>recA56 mcrA1 metB1 lacY galk2 galT22 trpR55</i>	Murray <i>et al.</i> , 1977
BL21 (DE3)	<i>ompT</i> (<i>lon</i>) <i>hdsS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>); DE3 es un profago λ portador del gen de la RNA polimerasa de T7	Studier <i>et al.</i> , 1990

2.1.2.2. Condiciones de cultivo

Para cultivar *E. coli* se utilizaba el medio rico Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es la siguiente: NaCl 10 g·l⁻¹, Bactotripton 10 g·l⁻¹ y extracto de levadura 5 g·l⁻¹.

Para la preparación de células competentes se utilizaban los medios Ψ o SOB (Sambrook *et al.*, 1989), según se indique (apartado 2.12.1). El medio Ψ está compuesto por: Bactotripton 20 g·l⁻¹, extracto de levadura 5 g·l⁻¹, MgSO₄ 4 g·l⁻¹ y KCl 10 mM. El medio SOB está compuesto por: Bactotripton 20 g·l⁻¹, extracto de levadura 5 g·l⁻¹, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM y MgCl₂ 10 mM, añadida esta última sal tras el proceso de autoclavado.

En el caso de los cultivos líquidos se utilizaban tubos de 10 ml de capacidad conteniendo 3 ml de medio (cultivo a pequeña escala) o matraces Erlenmeyers de 1 l de capacidad conteniendo 200 ml de medio (cultivo a gran escala), que se incubaban en agitadores orbitales (200 rpm) a 37°C. Para la preparación de medio sólido, el medio LB descrito anteriormente se suplementaba con agar al 1,5% (p/v).

Cuando era necesario, los cultivos se suplementaban con antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap) 50-100 μ g·ml⁻¹; kanamicina (Km) 50 μ g·ml⁻¹; cloranfenicol (Cm) 25 μ g·ml⁻¹; estreptomycin (Sm) 25 μ g·ml⁻¹; espectinomycin (Sp) 100 μ g·ml⁻¹.

2.1.3. Método de recogida y lavado de células

Los cultivos de cianobacterias se recogían mediante centrifugación a temperatura ambiente en una centrífuga Heraeus modelo "Megafuge 1.0", a 4000 rpm durante 5-10 minutos. Cuando por razones experimentales era necesario lavar las células, éstas se resuspendían en el medio o tampón adecuado y se centrifugaban, repitiéndose el proceso al menos tres veces, utilizando un volumen equivalente al del cultivo original en cada caso.

Los cultivos de *E. coli* a pequeña escala se recogían mediante centrifugación a 4°C en una centrífuga Eppendorf refrigerada, o a temperatura ambiente en una centrífuga Sorvall modelo "Microspin 24". En ambos casos se centrifugaba a 13000 rpm durante 2 minutos. Los cultivos de *E. coli* a gran escala se recogían a 4°C en una centrífuga Sorvall, utilizando rotores SS34 (8000 rpm, 5 min) o GSA (4000 rpm, 10 min).

2.2. AISLAMIENTO DE MUTANTES ESPONTÁNEOS DE CIANOBACTERIAS RESISTENTES A ANÁLOGOS TÓXICOS DE AMINOÁCIDOS

Los mutantes resistentes a compuestos tóxicos análogos de aminoácidos se aislaron en cajas Petri que contenían medio sólido BG11, suplementado con el análogo correspondiente a concentraciones inhibitorias del crecimiento de la estirpe silvestre en cuestión. Las cajas se inoculaban con una suspensión celular que contenía unos 10 µg de Chl, utilizando 6 ml de agar de cobertera (0,5% p/v) en medio BG11, y las colonias que aparecían después de 7-10 días de incubación en condiciones de cultivo se sembraban en medio selectivo.

Los análogos tóxicos empleados en este trabajo fueron: sulfato de L-canavanina (análogo de Arg), δ-hidroxilisina (análogo de Lys), 4-aza-DL-leucina (análogo de Leu), azaserina (análogo de Gln), L-metionina-D,L-sulfoximina (MSX) (análogo de Met y Glu) y DL-etionina (análogo de Met). La canavanina se neutralizaba con NaOH antes de ser filtrada.

2.3. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS

2.3.1. Determinación de la actividad de transporte de aminoácidos

Células cultivadas en medio líquido BG11, a menos que se indique otra cosa, suplementado con el análogo o antibiótico correspondiente en el caso de los mutantes, se recogían y lavaban con tampón Tricina-NaOH 25 mM (pH 8,1), como se indica en el apartado 2.1.3, y se resuspendían en el mismo tampón. Los ensayos se llevaban a cabo a 30°C, en tubos situados en un baño de paredes transparentes para permitir la iluminación de los mismos (luz blanca procedente de lámparas incandescentes, 100 W·m⁻²). El ensayo se iniciaba mezclando 1 ml de suspensión celular (conteniendo 3-15 µg Chl) con una disolución (0,1 ml) en tampón Tricina del aminoácido cuya actividad de

transporte se quería determinar. Los aminoácidos utilizados como sustrato fueron L-[U-¹⁴C]aminoácidos (4,5-70 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$), excepto en el caso de la metionina (L-[³⁵S]Met, 84-187 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$), a una concentración de 110 μM (10 μM en el ensayo). El volumen total de reacción era 1,1 ml. Tras un tiempo de incubación de 10 min (a menos que se indique otra cosa), se tomaba una muestra de 1 ml que se filtraba a través de un filtro Millipore HA de 0,45 μm de diámetro de poro y se lavaba con 5-10 ml de tampón Tricina. Los filtros se introducían en viales a los que se añadían 5 ml de líquido de centelleo y se determinaba la radiactividad en un contador de centelleo líquido marca Beckman modelo "LS6000IC". Como blanco se utilizaba la radiactividad retenida por una suspensión de células hervidas procesada de la misma manera.

2.3.2. Determinación de la linealidad de los ensayos

Para estudiar la linealidad del transporte se realizaron ensayos utilizando células de la estirpe PCC 7120 cultivadas en medio BG11. Estos ensayos se iniciaban mediante la adición de 0,5 ml de una disolución 170 μM del aminoácido marcado (22-45 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) a 8 ml de una suspensión celular (9-15 $\mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$), resultando de este modo una concentración final en el ensayo de 10 μM . A distintos tiempos (1, 3, 6, 10, 15, 20 y 30 min) se tomaban muestras de 1 ml, las cuales se filtraban, lavaban y procesaban como se indica en el apartado anterior.

2.3.3. Determinación de los parámetros K_S y V_{max}

Los ensayos para determinar los valores de K_S y V_{max} del transporte de aminoácidos se realizaron utilizando las siguientes concentraciones de sustrato: 0,5-20 μM para la Gly, 15-800 μM para el Asp, 50-2000 μM para el Glu y 5-400 μM para el resto de aminoácidos, en el caso de las estirpes PCC 7120 y CS343; 0,5-400 μM para el Asp en el caso de las estirpes PCC 6903, CS446 y CS448; 0,05-400 μM para la Arg en el caso de la estirpe PCC 7413 y, finalmente, 0,25-400 μM para el Glu en el caso de las estirpes PCC 6803 y CSX28a. Los ensayos se iniciaban mediante la adición de 0,25 ml de suspensión celular (1,4-15,7 $\mu\text{g Chl}$) en tampón Tricina a una disolución de sustrato en el mismo tampón. El volumen total de reacción era de 1,05 ml y el tiempo de incubación de 1 min, tras el cuál se tomaba una muestra de 1 ml que se filtraba, lavaba y procesaba como en el caso anterior. La radiactividad empleada era 1,4-15,7 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ (¹⁴C), excepto para la Gly (36,6 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$, ¹⁴C), el Glu en el caso de la estirpe PCC 7120 (0,6 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$, ¹⁴C) y la Met (8,4 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$, ³⁵S).

Los valores de K_S y V_{max} se estimaban a partir de las representaciones de Lineweaver-Burk (en el caso de los ensayos con las estirpes PCC 7120 y CS343) o Eadie-Hofstee (en el caso de los ensayos con las estirpes PCC 6903, CS446, CS448, PCC 7413, PCC 6803 y CSX28a).

2.3.4. Determinación del efecto de la adición de aminoácidos no marcados radiactivamente sobre el transporte de aminoácidos marcados (ensayos de competencia)

Para determinar el efecto inhibitor de algunos aminoácidos sobre el transporte de Asn, Leu, Met o Thr en la estirpe PCC 7120, se midió el transporte de estos aminoácidos (marcados radiactivamente) a concentración 10 μM en presencia de 500 μM del aminoácido no marcado radiactivamente cuyo efecto inhibitor se quería probar. Los ensayos se iniciaban mediante la adición de las células (9 μg Chl) a la disolución de aminoácidos. La radiactividad utilizada era de 8-9 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ (^{14}C), excepto en el caso de la Met (80 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$, ^{35}S). El volumen total de reacción era 1,15 ml y el tiempo de incubación de 10 min, tras los cuales se filtraba 1 ml de suspensión celular, que se lavaba y procesaba como en los casos anteriores.

2.4. ENSAYOS DE TRANSPORTE DE UREA, CIANATO Y METILAMONIO

2.4.1. Transporte de urea

Para la determinación de la actividad de transporte de urea en la estirpe PCC 6803 y en mutantes derivados de la misma se utilizaba [^{14}C]CO(NH₂)₂ a una concentración final en el ensayo de 1,6 μM . Las células se cultivaban previamente en medio BG11 y se incubaban en medio BG11₀ durante 8-10 h para hacerlas deficientes en nitrógeno. El procedimiento seguido para realizar los ensayos era básicamente el mismo que se describe en el apartado 2.3.1 para los ensayos de transporte de aminoácidos. La radiactividad empleada era 50 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$, y las suspensiones celulares utilizadas contenían 3,8-5,7 μg de Chl·ml⁻¹.

2.4.2. Transporte de cianato

Para la determinación de la actividad de transporte de cianato en la estirpe PCC 6803 y en mutantes derivados de la misma se utilizó [^{14}C]KCNO a una concentración final en el ensayo de 0,8 μM . Las células se cultivaban en medio líquido BG11, utilizándose en los ensayos suspensiones celulares que contenían 7,8-12,7 μg de Chl·ml⁻¹. La radiactividad específica empleada era de 54,5 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$. El procedimiento seguido para los ensayos fue similar al que se describe en el apartado 2.3.1 para los ensayos de transporte de aminoácidos.

2.4.3. Transporte de metilamonio

La actividad de transporte de metilamonio de la estirpe PCC 6803 y de los mutantes derivados de la misma se determinaba utilizando [^{14}C]CH₃NH₃⁺Cl como sustrato. Las células cultivadas en medio BG11 o BG11₀ suplementado con NH₄Cl o cultivadas en BG11 e incubadas en medio BG11₀ (carente de fuente de nitrógeno)

durante 6 h, se recogían, lavaban y resuspendían en tampón KH_2PO_4 20 mM- NaHCO_3 10 mM- NaOH (pH 7,1). Los ensayos de transporte se realizaban según un procedimiento similar al que se describe en el apartado 2.3.1 para el transporte de aminoácidos, pero utilizando tampón fosfato-bicarbonato (pH 7,1) en lugar de tampón Tricina y midiendo el transporte de 1 μM de sustrato en ensayos de 10 min. Las suspensiones celulares contenían 4,3-15,6 μg de $\text{Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la radiactividad específica utilizada era de 50 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$.

Se realizaron ensayos para determinar la dependencia del transporte de metilamonio respecto al tiempo en la estirpe PCC 6803 y en mutantes derivados de la misma. Para ello se utilizaron células cultivadas inicialmente en medio BG11 o medio BG11₀ suplementado con 2,5 mM de NH_4Cl y 5 mM de $\text{TES}\cdot\text{NaOH}$ (pH 7,5), que se incubaron posteriormente en medio BG11₀ (carente de fuente de nitrógeno) durante 6 h. Los ensayos se iniciaban mediante la adición de 0,2 ml (en el caso de la estirpe PCC 6803) ó 0,9 ml (en el caso de los mutantes) de una disolución de $[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ (50 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) a un cierto volumen (2 ml para la estirpe PCC 6803 y 9 ml para los mutantes) de suspensión celular (4,5-5,4 μg de $\text{Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$), resultando una concentración de sustrato en el ensayo de 1 μM en el caso de la estirpe PCC 6803, y 50 nM en el caso de los mutantes. A distintos tiempos se tomaban muestras de 250 μl o 1 ml, según el caso, que se filtraban, lavaban y procesaban como en los casos anteriores.

Para determinar el efecto inhibitor del amonio sobre el transporte de metilamonio en la estirpe PCC 6803, se midió la actividad de transporte de $[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ en ausencia y presencia de NH_4Cl (no marcado). El ensayo se inició mediante la adición de 0,2 ml de una disolución de $[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{NH}_3^+$ 127 μM (50 $\mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) (concentración final de metilamonio en el ensayo 7,9 μM) a 3 ml de una suspensión de células (8 μg de $\text{Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$) cultivadas en medio BG11 e incubadas durante 6 h en medio BG11₀, tomándose muestras de 0,1 ml a intervalos de 1 min. Tras 6 min de ensayo se añadieron 0,1 ml de una disolución de NH_4Cl 700 μM (concentración final 25 μM) y de nuevo se tomaron muestras cada minuto. Las muestras se filtraban y lavaban como se describió anteriormente.

2.5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD NITROGENASA Y DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE HETEROCISTOS

Para la determinación *in vivo* de la actividad nitrogenasa de la estirpe PCC 7120 y de los mutantes de transporte de aminoácidos derivados de la misma, se empleaban cultivos que habían crecido en medio BG11, con o sin análogos añadidos. Cuando los cultivos no habían sido suplementados con análogos, se controlaba la aparición de revertientes midiendo el transporte de algunos aminoácidos. Los cultivos se recogían y se lavaban con medio BG11₀ como se describió en el apartado 2.1.3, y las suspensiones

celulares resultantes se utilizaban para inocular matraces con medio BG110, a razón de $1 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$. La actividad nitrogenasa y la frecuencia de heterocistos de estos cultivos se determinaban tras 48 horas de incubación en condiciones de cultivo.

Para medir la actividad nitrogenasa se empleaba el método de reducción de acetileno descrito por Stewart *et al.* (1967). Se recogían 10 ml de cultivo ($2,5\text{-}22 \mu\text{g Chl}$), cuyas células se resuspendían en 2 ml de medio BG110, pasándose la suspensión celular a matraces Erlenmeyers de 17 ml de capacidad que se cerraban con un tapón de goma. Se inyectaban 2 ml de acetileno, resultando así una atmósfera de un 13,3% (v/v) de acetileno en aire. La cantidad de etileno producido tras 30-60 min de incubación en condiciones de cultivo (con agitación y luz a 30°C) se determinaba, mediante cromatografía de gases, en muestras de 1 ml de la fase gaseosa de los matraces. El cromatógrafo PYE Unicam 204 utilizado estaba equipado con un inyector, una columna Porapak Q y un detector de ionización de llama, mantenidos a una temperatura de 100, 80 y 150°C respectivamente. Las presiones parciales de los gases utilizados durante la cromatografía eran $2 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ para el H_2 y $0,4 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ para el aire y el N_2 . La señal de salida se procesaba con un integrador PYE Unicam DP88 que proporcionaba el área de cada pico detectado por el cromatógrafo. El aparato se calibraba con cantidades conocidas de etileno.

La frecuencia de heterocistos se determinaba examinando al microscopio óptico las suspensiones celulares, contando el número de heterocistos presentes en un total de 2500-6000 células.

2.6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD GLUTAMINA SINTETASA

La actividad transferasa de la glutamina sintetasa se determinaba según el método descrito por Shapiro y Stadtman (1970). Para ello se centrifugaba un volumen de suspensión celular que contenía $3\text{-}6 \mu\text{g}$ de Chl y las células se resuspendían en 0,8 ml de una mezcla de ensayo que contenía: tampón HEPES-NaOH 66,7 mM (pH 7,0), L-Gln 40 mM, MnCl_2 4 mM y ADP 0,5 mM. A esta suspensión se añadían 0,1 ml de una mezcla recién preparada, en proporción 1:1 (v/v), de unas disoluciones de cloruro de hidroxilamina 1,2 M y NaOH 1,2 M y, para permeabilizar las células, 20 μl de una disolución del detergente MTA al 1,25% (p/v) en agua. Después de agitar vigorosamente durante 10 s, la reacción se iniciaba por adición de 50 μl de una disolución de Na_2HAsO_4 0,4 M. Como blanco se realizaban ensayos paralelos que contenían agua en lugar de arseniato. La mezcla de reacción se incubaba durante 15 min a 30°C , y la reacción se detenía por adición de 2 ml de una disolución de FeCl_3 en medio ácido, que también permitía revelar el γ -glutamihidroxamato producido en la reacción. La disolución de FeCl_3 contenía 7,7 ml de HCl al 35% (v/v), 12 g de ácido tricloroacético y 33,3 g de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en un volumen final de 1 l. Tras la adición de la disolución de

FeCl₃, la mezcla resultante se centrifugaba y se medía la absorbancia del sobrenadante a 500 nm. La concentración del complejo coloreado formado se determinaba usando un coeficiente de extinción $E=0,89 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Una unidad de actividad enzimática corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de γ -glutamihidroxamato por min.

2.7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD UREASA

La actividad ureasa se medía en células permeabilizadas por adición de MTA. La mezcla de reacción contenía en un volumen de 1 ml: una suspensión celular conteniendo 17-20 μg de Chl, tampón Tricina-NaOH 40 mM (pH 8,1), urea 25 mM y MTA 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tras 30 min de incubación a 30°C la mezcla de reacción se centrifugaba durante 5 min a 4°C en un tubo de microcentrifuga, y el amonio producido se determinaba añadiendo a un volumen de 0,1 ml del sobrenadante obtenido 0,9 ml de agua y 0,5 ml de un reactivo comercial ("Sigma ammonia color reagent") que contiene una sal doble de iodo y mercurio, midiéndose a continuación la absorbancia a 430 nm del compuesto coloreado formado. Como blanco se realizaban ensayos paralelos que contenían agua en lugar de urea. Para la determinación de la cantidad de amonio se realizaba una curva patrón con concentraciones conocidas de NH₄Cl.

2.8. RESOLUCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS Y OTROS COMPUESTOS METABÓLICOS

2.8.1. Obtención y preparación de las muestras

Las muestras para determinar la acumulación intracelular de los aminoácidos marcados radiactivamente suministrados en los ensayos de transporte, así como para estudiar el destino metabólico de los mismos en la estirpe PCC 7120, se obtenían incubando los filtros procedentes de dichos ensayos (ensayos de 11 min en los que la concentración de sustrato era 10 μM) en 2 ml de agua hirviendo durante 5 min. Las suspensiones resultantes se centrifugaban, y una porción del sobrenadante obtenido se congelaba y liofilizaba, disolviéndose después en un pequeño volumen de agua (50-100 μl). Una alícuota (10 μl) de las muestras así generadas se sometía posteriormente a cromatografía en capa fina (TLC).

Para la determinación de la acumulación intracelular del metilamonio marcado radiactivamente suministrado en los ensayos de transporte de la estirpe PCC 6803, se procedía de manera similar a la descrita arriba, pero la concentración de metilamonio era de 1 μM y el tiempo de ensayo de 9 min. Las células empleadas en los ensayos de transporte se habían cultivado en medio BG11, e incubado posteriormente durante 6 horas en medio BG11₀ (carente de fuente de nitrógeno).

Para las medidas de acumulación extracelular de aminoácidos en el medio de cultivo se utilizaban células cultivadas en medio BG11, suplementado con el análogo o antibiótico pertinente en el caso de las estirpes mutantes. Dichas células se recogían, se lavaban y se resuspendían en medio BG11 o BG11₀ sin análogos, a razón de $1 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tras 46-51 horas de incubación en condiciones de cultivo, se tomaban muestras que se filtraban a través de filtros Millipore HA de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Una porción de la disolución filtrada (medio de cultivo sin células) se congelaba, se liofilizaba y se disolvía en un pequeño volumen de agua ($100 \mu\text{l}$). Los aminoácidos presentes en estas muestras se resolvían mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Como acercamiento experimental alternativo para detectar la liberación de aminoácidos al medio, células cultivadas en medio BG11, recogidas y lavadas como en el caso anterior, se resuspendían en tubos que contenían $2,5 \text{ ml}$ de medio BG11 y $10 \mu\text{Ci}$ de $[^{14}\text{C}]\text{NaHCO}_3$ ($55 \mu\text{Ci}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$). Tras 74 horas de incubación en condiciones de cultivo, se filtraban 2 ml de muestra, y la disolución filtrada se congelaba y liofilizaba, disolviéndose el residuo seco en $100 \mu\text{l}$ de agua. En este caso los aminoácidos se resolvían mediante TLC.

Para la determinación de los niveles intracelulares de aminoácidos se empleaba la cantidad de material celular indicada en cada caso, utilizándose células cultivadas en medio BG11 con el análogo pertinente en el caso de los mutantes de transporte. Las células se lavaban con medio BG11 o tampón Tricina-NaOH 25 mM ($\text{pH } 8,1$) y se resuspendían en 2 ml del mismo medio o tampón. Las suspensiones celulares se hervían 5 min y se centrifugaban, y los aminoácidos presentes en el sobrenadante obtenido se resolvían mediante HPLC.

Para el cálculo de las concentraciones intracelulares de los metabolitos estudiados se asumió un volumen intracelular de $5 \mu\text{l}$ por mg de proteína o $125 \mu\text{l}$ por mg de Chl (Ihlenfeldt y Gibson, 1975; Raboy y Padan, 1978).

2.8.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

Las muestras a analizar se aplicaban a placas de capa fina ($0,1 \text{ mm}$) de celulosa de $20 \times 20 \text{ cm}$ (Merck, producto número 5716) en las que se sometían a una separación bidimensional. El solvente utilizado en la primera dimensión era *n*-butanol-acetona-hidróxido amónico-agua ($20:20:10:4 \text{ v/v}$) y en la segunda dimensión isopropanol-ácido fórmico-agua ($20:1:5 \text{ v/v}$). Para detectar las manchas radiactivas, las placas se exponían a películas radiográficas durante una semana o se analizaban en un contador bidimensional de radiación β InstantImager (Packard). Cuando las placas se analizaban mediante autorradiografía convencional, la cuantificación de la radiactividad contenida en cada mancha se realizaba raspando la celulosa de la zona de la placa responsable de la mancha autorradiográfica observada y midiendo su radiactividad en un contador de

centelleo líquido. La identificación de los metabolitos responsables de las manchas radiactivas se hacía mediante co-cromatografía, suplementando las muestras radiactivas con aminoácidos no marcados y revelando los mismos con una disolución de ninhidrina tras la cromatografía. Esta disolución de ninhidrina se preparaba disolviendo 500 mg de ninhidrina en 50 ml de acetona y añadiendo una disolución de 50 mg de acetato de cadmio en una mezcla de 5 ml de agua y 1 ml de ácido acético glacial.

Las muestras procedentes de los ensayos de transporte de metilamonio se analizaban de manera similar, mediante TLC unidimensional, empleando un solvente compuesto por isopropanol-ácido fórmico-agua (20:1:5 v/v).

2.8.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Para la resolución de aminoácidos mediante HPLC se utilizaban dos métodos diferentes. Ambos implicaban la derivatización de los aminoácidos presentes en las muestras con *o*-ftalaldehído (OPA). La mezcla derivatizante se preparaba mezclando 4,5 ml de borato sódico 0,4 M (pH 10,0) con 0,5 ml de disolución OPA (54 mg de OPA en 1 ml de metanol) y 0,2 ml de β -mercaptoetanol. En ambos métodos se utilizaba una mezcla de aminoácidos de composición y concentración conocidas (disolución estándar de aminoácidos "AA-S-18" de Sigma) para calibrar el cromatógrafo, y la identificación de cada pico se realizaba mediante co-cromatografía. El cromatógrafo utilizado (Waters) estaba equipado con dos bombas, un detector de absorbancia Lambda-Max modelo 481 y un detector de fluorescencia modelo 420-AC. Los cromatogramas generados por el aparato se analizaban utilizando el programa Baseline 810.

Según el primer método (Método 1) (Martínez-Force y Benítez, 1991), un volumen de 25 μ l de muestra se mezclaba con 75 μ l de mezcla derivatizante y, tras un tiempo de reacción de 90 segundos a temperatura ambiente, se inyectaba en el cromatógrafo. Para la separación cromatográfica se utilizaba un gradiente de dos solventes: el solvente A contenía fosfato sódico 400 mM (pH 7,2), tetrahidrofurano y agua (5:1,5:93,5 v/v), y el solvente B contenía fosfato sódico 400 mM (pH 7,2), acetonitrilo y agua (2,5:55:42,5 v/v). El programa de gradiente empleado era el siguiente: tiempo 0, 0% solvente B; 0,8 min, 0% B; 4,2 min, 20% B; 6,6 min, 20% B; 8,5 min, 30% B; 10,6 min, 30% B; 13,3 min, 38% B; 14,8 min, 40% B; 15,4 min, 42% B; 15,8 min, 43% B; 20 min, 60% B; 23 min, 0% B. El cromatógrafo utilizaba una columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) de Merck. La detección se realizaba midiendo la absorbancia a 340 nm o la emisión de fluorescencia a 425 nm. Los aminoácidos Pro, Lys y Cys no podían detectarse mediante este método.

En el segundo método (Método 2) (Farfán *et al.*, 1996), la derivatización e inyección de la muestra se hacían de modo automático mediante un inyector Waters 715 Ultra Wisp conectado al cromatógrafo, y la detección se realizaba midiendo la emisión de

fluorescencia a 425 nm. En este método, el solvente A consistía en metanol, tetrahidrofurano y tampón (2:2:96 v/v) y el solvente B en metanol y agua (65:35 v/v). El tampón consistía en Na_2HPO_4 0,05 M y acetato sódico 0,05 M, ajustado a pH 7,5 con ácido acético glacial. El programa de gradiente empleado era el siguiente: tiempo 0, 0% solvente B; 11,5 min, 50% B; 20,5 min, 100% B; 25,5 min, 0% B; 30 min, 0% B. Se utilizaba una columna Waters Resolve C18 (5 μm) de 3,9 mm x 150 mm. Los aminoácidos Pro y Cys no podían detectarse mediante este método.

2.8.4. Determinación de aminoácidos totales con ninhidrina

Para determinar la cantidad total de aminoácidos presentes en una muestra, se mezclaba 1 ml de muestra con 1 ml de reactivo de ninhidrina y, después de agitar, se calentaba en un baño a 100°C durante 15 min. El reactivo de ninhidrina consistía en una mezcla de 0,8 g de ninhidrina, 0,12 g de hidrindantina, 30 ml de etilenglicolmonometiléter y 10 ml de tampón acetato 4 M (pH 5,5). Tras enfriar las muestras a temperatura ambiente, se añadía 1,5 ml de etanol al 50% (v/v) y, tras 10 min a temperatura ambiente, se medía la absorbancia a 570 nm. En cada ensayo se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas del aminoácido L-Ala.

2.9. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CELULARES

2.9.1. Determinación de proteína

La cantidad de proteína total de las suspensiones celulares se determinaba siguiendo el método descrito por Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones introducidas por Markwell *et al.* (1978). Se mezclaban muestras de 200 μl de suspensión celular con 50 μl de NaOH 0,5 N y 750 μl de una mezcla (en proporción 100:1) de las disoluciones A y B, cuya composición se especifica a continuación. Disolución A: Na_2CO_3 2%, NaOH 0,4%, tartrato sódico potásico 0,16%, SDS 1% (p/v). Disolución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4% (p/v). Tras 15 min de incubación a 30°C se añadían 75 μl de reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck) diluido en agua (1:1 v/v) y se incubaba de nuevo a 30°C durante 30 min. A continuación se medía la absorbancia a 750 nm. Para cada determinación se realizaba una curva patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

2.9.2. Determinación de clorofila

El contenido en clorofila *a* (Chl) de las suspensiones celulares se determinaba espectrofotométricamente en extractos metanólicos (Mackinney, 1941). Un volumen de suspensión celular de 100 μl , conteniendo un máximo de 60 μg de Chl, se mezclaba con 1 ml de metanol en un tubo de microcentrífuga y, tras agitación vigorosa, la suspensión resultante se centrifugaba a 13000 rpm durante 2 min. La concentración de clorofila en el sobrenadante se estimaba en base a su absorbancia a 665 nm, utilizándose un

coeficiente de extinción $E=74,46 \text{ (mg/ml)}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La cantidad de células que contiene 1 μg de Chl contiene aproximadamente 25-30 μg de proteína.

2.10. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA

2.10.1. Plásmidos utilizados

Los plásmidos utilizados en este trabajo no construidos durante la realización del mismo se relacionan en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia o fuente
pGEM-T	Vector (Ap^{r}) para la clonación de productos generados mediante PCR	Promega
pIC20R	Vector (Ap^{r}) de clonación	Marsh <i>et al.</i> , 1984
pBluescript SK (+)	Vector (Ap^{r}) de clonación	Stratagene
pRL500	Vector (Ap^{r}) de selección positiva de clones recombinantes	Elhai y Wolk, 1988a
pRL463	Vector ($\text{Ap}^{\text{r}}\text{Sm}^{\text{r}}\text{Sp}^{\text{r}}$) de selección positiva que contiene la casete de resistencia a Sm y Sp C.S3	Elhai y Wolk, 1988a
pRL171	Vector ($\text{Ap}^{\text{r}}\text{Cm}^{\text{r}}$) de selección positiva que contiene la casete de resistencia a Cm C.C1	Elhai y Wolk, 1988a
pRL278	Vector (Km^{r}) movilizable que contiene el gen <i>sacB</i> para la selección positiva de dobles recombinantes en <i>Anabaena</i> sp. Utilizado también como fuente de la casete de resistencia a Km C.K3	Cai y Wolk, 1990
pRL528	Vector (Cm^{r}) portador del gen <i>mob</i> y de los genes de las metilasas de sitios de restricción <i>AvaI</i> y <i>Eco47II</i> (isoesquizómero de <i>AvaII</i>)	Elhai y Wolk, 1988b
pRL591-W45	Vector (Km^{r}) portador del gen de la metilasa de sitios de restricción <i>AvaIII</i>	Elhai <i>et al.</i> , 1994
pRL443	Plásmido ($\text{Ap}^{\text{r}}\text{Tc}^{\text{r}}$) conjugativo de amplio espectro, derivado de RP4, capaz de movilizar plásmidos derivados de <i>ColE1</i>	Elhai y Wolk, 1988b
pCSAM70	Plásmido (Ap^{r}) derivado del vector de expresión pQE9 (Quiagen, Inc.), portador del gen <i>ntcA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 clonado en fase	A.M. Muro-Pastor, no publicado
pREP4	Plásmido (Km^{r}) portador del gen <i>lacI</i> , que expresa constitutivamente el producto de dicho gen	Quiagen, Inc.

2.10.2. Aislamiento de plásmidos de *E. coli* a pequeña escala

Se utilizaba el procedimiento denominado "lisis alcalina" descrito por Sambrook *et al.* (1989). Las células contenidas en 3 ml de cultivo se recogían mediante centrifugación en tubos de microcentrífuga y se resuspendían en 100 μ l de Disolución I (Tris-HCl 25 mM [pH 8,0], glucosa 50 mM, EDTA 10 mM [pH 8,0]); a continuación se añadían 200 μ l de Disolución II (NaOH 0,2 N, SDS 1% [p/v]) y se agitaba brevemente, produciéndose así la lisis celular. Se añadían entonces 150 μ l de Disolución III (acetato potásico 5M [pH 4,8]) y los tubos se agitaban suavemente, se incubaban 5 min en hielo y se centrifugaban a continuación a 4°C y 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se pasaba a un tubo limpio y se extraía con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1 v/v), se separaban las fases mediante centrifugación y la fase acuosa se precipitaba con 2 volúmenes de etanol absoluto. El precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba y se resuspendía en 20 ó 25 μ l de T1/10E (Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 0,1 mM [pH 8,0]).

2.10.3. Aislamiento de plásmidos de *E. coli* a gran escala

Se utilizaba el procedimiento descrito por Heilig *et al.* (1994) que incluía lisis alcalina de las células y purificación del DNA plasmídico mediante precipitación con polietilenglicol (PEG). Las células contenidas en 200 ml de cultivo se recogían mediante centrifugación y se resuspendían en 4 ml de Disolución I (ver apartado 2.10.2), añadiéndose a la suspensión celular resultante 25 mg de lisozima disueltos en 1 ml de Disolución I. Tras incubar 10 min a temperatura ambiente, se añadían 10 ml de Disolución II (ver apartado 2.10.2) y se incubaba durante 10 min en hielo. A continuación se añadían 7,5 ml de acetato potásico 3 M (pH 5,5) y se volvía a incubar durante 10 min en hielo. Tras centrifugación para precipitar los restos celulares, el sobrenadante se transfería a un tubo limpio y se añadían 0,6 volúmenes de isopropanol. Después de incubar los tubos durante 15 min a temperatura ambiente, se centrifugaba y el precipitado obtenido se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba brevemente y se resuspendía de nuevo en 1 ml de Disolución I. Tras 20 min de incubación a 37°C en presencia de RNasa a una concentración final de 20 μ g·ml⁻¹, se añadían 2 ml de Disolución II y 1,5 ml de acetato potásico 3 M, se centrifugaba y el sobrenadante obtenido se sometía a extracción con fenol y, posteriormente, con fenol:cloroformo (1:1 v/v). A continuación se añadían a la fase acuosa 0,25 volúmenes de acetato amónico 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Después de 10 min a -70°C se centrifugaba y el precipitado obtenido se lavaba con etanol al 70% (v/v) y se secaba. Este precipitado resuspendido en 2 ml de T1/10E se suplementaba con 0,8 ml de disolución PEG (PEG 8000 30% [p/v], NaCl 1,6 M) y se incubaba a 0°C durante 15 horas. El DNA plasmídico se recogía entonces mediante centrifugación (8000 rpm, en un rotor SS34, durante 20 min

a 4°C), se resuspendía en 1 ml de T1/10E y se precipitaba con 2 volúmenes de etanol y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M (pH 5,5). El precipitado se lavaba con etanol al 70% (v/v), se secaba y se resuspendía finalmente en 200 µl de T1/10E.

2.10.4. Aislamiento de DNA total de cianobacterias

El aislamiento de DNA total de cianobacterias se realizaba siguiendo el método descrito por Cai y Wolk (1990). Para ello se partía de un cultivo de 50 ml, que se recogía mediante centrifugación, resuspendiéndose las células en 400 µl de T1/10E. A esta suspensión celular se le añadían 150 µl de perlas de vidrio (0,25-0,3 mm de diámetro) previamente lavadas con ácido nítrico y agua y esterilizadas a 180°C, 20 µl de SDS al 10% (p/v) y 450 µl de una mezcla 1:1 (v/v) de fenol:cloroformo. La mezcla resultante se sometía a 5-10 ciclos de agitación vigorosa (1 min) e incubación en hielo (1 min). Finalmente, se centrifugaba a 13000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperaba el sobrenadante, que se sometía a extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol, dos veces con 1 volumen de fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y, finalmente, con un volumen de cloroformo. La fase acuosa final se precipitaba con 2 volúmenes de etanol absoluto y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M (pH 5,2), se centrifugaba a 13000 rpm durante 15 min a 4°C y se lavaba con etanol al 70% (v/v). El DNA precipitado se resuspendía en 30 µl de T1/10E.

En el caso de *Fischerella muscicola* UTEX 1829 las células se recogían mediante centrifugación y se congelaban con N₂ líquido, machacándose a continuación en un mortero con perlas de vidrio (0,25-0,3 mm de diámetro). El resto del proceso de aislamiento de DNA era igual al descrito anteriormente.

2.10.5. Determinación de la concentración de DNA

La concentración de DNA se determinaba sometiendo una muestra de la preparación a electroforesis en un gel de agarosa con bromuro de etidio, tal como se explica en el apartado siguiente, y comparando la intensidad de la banda obtenida con las de un patrón de DNA del fago λ de cantidad conocida.

En algunos casos también se hacía una determinación espectrofotométrica, midiendo la A_{260nm} (Sambrook *et al.*, 1989).

2.10.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizaba mediante electroforesis en geles de agarosa, según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Los geles de agarosa se preparaban en tampón TBE 0,5x. El tampón TBE 1x consistía en Tris-borato 90 mM y EDTA 2 mM (pH 8,0). La concentración de agarosa de los geles variaba entre el 0,6% y el 1% (p/v), dependiendo del rango de resolución de tamaños requerido. Las muestras se trataban con RNasa (concentración final 0,05 µg·µl⁻¹) antes de ser sometidas a electroforesis y se suplementaban con 0,1 volúmenes de tampón de carga 10x compuesto

por glicerol al 50% (v/v), azul de bromofenol al 0,4% (p/v) y xileno-cianol FF al 0,4% (p/v). Como patrones de tamaño se utilizaban los fragmentos del DNA del fago λ digerido con *Cla*I. Las electroforesis se llevaban a cabo en aparatos horizontales marca Pharmacia modelos GNA-100 y GNA-200. Para la detección del DNA se añadía bromuro de etidio a los geles de agarosa a una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. El DNA se visualizaba iluminando los geles con un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y se fotografiaba utilizando un equipo formado por una cámara de vídeo UVP, un monitor Sony, una impresora videográfica Sony y una unidad Imagestore 5000 UVP.

2.10.7. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA separados por electroforesis se extraían de los geles de agarosa mediante la utilización del juego de reactivos GeneClean II (BIO 101 Inc., USA). La extracción mediante este procedimiento se basa en la solubilización de la agarosa en presencia de NaI 6 M y en la unión del DNA a perlas de vidrio. Para llevar a cabo la misma, el trozo de gel que contenía el DNA a aislar se cortaba y se trataba siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el aislamiento de fragmentos pequeños de DNA se utilizaban membranas de DEAE-celulosa (NA 45, Schleicher & Schuell) tratadas previamente con NaCl 2,5 M durante varias horas y lavadas abundantemente con H₂O. Para la elución del DNA, la membrana se calentaba a 68°C durante 30 min en 400 μl de disolución de elución que consistía en: Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0) y NaCl 1 M. El DNA eluido se precipitaba con 4 μl de MgCl₂ 1 M y 1 ml de etanol absoluto, se secaba y se resuspendía en 10 ó 20 μl de T1/10E.

2.10.8. Restricción del DNA

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por las firmas comerciales Boehringer Mannheim, Pharmacia y New England Biolabs. Las reacciones se llevaban a cabo en las condiciones recomendadas por los fabricantes.

2.10.9. Desfosforilación del DNA

Cuando se clonaban fragmentos de DNA no seleccionables, los grupos fosfato de los extremos 5' del vector se eliminaban con objeto de evitar la religación de los mismos y, por lo tanto, la generación de un alto número de plásmidos sin inserto.

Una vez digerido el vector con las enzimas de restricción adecuadas, éstas se inactivaban calentando 15 min a 70°C, y el DNA se trataba con 1 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Pharmacia), utilizando 0,1 volúmenes de un tampón de reacción 10x que consistía en Tris 100 mM (pH 8,0), ZnCl₂ 10 mM y MgCl₂ 10 mM. Tras 30 min de incubación a 37°C se añadía otra unidad de enzima y se incubaba a 37°C durante otros

30 min. Finalmente el fragmento de DNA se sometía a electroforesis y se purificaba a partir del gel de agarosa como se describe en el apartado 2.10.7.

2.10.10. Relleno de extremos 5' protuberantes

Para hacer romos los extremos 5' protuberantes de algunos fragmentos de DNA digeridos con endonucleasas de restricción, éstos se trataban con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Pharmacia).

El tratamiento se realizaba en un volumen final de 20 µl de una mezcla que contenía el DNA, 2 µl de tampón Klenow 10x (Tris-HCl 0,5 M [pH 7,5], MgCl₂ 0,1 M y DTT 0,1 M) y 1 µl de una disolución 1 mM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos (concentración final 0,05 mM). La mezcla se incubaba durante 30 min a 37°C.

2.10.11. Ligación del DNA

Para la ligación de fragmentos de DNA, éstos se mezclaban en un tubo de microcentrífuga en presencia de 3 U de DNA ligasa del bacteriófago T4 (Promega), utilizándose el tampón suministrado por la firma comercial. La mezcla, en un volumen final de 10-20 µl, se incubaba a 15°C durante 4-15 horas.

2.10.12. Marcaje radiactivo de sondas de DNA

Para el marcaje radiactivo de sondas de DNA se utilizaba el juego de reactivos "Ready To Go" de Pharmacia, que suministra una mezcla de reacción liofilizada conteniendo dATP, dGTP, dTTP, 4-8 U del fragmento Klenow de la DNA polimerasa y una mezcla de oligodesoxirribonucleótidos de secuencia aleatoria. El DNA a marcar (25-50 ng), previamente desnaturalizado, se añadía a la mezcla anterior disuelta en agua, en presencia de [α -³²P]dCTP (3000 Ci·mmol⁻¹), y se incubaba 30 min a 37°C. Tras el marcaje, los nucleótidos no incorporados se eliminaban filtrando la muestra a través de una columna de Sephadex G-50.

2.10.13. Transferencia de DNA de geles de agarosa a filtros de nylon e hibridación con sondas radiactivas de DNA (análisis de Southern)

Una vez sometidas las muestras a electroforesis en gel de agarosa, el gel se sumergía en HCl 0,25 N para hidrolizar parcialmente el DNA y facilitar así su transferencia, se lavaba con agua y a continuación el DNA se transfería por capilaridad durante 12-15 h a una membrana de nylon GeneScreen Plus (Dupont) en condiciones alcalinas, usando como vehículo de transferencia NaOH 0,4 N. Terminada la transferencia la membrana se lavaba con SSPE 2x y se dejaba secar para que se fijara el DNA. La disolución SSPE 20x contiene NaCl 3 M, fosfato sódico 200 mM y EDTA 20 mM (pH 7,4).

La prehibridación e hibridación se llevaban a cabo en una disolución conteniendo SSPE 5x, disolución de Denhardt 5x, SDS 0,5% (p/v) y DNA de esperma de arenque ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para hibridaciones en condiciones permisivas y $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para hibridaciones en condiciones restrictivas). La disolución de Denhardt 100x consiste en ficol 2% (p/v), polivinil pirrolidona 2% (p/v) y seroalbumina bovina 2% (p/v).

Tras 2-4 horas de prehibridación, a 55°C en condiciones permisivas o a 65°C en condiciones restrictivas, se añadía la sonda marcada radiactivamente, previamente desnaturalizada mediante incubación a 100°C durante 10 min y enfriamiento inmediato a 4°C . Después de unas 15 horas de hibridación a la misma temperatura que la de prehibridación, el filtro se lavaba dos veces con una disolución de SSPE 2x y SDS al 0,1% durante 15 min y una vez con SSPE 1x y SDS al 0,1% durante 15 min. Estos lavados se realizaban a la misma temperatura que la hibridación correspondiente. Las señales de hibridación se visualizaban mediante autorradiografía o analizando el filtro en un aparato de autorradiografía electrónica InstantImager.

2.10.14. Transferencia de DNA plasmídico de colonias de *E. coli* a filtros de nitrocelulosa e hibridación con sondas radiactivas

La hibridación del DNA plasmídico de colonias de *E. coli* se llevaba a cabo según se describe en Sambrook *et al.* (1989). Para ello, células de las colonias a analizar se transferían a cajas de medio sólido LB y a filtros de nitrocelulosa circulares (Nucleopore, REC-85) colocados sobre cajas del mismo medio. Después de 12 horas de incubación a 37°C , los filtros se sometían a distintos tratamientos para conseguir el lisado de las colonias y la fijación del DNA plasmídico al filtro. Concretamente, los filtros se trataban durante 3 min con una disolución de SDS al 10% (p/v), colocándolos sobre papel Whatman 3MM embebido en dicha disolución, y a continuación, mediante el mismo procedimiento, se trataban sucesivamente con una disolución desnaturalizante de NaOH 0,5 N y NaCl 1,5 M durante 5 min y con otra neutralizante de Tris-HCl 0,5 M (pH 7,4) y NaCl 1,5 M durante 5 min. Finalmente, los filtros se equilibraban con SSC 2x durante 5 min, se secaban a temperatura ambiente durante 30 min y se calentaban en un horno a 80°C durante 1-2 horas. El tampón SSC 1x contiene NaCl 0,15 M y citrato sódico 15 mM (pH 7,0).

Antes de proceder a la hibridación se realizaba un prelavado de los filtros a 50°C durante 30 min en una disolución de SSC 5x, SDS 0,5% (p/v) y EDTA 1 mM (pH 8,0) para eliminar los restos celulares. La prehibridación e hibridación se llevaban a cabo en una disolución que contenía KH_2PO_4 25 mM (pH 7,4), SSC 5x, disolución de Denhardt 5x, SDS 1% y DNA de esperma de arenque $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Las condiciones de prehibridación e hibridación eran las mismas que las descritas en el apartado anterior. Finalmente, los filtros se lavaban cuatro veces con SSC 2x y SDS al 0,1% durante 5 min a temperatura

ambiente y una vez con SSC 1x y SDS al 0,1% durante 20 min a 65°C, si la hibridación se hacía en condiciones restrictivas, o durante 15 min a 55°C, si se hacía en condiciones permisivas. Los filtros se analizaban en un aparato de autorradiografía electrónica InstantImager.

2.10.15. Amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se realizaba en un aparato "Mastercycler 5330" (Eppendorf). La mezcla de reacción, en un volumen final de 50 µl, contenía 2 ng del DNA molde, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido, 50 pmol de cada cebador y 2,5 U de TAQ polimerasa ("EcoTaq", Ecogen S.R.L), en el tampón suministrado con la polimerasa por la casa comercial. Al tubo que contenía la mezcla de reacción se le añadían 50 µl de aceite mineral para evitar la evaporación.

El programa utilizado realizaba 30 ciclos de las siguientes incubaciones: desnaturalización, 1 min a 95°C; renaturalización, 1 min a 55°C; polimerización, 1 min a 72°C. Estos 30 ciclos iban precedidos por una incubación a 95°C durante 2 min y finalizaban con una incubación a 72°C durante 10 min.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las diferentes reacciones de amplificación se especifican a continuación:

Am1: 5' GGGAGCCACTAAAGTTCACAGG 3'
Am2: 5' CGGCTATCAAAATCCAGATGGC 3'
Tr2a: 5' GGGAGTTGATTTAGTATAGGCGATG 3'
Tr2b: 5' TTACTAACGGTGTCAACCGGCG 3'
Tr3a: 5' GTTTTCTGCCTACTTATTGGTGGCG 3'
Tr3b: 5' CTACGGTGGTGCCGGGCTCAAAGG 3'
Tr6: 5' GGAAGAAATTAATCAAAAGGGCGGG 3'
Tr7: 5' CGCCCCATTAGCCAGTGGTTGGG 3'
Tr8: 5' CAGGATGCGTCTATTTTGGCCCC 3'
Tr9: 5' CAACGAAATCGGGGGAATAAACGCC 3'
Tr10: 5' CCAGCGCCACAGGCAACCAAGTACG 3'
Tr11: 5' CGGTAAACATAATGCTCACCCCTCC 3'
Tr12: 5' GGGTTAATAATTGTGAAGGGGGG 3'
Tr13: 5' GGGCAGTATCCTTGGAGATGGGC 3'
Tr14: 5' CTCCAACAAAGCCTGCATGGTGGGC 3'
Tr15: 5' AAATAGTAGACCCCTGCTCTCGGGC 3'
Tr16: 5' CGCTACCCTGAGCCTGGATAAACCC 3'
Tr17: 5' CAAATACCAAGCCAGTGCCCAGCC 3'
Tr18: 5' GCCCATTTCCAGAAGGATTGCCCG 3'

Tr19: 5' GGAATCAGTTTCCTTAACAAAGCC 3'
Tr20: 5' GTAATTGACACAGTTTCCATGAGCG 3'
Tr21: 5' CTTCTCTTTATTTGCACCACGAGGG 3'
Tr22: 5' GGGACGTTTGAACATTCTGGATGGC 3'
Tr23: 5' GAGTTTCAAGAAAGTAATGAGAGGC 3'
Tr24: 5' CCGCCAGGGCATCACTTTTTTAGTG 3'
Tr25: 5' TATATATTCAAGTATTGCTTCTCTG 3'

2.10.16. Secuenciación de DNA

Las reacciones de secuenciación se llevaban a cabo siguiendo el método de Sanger *et al.* (1977), basado en la terminación de la elongación de cadenas de DNA por incorporación de didesoxirribonucleótidos. El DNA a secuenciar (1-2 µg) se sometía a desnaturalización en presencia de NaOH 400 mM durante 10 min a temperatura ambiente y se filtraba a través de una columna de Sephadex G-50. Para realizar las reacciones se utilizaba el juego de reactivos denominado "T7 Sequencing Kit" (Pharmacia) siguiendo las instrucciones de la casa comercial suministradora. Se realizaba primero una reacción de elongación a partir de un cebador. La mezcla de reacción correspondiente se dividía posteriormente en cuatro partes iguales que se procesaban separadamente para llevar a cabo el proceso de terminación, añadiéndose a cada una de ellas uno de los cuatro didesoxirribonucleótidos. El marcaje radiactivo de las cadenas se realizaba con [α - 35 S]dATP (1000 Ci·mmol $^{-1}$). Los cebadores utilizados eran los denominados "universal-20" y "reverso" (de Boehringer). Estos cebadores aparean con los vectores utilizados para la clonación en zonas adyacentes al inserto que se deseaba secuenciar. También se utilizaron cebadores correspondientes a zonas de secuencia conocida del propio inserto, sintetizados por encargo.

Las muestras obtenidas tras la reacción de secuenciación se analizaban mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Los geles se preparaban al 6% (p/v) de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida, 29:1), en tampón TBE 1x conteniendo urea 4,7 M, y se polimerizaban con persulfato amónico al 0,08% (p/v), usando como catalizador de la polimerización TEMED 6 mM. Para facilitar la separación del gel de los cristales una vez concluida la electroforesis, los cristales se recubrían antes de la preparación del gel con una disolución repelente de silano de diclorodimetilo (Merck) y se dejaban secar 1 hora a temperatura ambiente. La electroforesis se llevaba a cabo en un aparato modelo SE 1500 (Hoefer Scientific Instruments) a una potencia de 130 W. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se transfería a papel Whatman 3MM y se secaba al vacío durante 2 h en un secador de geles modelo SE 1160 (Hoefer Scientific Instruments), calentando a 80°C durante los primeros 90 min de secado y dejándolo enfriar durante el resto del tiempo. Finalmente, para

visualizar los resultados, el gel seco se ponía en contacto con una película fotográfica Kodak que posteriormente se revelaba.

2.10.17. Ensayos de retardo en gel

Los ensayos de retardo en gel se realizaban utilizando un método no radiactivo. La incubación de la proteína y el DNA se llevaba a cabo en un volumen final de 20 μl de una mezcla que contenía: tampón HEPES-NaOH 6 mM (pH 8,0), Tris-HCl 7 mM (pH 8,0), KCl 42,5 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM, MgCl_2 0,375 mM, gelatina 0,0025%, Tween-20 0,001% (p/v), seroalbúmina bovina 0,05 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, glicerol 8% (v/v), 75-100 ng del fragmento de DNA a ensayar, 75 ng de un fragmento de DNA competidor y 5 μl de una muestra diluida de un extracto de *E. coli* BL21 (pCSAM70, pREP4) usado como fuente de la proteína NtcA. El fragmento de DNA competidor, de 223 pb de longitud, se obtuvo mediante PCR, utilizando como molde el plásmido pBluescript SK(+) y como cebadores los oligonucleótidos "universal-20" y "reverso". La inducción por IPTG de la expresión de la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 clonada en el plásmido pCSAM70, así como la preparación del extracto de la estirpe inducida, se realizaba siguiendo las instrucciones del fabricante de la casa comercial que suministra el vector pQE9 (Quiagen, Inc.). En los ensayos de unión se utilizaron diluciones de 100 y 200 veces de un extracto que contenía 57 μg de proteína total $\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

Las mezclas de ensayo se incubaban durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se cargaban en un gel al 6% (p/v) de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida, 79:1) preparado en tampón Tris-glicina conteniendo glicerol al 7% (v/v). Antes de cargar las muestras, los geles se sometían a una corriente eléctrica de 100 V durante 1 h y, una vez cargadas, a 200 V; el desarrollo de la electroforesis se realizaba a 4°C. El tampón Tris-glicina utilizado en la preparación de los geles y como tampón de electroforesis contenía: Tris-HCl 50 mM, glicina 380 mM y EDTA 13 mM. La visualización de las bandas de DNA se realizaba mediante tinción del gel con una disolución de bromuro de etidio y posterior iluminación con luz ultravioleta.

2.11. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE RNA

2.11.1. Aislamiento de RNA de cianobacterias

El aislamiento de RNA total de cianobacterias se realizaba como se describe en García-Domínguez y Florencio (en prensa), a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento (3-4 μg Chl $\cdot\text{ml}^{-1}$), cuyas células se recogían y resuspendían en 400 μl de STET (sacarosa 8% [p/v], Tritón X-100 5% [p/v], EDTA 50 mM, Tris-HCl 50 mM [pH 8,0]), 80 μl de Macaloide (inhibidor de RNasas) al 3% (p/v), 450 μl de fenol:cloroformo (1:1 v/v) y 150 μl de perlas de vidrio (0,42-0,6 mm de diámetro) tratadas como se describió en el apartado 2.10.4. Esta mezcla se sometía a 10 ciclos de agitación vigorosa (1 min) e

incubación en hielo (1 min). A continuación se centrifugaba a 12000 rpm durante 10 min a 4°C, y el sobrenadante se extraía tres veces con fenol:cloroformo (1:1 v/v). Los ácidos nucleicos se precipitaban con 80 µl de LiCl 10 M y 1 ml de etanol absoluto, y el precipitado se resuspendía en H₂O y se trataba con 40 U de DNasa libre de RNasa (Boehringer) a 30°C durante 40 min. Tras un nuevo tratamiento con fenol:cloroformo, el RNA se precipitaba con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se lavaba con etanol al 70% (v/v) y se resuspendía en 20 µl de H₂O.

2.11.2. Determinación de la concentración de RNA

La cuantificación del RNA total contenido en las muestras se realizaba espectrofotométricamente, determinándose la A_{260nm} (Sambrook *et al.*, 1989).

2.11.3. Electroforesis de RNA en geles de agarosa

Los geles de agarosa para la electroforesis de RNA se preparaban a una concentración de agarosa del 1% (p/v) en tampón MOPS 1x y formaldehído al 2% (v/v). El tampón MOPS 10x consistía en: MOPS 200 mM, acetato sódico 5 mM (pH 7,0) y EDTA 0,5 mM (pH 8,0).

Las muestras, preparadas en un volumen final de 27 µl, contenían 15-20 µg de RNA total, 1,4 µl de tampón MOPS 10x, 4,9 µl de formaldehído al 37% (v/v) y 14 µl de formamida. Tras incubarse a 65°C durante 15 min y enfriarse en hielo, las muestras se suplementaban con 1 µl de bromuro de etidio (de una disolución que contenía 1 mg·ml⁻¹) y 3 µl de tampón de carga (ver apartado 2.10.6) y se cargaban en el gel.

2.11.4. Transferencia de RNA de geles de agarosa a filtros de nylon e hibridación con sondas radiactivas de DNA (análisis de "Northern")

Una vez que las muestras de RNA se habían sometido a electroforesis en un gel de agarosa, se transferían a una membrana de nylon (Hybond N-plus; Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. El gel se lavaba tres veces durante 15 min con agua a 65°C para eliminar parte del formaldehído y se equilibraba sumergiéndolo dos veces en SSPE 10x, durante 20 min cada vez. A continuación, el RNA se transfería al filtro mediante aplicación de vacío durante 1 h, utilizando un aparato TransVac TE80 (Hoefer Scientific Instruments). Como disolución de transferencia se usaba NaOH 50 mM.

La prehibridación e hibridación se realizaban en una disolución que contenía formamida al 50% (v/v), SSPE 5x, disolución de Denhardt 5x, SDS al 0,1% (p/v) y 50 µg·ml⁻¹ de DNA de esperma de arenque. Tras 2 horas de prehibridación a 42°C, se añadía la sonda marcada radiactivamente y se dejaba hibridar a la misma temperatura durante unas 15 horas. A continuación, el filtro se lavaba dos veces con una disolución de SSPE 2x y SDS al 0,1%, durante 10 min a temperatura ambiente, y una vez con una

disolución de SSPE 1x y SDS al 0,1%, durante 15 min a 65°C. Las señales de hibridación se visualizaban y cuantificaban analizando el filtro en un aparato de autorradiografía electrónica InstantImager.

2.11.5. Ensayos de extensión de cebadores

Para los ensayos de extensión de cebadores, los oligonucleótidos utilizados como tales, Am2 (véase apartado 2.10.15) y Am3 (5' GGAACACAGGCCAACCAGGGAG 3'), se marcaban radiactivamente en su extremo 5' utilizando la polinucleótido quinasa del fago T4 (Boehringer). Para ello se preparaba una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 20 μl , 100 ng del oligonucleótido a marcar, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl_2 10 mM, espermidina 0,1 mM, DTT 5 mM, EDTA 0,1 mM, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (5000 $\text{Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$) y 2-3 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de polinucleótido quinasa. La mezcla de reacción se incubaba durante 1 h a 37°C. Los nucleótidos no incorporados tras el marcaje se eliminaban mediante precipitación con etanol absoluto y acetato sódico y lavados sucesivos con etanol al 70% (v/v).

A continuación se mezclaban 30-40 ng del oligonucleótido marcado con 50 μg de RNA total de la estirpe PCC 6803 en presencia de KCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM (pH 8,0), en un volumen final de 15 μl . La mezcla resultante se incubaba a 85°C durante 10 min, con el fin de desnaturalizar el RNA, y posteriormente a 50°C durante 3 h, para permitir el apareamiento del cebador con el RNA. Esta mezcla se suplementaba entonces con los componentes de la reacción de extensión, produciendo una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 45 μl , los componentes de la mezcla anterior, actinomicina D 0,15 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos a concentración 0,75 mM, transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de las aves (AMV) (Boehringer) 0,15 $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ y 9 μl del tampón comercial 5x suministrado con la enzima AMV. Tras una incubación de 1 h a 47°C, se trataba con 100 μl de RNasa A libre de DNasas (Boehringer), preparada a concentración 0,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, durante 15 min a 37°C y se hacía una extracción con fenol:cloroformo (1:1 v/v). El DNA sintetizado se precipitaba con acetato sódico y etanol absoluto, se lavaba con etanol al 70% (v/v) y se resuspendía en un tampón consistente en: formamida 98% (v/v), xilencianol FF 0,1% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v) y EDTA 10 mM (pH 8,0) (Sambrook *et al.*, 1989).

Estas muestras se cargaban en un gel de poliacrilamida al 6% (apartado 2.10.16) paralelamente a una reacción de secuenciación en la que se usaba como cebador el mismo oligonucleótido utilizado en la reacción de extensión.

2.11.6. Marcaje de RNA e hibridación con DNA unido a filtros de nitrocelulosa

Para la utilización de RNA total como sonda en hibridaciones con DNA unido a filtros, con objeto de comparar la expresión de distintos genes (véase apartado 3.6.3), se efectuaba un marcaje 5' terminal del RNA. Para ello se hidrolizaban parcialmente 15 µg de RNA total, mediante incubación en presencia de NaOH 125 mM a 0-4°C durante 30 min, y a continuación se neutralizaba con 0,25 volúmenes de Tris-HCl 1 M (pH 7,5). Tras una precipitación con etanol absoluto, el RNA se resuspendía en H₂O y se procedía al marcaje utilizando la polinucleótido quinasa del fago T4 (Boehringer) y [γ -³²P]dATP como se indicó en el apartado 2.11.5 para el marcaje de oligonucleótidos.

La hibridación con el DNA, tras haber sido éste transferido a un filtro de nylon (ver apartado 2.10.13), se realizaba siguiendo el método descrito por Fellay *et al.* (1995). La disolución de prehibridación e hibridación contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), seroalbúmina bovina 0,2% (p/v), ficol 0,2% (p/v), pirofosfato sódico 0,1% (p/v), SDS 1% (p/v), NaCl 1 M y 100 µg·ml⁻¹ de RNAt de levadura (Boehringer). La temperatura de hibridación era de 65°C. Los lavados se realizaban con SSC 1x y SDS al 1% durante 30 min a 65°C, dos veces, y con SSC al 0,2% durante 15 min a temperatura ambiente una vez.

2.12. MÉTODOS GENÉTICOS

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

Para preparar células competentes de las estirpes de *E. coli* DH5 α , HB101 y GM48 se seguía el método descrito por Hanahan (1983). Las células se cultivaban con agitación a 37°C en matraces con 100 ml de medio Ψ , hasta alcanzar una A_{550nm} = 0,48. La suspensión celular se enfriaba entonces en hielo durante 10 min y las células se recogían mediante centrifugación y se resuspendían en 30 ml de TjBI (RbCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, acetato potásico 30 mM, CaCl₂ 10 mM, glicerol 15% [v/v]) (pH 5,8) frío, esterilizado mediante filtración. Tras una nueva centrifugación, las células se resuspendían en 4 ml de TjBII (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glicerol 15% [v/v]) (pH 7,0) frío, esterilizado mediante filtración, y se guardaban a -80°C distribuidas en alícuotas de 100 µl.

Para preparar células competentes de la estirpe de *E. coli* SURE se empleaba una modificación del método anterior. Las células se cultivaban en medio SOB hasta alcanzar una A_{550nm} = 0,6. Después de recoger el cultivo mediante centrifugación, las células se resuspendían en 8 ml de FSB, añadiéndose a continuación 280 µl de DMSO. Tras una incubación en hielo durante 5 min, se añadían otros 280 µl de DMSO, se volvía a incubar 5 min en hielo y las células se distribuían en alícuotas de 100 µl que se guardaban a -80°C. El FSB consiste en acetato potásico 10 mM (pH 7,5), glicerol 10% (v/v), KCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 45 mM y CaCl₂·2H₂O 10 mM; el pH se ajustaba a 6,4

con HCl y la disolución se esterilizaba mediante filtración.

La transformación se llevaba a cabo mezclando 10 μl de la preparación del DNA transformante con las células competentes contenidas en una alícuota descongelada en hielo. Tras 15 min de incubación en hielo, la mezcla se sometía a un choque térmico, mediante incubación a 42°C durante 2 min, y se incubaba a temperatura ambiente durante 7 min. Finalmente, se añadía 1 ml de medio LB y se incubaba 1 hora en condiciones de cultivo, tras lo cual las células se sembraban en cajas de medio sólido con el antibiótico adecuado para la selección de los transformantes. Cuando se utilizaban plásmidos que permitían la identificación de clones con inserto gracias a la inactivación por inserción del gen *lacZ*, el medio se suplementaba con IPTG 0,2 mM y X-gal 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Las colonias que habían recibido plásmidos con inserto eran de color blanco, mientras que las que habían recibido plásmidos sin inserto eran de color azul.

2.12.2. Transferencia de DNA a *Synechocystis* sp. mediante transformación

La introducción de DNA en *Synechocystis* sp. se realizaba siguiendo el método descrito por Chauvat *et al.* (1986), con algunas modificaciones. Las células se cultivaban en matraces conteniendo 50 ml de medio BG11 hasta alcanzar una $A_{580\text{nm}} = 1-1,5$; entonces se recogían y se lavaban tres veces con medio BG11 y finalmente se resuspendían en 2 ml del mismo medio. A continuación se mezclaban, en un tubo de paredes transparentes, 200 μl de suspensión celular con 10 μl de DNA resuspendido en T1/10E (pH 8,0). La mezcla se incubaba durante 1 hora a 30°C con luz y sin agitación, tras lo cual se sembraba sobre un filtro de nitrocelulosa (Nucleopore, REC-85) dispuesto en una caja de medio sólido BG11. Tras 24 horas de incubación en condiciones de cultivo, el filtro se transfería a una caja de medio BG11 conteniendo 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Km o 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Cm, según la resistencia a antibiótico aportada por el DNA transferido. Las colonias resistentes, aparecidas tras 8-10 días de incubación, se resembraban en medio selectivo.

2.12.3. Transferencia de DNA a *Anabaena* sp. mediante conjugación

La transferencia de DNA a *Anabaena* sp. se realizaba, según se describe en Elhai y Wolk (1988b), mediante conjugación con una estirpe de *E. coli* que contenía el plásmido a transferir además de los plásmidos pRL528 y pRL591-W45 (ver Tabla 3). El plásmido pRL528 contiene genes de metilasas de los sitios de restricción *Ava*I y *Ava*II (Elhai y Wolk, 1988b) y el plásmido pRL591-W45 el gen de una metilasa de los sitios *Ava*III (Elhai *et al.*, 1994). Las metilaciones catalizadas por estas metilasas protegen al plásmido a transferir frente a las endonucleasas de restricción de la cianobacteria receptora. Los plásmidos eran movilizados mediante el plásmido conjugativo pRL443 (Elhai y Wolk, 1988b) aportado por una segunda estirpe de *E. coli*.

La conjugación se realizaba según el siguiente procedimiento: alícuotas de 0,25 ml de cultivos en fase estacionaria de *E. coli* ED8654 (pRL443) y *E. coli* HB101 (pCSX, pRL528, pRL591-W45), donde pCSX era el plásmido a transferir (pCSX60 o pCSX62), se utilizaban para inocular nuevos cultivos de 10 ml de medio LB suplementado con los antibióticos adecuados. Después de incubar a 37°C con agitación durante 2,5 h, las células se recogían mediante centrifugación, se lavaban con LB, se resuspendían, mezclando las dos estirpes, en 200-300 µl de LB y se incubaban a temperatura ambiente sin agitación durante 2 h. A continuación se mezclaban con una suspensión celular de *Anabaena* sp. que contenía 10 µg de Chl (en un volumen de 200-300 µl), y la mezcla tripartita se extendía sobre un filtro de nitrocelulosa (Nucleopore, REC-85) dispuesto en una caja de medio sólido BG11 suplementado con LB al 5% (v/v). Las cajas se incubaban a 30°C con baja intensidad de luz durante 6 h y posteriormente en condiciones normales de cultivo durante 18 h. A continuación los filtros se transferían a cajas con medio BG11, que se incubaban 24 h en condiciones de cultivo, tras lo cual se pasaban a medio selectivo. El medio selectivo empleado era BG11 suplementado con una mezcla de Sp y Sm (2 µg·ml⁻¹ de cada antibiótico). Las colonias resistentes aparecían tras 10-15 días de incubación. Para la selección de estirpes de *Anabaena* sp. que hubieran incorporado el DNA transferido mediante doble recombinación con su propio genomio se utilizaba pRL278 (ver Tabla 3) como vector de los plásmidos pCSX60 y pCSX62. El vector pRL278 es incapaz de replicarse en *Anabaena* sp. y porta el gen *sacB* que confiere sensibilidad a la sacarosa (Cai y Wolk, 1990). Para seleccionar dobles recombinantes se preparaban cultivos líquidos de varios de los exconjugantes obtenidos, los cuales se sometían a ultrasonidos en un baño sonicador para obtener filamentos cortos (3-4 células por filamento), sembrándose después varias diluciones de las suspensiones celulares en cajas de medio BG11 suplementado con Sp y Sm (5 µg·ml⁻¹ de cada antibiótico) y sacarosa al 5% (p/v). Para comprobar que las colonias resistentes a la sacarosa eran realmente dobles recombinantes y no tenían el plásmido transferido integrado en su genomio (como consecuencia de una recombinación simple) se ensayaba la capacidad de crecimiento de las colonias en medio con Nm (30 µg·ml⁻¹), antibiótico al cual confiere resistencia el vector pRL278.

2.13. ANÁLISIS INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE DNA Y PROTEÍNAS

Para la búsqueda de pautas abiertas de lectura, localización de sitios de restricción y traducción de secuencias nucleotídicas a secuencias de aminoácidos, así como para la determinación de perfiles de hidrofobicidad de proteínas, se utilizó el programa DNA-Strider diseñado por C. Mark (Service de Biochimie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, Francia). Para el diseño de los oligonucleótidos a utilizar como cebadores en reacciones de PCR se empleó el programa Amplify diseñado por B. Engels

(Genetics Department, University of Wisconsin, EE.UU.).

La conexión con el Centro Informático Científico de Andalucía (CICA) permitió la utilización del paquete informático del Genetics Computer Group (GCG) de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984). La búsqueda en las bases de datos de secuencias similares a las analizadas en este trabajo se realizó mediante las aplicaciones FASTA (Pearson y Lipman, 1988) y BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS DE DIVERSAS CIANOBACTERIAS

Se determinó y caracterizó la capacidad de incorporación de aminoácidos en varias estirpes de cianobacterias pertenecientes a distintos grupos taxonómicos, llevándose a cabo un estudio más detallado en *Anabaena* sp. PCC 7120.

3.1.1. Transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120

Para determinar la actividad de transporte en células de *Anabaena* sp. PCC 7120, se realizaron ensayos de incorporación de los aminoácidos marcados radiactivamente indicados en la Figura 2. Cuando los aminoácidos se suministraron a una concentración 10 μM , las actividades de transporte mostraron una dependencia lineal con respecto al tiempo al menos durante los 10-15 primeros minutos de ensayo (Fig. 2).

Con objeto de establecer si las actividades de transporte de aminoácidos encontradas se regulaban en función de la fuente de nitrógeno utilizada para el crecimiento, se determinó la incorporación de aminoácidos en células que habían sido cultivadas con NaNO_3 17,6 mM, NH_4Cl 2,5 mM o nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno. Como puede observarse en la Tabla 4, las actividades fueron similares en todos los casos, independientemente de la fuente de nitrógeno empleada para el crecimiento.

Para estudiar las características cinéticas del transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120, se determinó el efecto de la concentración de sustrato sobre la tasa de transporte de los aminoácidos estudiados. En estos ensayos se utilizaron células que habían sido cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno, y se emplearon tiempos cortos (1 min) con objeto de minimizar los efectos de la variación de la concentración de sustrato que es inherente al propio proceso de transporte. Aunque las características cinéticas del transporte de Arg y Lys (Herrero y Flores, 1990), Glu y Gln (Flores y Muro-Pastor, 1988) y Phe (Xu y McAuley, 1990) de esta estirpe se habían descrito previamente, los aminoácidos Glu, Gln y Phe se incluyeron también en este estudio. En todos los casos se encontró una cinética de saturación, con un único componente cinético. La K_S para el transporte de la mayoría de los aminoácidos (Tabla 5) se incluía dentro del intervalo 12-44 μM , siendo menor (2-6,8 μM) en el caso de los aminoácidos Orn, Ala y Gly. Con fines comparativos se recogen también en la Tabla 5 los datos referentes al transporte de Arg (K_S 1,7 μM) y Lys (K_S 1,9 μM) (Herrero y Flores, 1990). Los valores de K_S para el transporte de los aminoácidos ácidos Asp y Glu fueron notablemente mayores, 132 y 465 μM , respectivamente. Las velocidades máximas para el transporte de los diferentes aminoácidos mostraron valores parecidos, estando en todos los casos dentro del intervalo 10-67 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl.

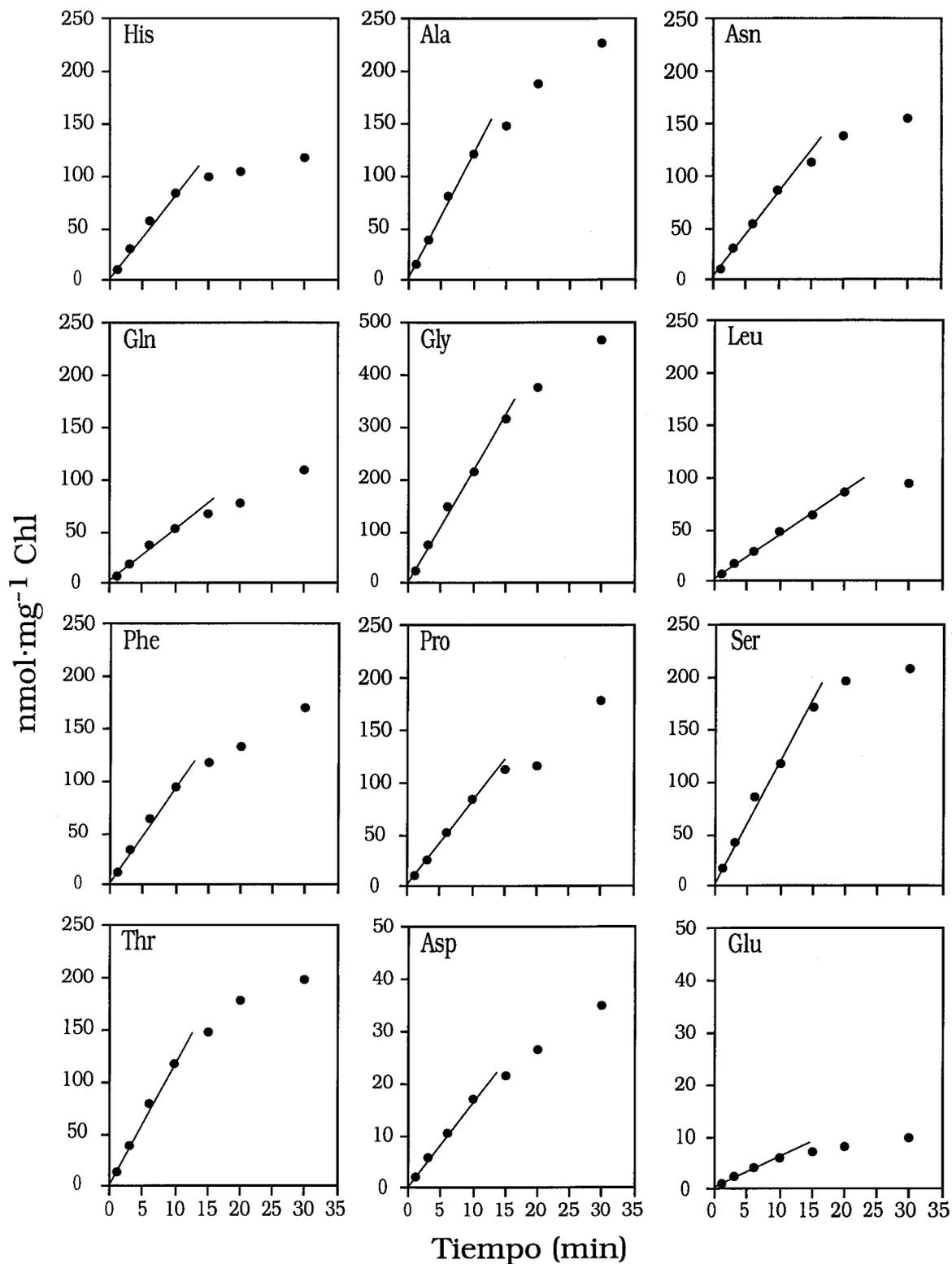


Figura 2. Dependencia de la actividad de transporte de aminoácidos con respecto al tiempo en *Anabaena* sp. PCC 7120.

Células de la estirpe PCC 7120 cultivadas en medio BG11 se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados como se describe en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se determinó la cantidad de aminoácido radiactivo incorporada. Nótese el cambio de escala del eje de ordenadas en los casos de la Gly, el Asp y el Glu.

Tabla 4. Actividades de transporte de aminoácidos de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas con distintas fuentes de nitrógeno.

Células cultivadas en medio BG11 (nitrato 17,6 mM), BG11₀ con amonio (2,5 mM) o BG11₀ (carente de nitrógeno combinado) se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados como se describe en Materiales y Métodos.

Aminoácido sustrato ^a	Actividad de transporte (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ Chl)		
	Fuente de nitrógeno:		
	NO ₃ ⁻	N ₂	NH ₄ ⁺
<i>Básicos</i>			
Arg	4,84	6,06	5,38
His	5,04	4,66	6,31
Lys	6,23	5,47	7,27
<i>Neutros</i>			
Ala	7,94	4,52	7,00
Asn	3,49	3,21	4,14
Gln	2,18	2,93	3,38
Gly	10,52	6,94	5,34
Leu	3,67	3,95	4,02
Phe	5,40	4,07	4,24
Pro	7,24	5,82	5,14
Ser	10,85	7,90	8,69
<i>Ácidos</i>			
Asp	0,85	0,74	1,06
Glu	0,37	0,34	0,55

^a Se indica el carácter básico, neutro o ácido de los diferentes aminoácidos utilizados como sustrato.

Para determinar si el transporte de aminoácidos era de tipo concentrativo, es decir, si permitía la acumulación intracelular del sustrato en contra de un gradiente de concentración, se realizaron ensayos de transporte tras los cuales se determinó el nivel intracelular del aminoácido. En todos los casos el transporte resultó ser concentrativo (Tabla 5). Los valores indicados en la Tabla 5 representan una estimación mínima de la acumulación intracelular, debido a que no se tuvieron en cuenta los niveles intracelulares de los aminoácidos sin marcar que estarían presentes en las células antes de los ensayos de transporte. En los casos del Asp y el Glu es preciso, sin embargo, corregir los valores, por tratarse de dos aminoácidos muy abundantes en las células (concentraciones intracelulares determinadas mediante HPLC de 0,3 y 15 mM, respectivamente).

Se estudiaron las actividades de transporte de diversos aminoácidos en células tratadas con DCCD (un inhibidor de la F₀-F₁ ATPasa) o CCCP (un protonóforo). Los resultados obtenidos en ambos casos (Tabla 5) fueron similares, consiguiéndose una notable inhibición del transporte de los aminoácidos estudiados, excepto de Asp y Glu. Estos datos indican un requerimiento de energía metabólica para el transporte

concentrativo de los aminoácidos neutros, como ocurre en el caso del aminoácido básico Arg (Herrero y Flores, 1990; Tabla 5). Sin embargo, dicho requerimiento no queda claro para el transporte de aminoácidos ácidos, que sólo se vió moderadamente inhibido a pesar de ser de tipo concentrativo como se indicó anteriormente.

Tabla 5. Características de las actividades de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Aminoácido sustrato	K_S^a (μM)	V_{max}^a ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl)	Acumulación intracelular ^b	Inhibición por DCCD (%) ^c	Inhibición por CCCP (%) ^c
<i>Básicos</i>					
Arg ^d	1,7	10	200	99	85
His	43	44	40	N.D. ^e	N.D.
Lys ^d	1,9	10	N.D.	N.D.	N.D.
Orn	5,9	16	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Neutros</i>					
Ala	6,8	34	52	85	79
Asn	17	16	42	95	91
Gln	38	30	17	79	71
Gly	2,0	31	128	83	82
Leu	39	67	22	61	55
Met	27	11	N.D.	N.D.	N.D.
Phe	44	42	45	79	77
Pro	20	35	20	95	88
Ser	12	35	107	84	82
Thr	32	56	63	N.D.	N.D.
<i>Ácidos</i>					
Asp	132	26	5 (35)	19	24
Glu	465	37	3 (1500)	30	30

^a Se llevaron a cabo ensayos de transporte de 1 min de duración con los aminoácidos indicados suministrados a distintas concentraciones (véase Materiales y Métodos). Los valores presentados son la media de dos o tres determinaciones independientes con similares resultados; estos valores se dedujeron de las correspondientes representaciones de Lineweaver-Burk.

^b Se determinó el cociente entre las concentraciones intracelular y extracelular del aminoácido estudiado tras llevar a cabo ensayos de transporte de 11 min de duración en los que dicho aminoácido se suministraba a concentración 10 μM (10 min y 2 μM en el caso de la Arg [Herrero y Flores, 1990]). Para determinar la concentración intracelular, muestras de los extractos obtenidos al hervir las células que se habían sometido a los ensayos de transporte se analizaron mediante TLC bidimensional y autorradiografía, cuantificándose la radiactividad correspondiente al aminoácido estudiado. Los valores entre paréntesis se refieren al gradiente de concentración que se obtuvo cuando se consideró el nivel intracelular del aminoácido no marcado presente en las células.

^c Las células se trataron con DCCD 50 μM o CCCP 25 μM durante 15 min (5 min en el caso de la Arg), a 30°C con iluminación, antes de someterse a los ensayos de transporte.

^d Datos tomados de Herrero y Flores, 1990.

^e N.D., no determinado.

Con objeto de determinar la especificidad del(los) posible(s) sistema(s) de transporte de aminoácidos neutros, se analizó el efecto de una serie de aminoácidos, incluyendo aminoácidos básicos, neutros y ácidos, sobre el transporte de Asn, Leu, Met y Thr (Tabla 6). El transporte de estos aminoácidos se vió en general notablemente

inhibido por la presencia de otros aminoácidos neutros en los ensayos correspondientes. Sin embargo, la adición de aminoácidos básicos o ácidos produjo una inhibición mucho menor. Es preciso aclarar que el aminoácido His, a pesar de ser considerado como un aminoácido básico, se comporta en parte como un aminoácido neutro al pH al que se realizaron los ensayos de transporte (pH 8,1), debido a que el pK_a de su cadena lateral es de 6,00. Esto podría explicar su efecto inhibitorio sobre el transporte de aminoácidos neutros (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de diversos aminoácidos sobre el transporte de Asn, Leu, Met y Thr en *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se llevaron a cabo ensayos de transporte en los que el aminoácido marcado radiactivamente (Asn, Leu, Met o Thr) se suministró a concentración 10 μ M y el aminoácido competidor no marcado a concentración 500 μ M. Los valores presentados en el caso de la Asn y la Leu son la media de dos determinaciones independientes con resultados similares; sólo se realizó una determinación en el caso de la Met y la Thr.

Aminoácido competidor	Inhibición (%) del transporte de:			
	Asn	Leu	Met	Thr
<i>Básicos</i>				
Arg	35	10	2	9
His	94	60	62	87
Lys	39	16	5	33
Orn	59	26	17	48
<i>Neutros</i>				
Ala	84	92	86	98
Asn	-	42	43	70
Citrulina	78	32	28	57
Cys	97	86	89	98
Gln	96	69	68	90
Gly	79	86	80	97
Ile	66	86	61	96
Leu	68	-	72	97
Met	91	94	-	98
Phe	66	90	59	95
Pro	67	50	29	74
Ser	92	82	85	96
Thr	74	77	72	-
Trp	68	68	52	87
Tyr	67	72	48	88
Val	68	88	66	96
<i>Ácidos</i>				
Asp	8	9	1	2
Glu	26	14	1	10

Finalmente, se estudió el destino metabólico de los aminoácidos incorporados a las células. Para ello se analizaron, mediante TLC y autorradiografía, los metabolitos intracelulares marcados radiactivamente que se generaban tras los ensayos de transporte. En la mayoría de los casos, los aminoácidos proporcionados a una concentración 10 μ M no habían sufrido una metabolización notable tras un período de transporte de 11 min (Tabla 7).

Tabla 7. Destino metabólico de los aminoácidos suministrados en los ensayos de transporte en *Anabaena* sp. PCC 7120.

Tras 11 min de transporte de los aminoácidos indicados (10 min en el caso de la Arg), suministrados a concentración 10 μ M (4,7 μ M en el caso de la Arg), se tomaron y filtraron muestras para obtener extractos celulares que se analizaron mediante TLC bidimensional y autorradiografía. Los compuestos marcados presentes en los extractos se identificaron mediante co-cromatografía y se cuantificaron (véase Materiales y Métodos). "MNI" indica un metabolito no identificado. El metabolito no identificado observado en los ensayos con Gln y Pro podría ser el mismo. El nivel intracelular relativo de cada metabolito se expresa como porcentaje del total de la radiactividad presente en los extractos en forma de metabolitos marcados.

Aminoácido sustrato	Productos metabólicos	Nivel intracelular relativo (%)
Arg	Arg	61
	Citrulina	9
	Orn	1
	Glu	13
	Pro	16
His	His	90
	MNI	10
Lys	Lys	100
Ala	Ala	>99
	5 metabolitos minoritarios no identificados	
Asn	Asn	79
	Asp	21
Gln	Gln	38
	Glu	54
	MNI	8
Gly	Gly	92
	Ser	8
Leu	Leu	83
	MNI	17
Phe	Phe	89
	MNI	11
Pro	Pro	35
	Gln	14
	Glu	47
	MNI	4
Ser	Ser	88
	Gly	10
	MNI	2
Thr	Thr	100
Asp	Asp	63
	MNI	22
	5 metabolitos minoritarios no identificados	15
Glu	Glu	91
	MNI	9

Sin embargo, se observó que una alta proporción de la radiactividad suministrada como Pro o como Gln se encontraba como Glu. Cuando las células empleadas para el ensayo de transporte de Gln se habían incubado previamente, durante 45 minutos a 30°C y a la luz, con azaserina 0,1 mM (que se retiraba mediante filtración y lavado de las células antes del ensayo de transporte), la conversión de Gln a Glu se vio inhibida en un 66%. La azaserina es un inhibidor de la glutamato sintasa (GOGAT) y otras glutamina-amido transferasas, por lo que se puede deducir que la notable metabolización sufrida por el aminoácido Gln tras su transporte al interior celular estaba catalizada por este tipo de enzimas más que por glutaminasas. Otros dos aminoácidos catabolizados a un nivel destacable eran la Arg y el Asp.

3.1.2. Transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601, *Fischerella muscicola* UTEX 1829, *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803

Para obtener una visión general del fenómeno de transporte de aminoácidos en cianobacterias, se determinó la capacidad de incorporación de aminoácidos básicos, neutros y ácidos en otras ocho estirpes de cianobacterias, pertenecientes a distintos grupos taxonómicos.

Las estirpes filamentosas formadoras de heterocistos estudiadas fueron *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601 (pertenecientes a la Sección IV) y *Fischerella muscicola* UTEX 1829 (Sección V); *Calothrix* sp. PCC 7601 es un mutante espontáneo incapaz de desarrollar heterocistos funcionales. También se estudió la estirpe filamentosa no formadora de heterocistos *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 (perteneciente a la Sección III); esta estirpe está filogenéticamente muy separada del resto de las cianobacterias utilizadas en este trabajo (Giovannoni *et al.*, 1988). Finalmente, las estirpes unicelulares estudiadas fueron *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ambas pertenecientes a la Sección I), aunque en esta última cianobacteria el transporte de aminoácidos ya había sido estudiado previamente (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990).

En la Tabla 8 se muestran las actividades de transporte de aminoácidos de estas estirpes, medidas en ensayos de 10 min (ó 1 min cuando se indica), utilizando el aminoácido sustrato a concentración 10 µM.



Tabla 8. Actividades de transporte de aminoácidos de distintas estirpes de cianobacterias.

Células de las estirpes indicadas cultivadas en medio BG11 se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos especificados suministrados a concentración 10 μM ; el tiempo de duración de los ensayos fue 10 min excepto en el caso de la estirpe PCC 6803 con los aminoácidos Arg y Glu, 1 min. Los valores presentados son la media de los obtenidos en 2-6 ensayos independientes (5 a 17 determinaciones en el caso de la estirpe PCC 7120, que se incluye nuevamente aquí a efectos comparativos).

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl en 10 min)								
	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7937	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7413	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7107	<i>Calothrix</i> sp. PCC 7601	<i>Fischerella</i> <i>muscicola</i> UTEX 1829	<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<i>Básicos</i>									
Arg	103,0	59,0	535,7	58,4	79,2	6,3	28,6	0,3	3126
His	74,1	90,8	147,5	65,9	110,1	20,7	90,2	24,3	63,9
Lys	115,0	69,6	73,4	59,6	119,7	14,8	53,5	0,8	457,3
<i>Neutros</i>									
Ala	119,3	119,0	280,4	86,6	191,9	44,3	196,6	29,9	101,0
Asn	86,6	45,1	122,1	31,8	80,8	12,9	62,6	4,3	10,5
Gln	73,1	52,0	137,5	34,3	76,7	18,4	106,6	13,4	51,6
Gly	175,7	113,5	208,0	73,4	182,1	48,7	220,7	6,7	102,8
Leu	71,0	60,3	155,4	60,0	79,3	26,7	135,7	41,7	79,4
Phe	72,6	73,0	176,1	53,8	100,5	33,7	137,7	41,8	54,4
Pro	94,3	89,5	282,7	69,3	117,4	23,0	192,7	0,7	70,2
Ser	129,4	84,1	258,4	79,3	203,6	34,9	186,8	8,9	69,3
<i>Ácidos</i>									
Asp	18,3	21,9	25,6	4,3	11,2	8,4	286,0	7,1	2,6
Glu	6,9	11,4	12,2	6,1	5,8	3,2	136,2	11,2	568,3

Entre las estirpes estudiadas de la Sección taxonómica IV, *Anabaena* sp. PCC 7937 y *Calothrix* sp. PCC 7601 mostraron actividades de transporte de aminoácidos muy similares a las presentadas por *Anabaena* sp. PCC 7120, con valores entre 0,52 y 1,6 veces los mostrados por la estirpe PCC 7120.

En el caso de *Nostoc* sp. PCC 7413 las actividades de transporte observadas fueron ligeramente superiores (entre 1,2 y 3 veces) a las de la estirpe PCC 7120 para la mayoría de los aminoácidos. Es preciso, sin embargo, destacar la notable actividad de transporte de Arg presentada por la estirpe PCC 7413, que fue 5,2 veces superior a la mostrada por *Anabaena* sp. PCC 7120. Se determinaron los parámetros cinéticos para el transporte de la Arg en la estirpe PCC 7413, obteniéndose una K_S de 3,3 μM y una V_{max} de 124 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl (Fig. 3).

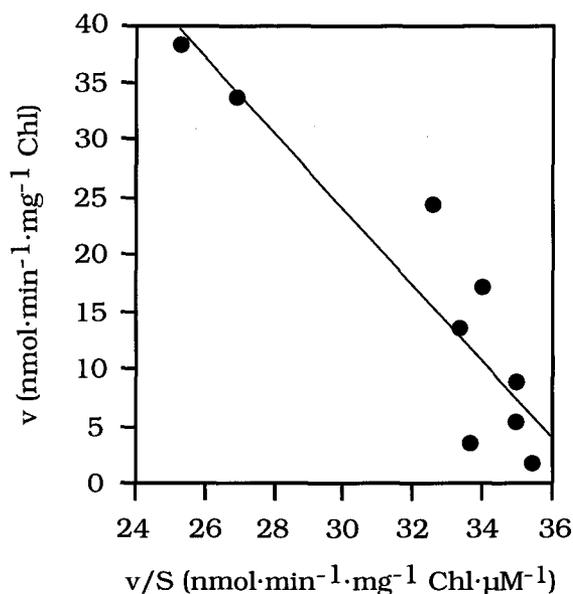


Figura 3. Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Arg sobre la tasa de transporte de Arg en *Nostoc* sp. PCC 7413.

Se llevaron a cabo ensayos de transporte de 1 min de duración en presencia de distintas concentraciones (0,05-400 μM) de Arg marcada radiactivamente. v, velocidad de transporte de Arg; S, concentración de Arg.

Las actividades de transporte de aminoácidos exhibidas por *Nostoc* sp. PCC 7107 fueron ligeramente menores, entre 0,23 y 0,89 veces, que las de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Con respecto a *Fischerella muscicola* UTEX 1829, las actividades de transporte de aminoácidos neutros observadas fueron, por término medio, de 0,3 veces los mostrados por *Anabaena* sp. PCC 7120, siendo de unas 0,5 veces los correspondientes a los aminoácidos ácidos. Por otra parte, esta estirpe mostró una capacidad de transporte de aminoácidos básicos muy limitada, que en el caso de la Arg era de 0,06 veces la actividad encontrada en la estirpe PCC 7120, y en el caso de la Lys de 0,13 veces.

En *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 las actividades de transporte de aminoácidos neutros observadas fueron algo mayores (1,5 veces por término medio) que las de la estirpe PCC 7120, mientras que en el caso de la Arg y la Lys las actividades fueron menores (0,28 y 0,47 veces, respectivamente). Sin embargo, la estirpe PCC 6903 mostró una notable actividad de transporte de aminoácidos ácidos. La determinación de los parámetros cinéticos para el transporte del Asp puso de manifiesto la existencia de dos componentes (Fig. 4), uno de alta afinidad (K_S aparente de $1,1 \mu\text{M}$) y otro de baja afinidad (K_S aparente de $116 \mu\text{M}$). La V_{max} del componente de alta afinidad resultó ser de $32,4 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ Chl}$ y la del componente de baja afinidad de $46,2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ Chl}$ (tras la sustracción de la velocidad del componente de alta afinidad).

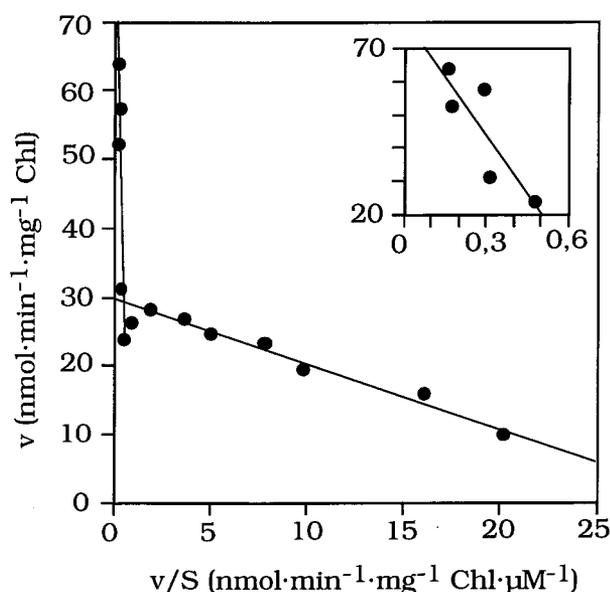


Figura 4. Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Asp sobre la tasa de transporte de Asp en *Pseudanabaena* sp. PCC 6903.

Se llevaron a cabo ensayos de transporte de 1 min de duración en los que se suministró Asp marcado radiactivamente a distintas concentraciones ($0,5\text{-}400 \mu\text{M}$). En la esquina superior derecha se muestra una ampliación de la zona de la gráfica comprendida entre 0 y $0,6 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1} \text{ Chl}\cdot\mu\text{M}^{-1}$. v, velocidad de transporte de Asp; S, concentración de Asp.

En *Synechococcus* sp. PCC 7942 las actividades de transporte de Arg y Lys observadas fueron extremadamente bajas, mientras que las actividades de transporte de Asp y Glu fueron parecidas a las mostradas por las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos incluidas en este estudio. Por otra parte, las actividades de transporte de los aminoácidos neutros no polares (Ala, Leu, Phe) fueron más elevadas que las de los aminoácidos neutros polares (Tabla 8).

Los resultados obtenidos en el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803 son consistentes con los descritos previamente (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990). Las actividades de transporte de His y aminoácidos neutros en la estirpe PCC 6803 fueron similares a las de otras cianobacterias, mientras que las actividades de transporte de Arg, Lys y Glu fueron más elevadas. Los parámetros cinéticos para el transporte de Arg y Lys habían sido establecidos anteriormente (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990), pero no los del transporte de Glu. En este último caso se encontró un único componente cinético (Fig. 5) con una K_S de 49 μM y una V_{max} de 529 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl.

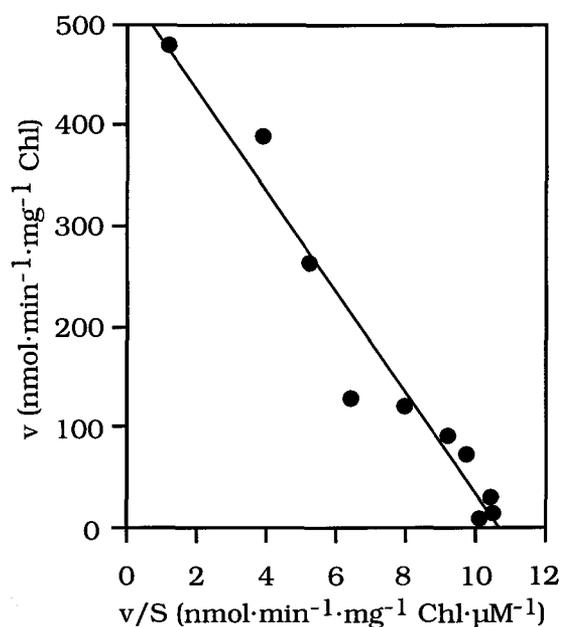


Figura 5. Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Glu sobre la tasa de transporte de Glu en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se llevaron a cabo ensayos de transporte de 1 min de duración en los que se suministró Glu marcado radiactivamente a distintas concentraciones (0,25-400 μM). v, velocidad de transporte de Glu; S, concentración de Glu.

3.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS DE DIVERSAS CIANOBACTERIAS

Una vez establecidas las actividades de transporte de aminoácidos de las diferentes cianobacterias estudiadas, se procedió al aislamiento de mutantes, con objeto de definir los sistemas de transporte responsables de dichas actividades, así como las especificidades de los mismos. La estrategia empleada para ello fue la selección de mutantes espontáneos resistentes a diversos análogos tóxicos de aminoácidos (Tabla 9).

La resistencia al análogo en cuestión podría deberse a una mutación en el sistema de transporte responsable de la entrada del análogo al interior celular que,

presumiblemente, sería también la vía de entrada en la célula del aminoácido correspondiente. Otra posibilidad que podría explicar el fenotipo de resistencia sería una mutación en una enzima de la ruta de biosíntesis del aminoácido que provocara la superproducción del mismo. De este modo, un mayor nivel intracelular del aminoácido podría inhibir la entrada del análogo tóxico a las células o paliar los efectos tóxicos del mismo una vez que éste estuviera en el interior celular.

La aplicación de diferentes acercamientos experimentales ha permitido distinguir entre estas posibilidades.

Tabla 9. Mutantes de diversas estirpes de cianobacterias resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos.

Las estirpes mutantes se aislaron como resistentes a los análogos que se especifican, a las concentraciones indicadas, como se describe en Materiales y Métodos.

Estirpe mutante	Aislada como resistente a:	Estirpe parental
CS326 ^a	canavanina 100 µM	PCC 7120
CS327 ^a	canavanina 100 µM	PCC 7120
CS343	azaleucina 100 µM	PCC 7120
CS389	MSX 50 µM	CS343
CS349	azaserina 20 µM	CS343
CS460	hidroxilisina 200 µM	CS343
CS458	hidroxilisina 40 µM	CS389
CS459	azaserina 100 µM	CS389
CS341	etionina 100 µM	PCC 7120
CS342	etionina 100 µM	PCC 7120
CS440	azaleucina 100 µM	PCC 7937
CS454	hidroxilisina 150 µM	CS440
CS447	MSX 100 µM	CS440
CS453	hidroxilisina 100 µM	CS447
CS441	azaleucina 100 µM	PCC 7413
CS456	MSX 10 µM	CS441
CS442	azaleucina 100 µM	PCC 7107
CS457	hidroxilisina 25 µM	CS442
CS451	azaleucina 50 µM	PCC 7601
CS448	azaleucina 100 µM	PCC 6903
CS446	MSX 20 µM	PCC 6903

^a Herrero y Flores, 1990.

3.2.1. Mutantes de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7120

Utilizando *Anabaena* sp. PCC 7120 como estirpe parental, se aislaron clones resistentes a la azaleucina, un análogo tóxico de la Leu, con una frecuencia de $1,7 \times 10^{-6}$ por célula. Un representante de este tipo de mutantes es la estirpe CS343 (Tabla 9). No se obtuvo, sin embargo, ningún resistente al MSX (análogo de los aminoácidos Met y Glu) o a la azaserina (un análogo de la Gln), habiéndose sembrado 2×10^8 y 4×10^8 células, respectivamente. Sin embargo, cuando se utilizó la estirpe CS343 como parental, se pudieron obtener mutantes resistentes al MSX (estirpe CS389, Tabla 9) o a la azaserina

(estirpe CS349, Tabla 9) con una frecuencia de $8,6 \times 10^{-7}$ y $1,4 \times 10^{-6}$ por célula, respectivamente.

En la Tabla 10 se muestran las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CS343, CS389 y CS349, así como las de los mutantes CS326 y CS327 que habían sido aislados previamente en nuestro grupo como resistentes a la canavanina (un análogo de la Arg) y caracterizados con respecto a sus actividades de transporte de Arg y Lys (Herrero y Flores, 1990). También se incluyen en la Tabla 10 el mutante doble CS460, aislado a partir de la estirpe CS343 como resistente a la hidroxilisina (análogo de la Lys), y los mutantes triples CS458 y CS459, aislados como resistentes a la hidroxilisina y la azaserina, respectivamente, usando como estirpe parental el doble mutante CS389 (Tabla 9).

La estirpe CS326 resultó estar fuertemente afectada no sólo en el transporte de aminoácidos básicos, como ya se había establecido (Herrero y Flores, 1990), sino también en el transporte de aminoácidos neutros y, en menor grado, ácidos.

En el caso de la estirpe CS327, la mutación afectó al transporte de aminoácidos básicos y de Asp, y en menor grado al transporte de aminoácidos neutros y Glu.

El mutante CS343 estaba alterado principalmente en el transporte de aminoácidos neutros, pero en distinta proporción para distintos aminoácidos. Concretamente, las actividades de transporte de la Pro, Phe, Gly, Leu, Thr y Ala fueron las más bajas, mientras que el transporte de otros aminoácidos neutros como la Asn, la Gln, la Met y la Ser estaba sólo parcialmente afectado. También estaba afectado el transporte del aminoácido básico Orn.

La estirpe CS389 era incapaz de transportar aminoácidos neutros (aunque presentaba un transporte apreciable de Gln), pero mantenía, al igual que su estirpe parental CS343, actividades de transporte de aminoácidos básicos similares a las de la estirpe silvestre (excepto en el caso de la Orn, cuyo transporte también estaba afectado en la estirpe parental CS343); las actividades de transporte de Asp y Glu también resultaron ser menores que las exhibidas por la estirpe parental CS343.

El mutante CS349 presentaba un fenotipo muy parecido al del mutante CS326, estando notablemente afectado en el transporte de todos los aminoácidos probados, aunque la tasa de transporte de aminoácidos ácidos era menor en la estirpe CS349 que en la CS326.

La estirpe CS460 mantenía las actividades de transporte de aminoácidos neutros y ácidos de su estirpe parental CS343, pero era incapaz de transportar Arg y Lys, y estaba parcialmente afectada en el transporte de His.

Los mutantes triples CS458 y CS459 se aislaron con objeto de obtener, por una vía diferente, mutantes que, de forma similar a las estirpes CS326 y CS349, hubieran perdido prácticamente todas las actividades de transporte de aminoácidos. De hecho,

tanto CS458 como CS459 exhibían una actividad bajísima de transporte de casi todos los aminoácidos ensayados, incluso de los aminoácidos ácidos para los que las estirpes CS326 y CS349 mostraban una actividad apreciable.

Tabla 10. Actividades de transporte de aminoácidos de diversos mutantes resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se llevaron a cabo ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μ M, durante 10 min. Los datos se presentan como porcentaje de la actividad de transporte mostrada por la estirpe silvestre PCC 7120. Los valores son la media de 3-6 determinaciones independientes en cada caso (2-3 determinaciones en los casos de las estirpes CS460, CS458 y CS459). N.D., no determinado.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (%)							
	Estirpe mutante:							
	CS326	CS327	CS343	CS389	CS349	CS460	CS458	CS459
<i>Básicos</i>								
Arg	1	2	100	100	<1	2	<1	<1
His	3	63	100	100	<1	72	1	<1
Lys	<1	4	100	100	<1	<1	<1	<1
Orn	<1	17	55	63	<1	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Neutros</i>								
Ala	1	100	23	4	1	29	1	<1
Asn	3	55	48	2	2	N.D.	N.D.	N.D.
Gln	9	71	60	21	2	86	<1	<1
Gly	<1	95	4	1	<1	5	<1	<1
Leu	1	62	8	1	2	8	<1	<1
Met	2	50	33	1	1	N.D.	N.D.	N.D.
Phe	2	76	3	2	2	2	6	1
Pro	<1	92	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Ser	1	100	30	1	<1	57	1	<1
Thr	<1	67	13	3	1	N.D.	N.D.	N.D.
<i>Ácidos</i>								
Asp	48	9	94	39	23	100	<1	1
Glu	63	58	71	19	22	100	<1	1

Para analizar la posibilidad de que el fenotipo de los mutantes obtenidos (resistencia a análogos tóxicos y disminución de las actividades de transporte de aminoácidos) se debiera a una mutación que provocase la superproducción de algún aminoácido, se determinaron los niveles intracelulares de aminoácidos de la estirpe silvestre PCC 7120 y de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS389 y CS349 cultivados en medio con nitrato. Los cromatogramas obtenidos mediante HPLC (véanse como ejemplos los de las estirpes PCC 7120 y CS343 en la Figura 6) presentaron una fracción mayoritaria correspondiente al aminoácido Glu, no observándose diferencias significativas entre la estirpe silvestre y los mutantes con respecto a los niveles intracelulares de aminoácidos.

Por otra parte, las estirpes CS341 y CS342 (Tabla 9), dos mutantes de *Anabaena* sp. PCC 7120 aislados como resistentes a la etionina (un análogo de la Met), resultaron ser mutantes superproductores de Met, Gly, Ser, Thr e Ile. Estos mutantes mostraron

niveles intracelulares de dichos aminoácidos 50-100 veces superiores a los de la estirpe silvestre (Tabla 11), aunque esta acumulación intracelular no se vió acompañada de una liberación de aminoácidos al medio de cultivo, según se determinó utilizando la reacción de la ninhidrina (datos no mostrados). A pesar de ser superproductores, los mutantes CS341 y CS342 mostraron actividades de transporte de aminoácidos similares a las de la estirpe silvestre (Tabla 12), por lo que el fenómeno de transinhibición no parece presentarse al menos en el sistema de transporte de aminoácidos neutros de *Anabaena* sp. PCC 7120.

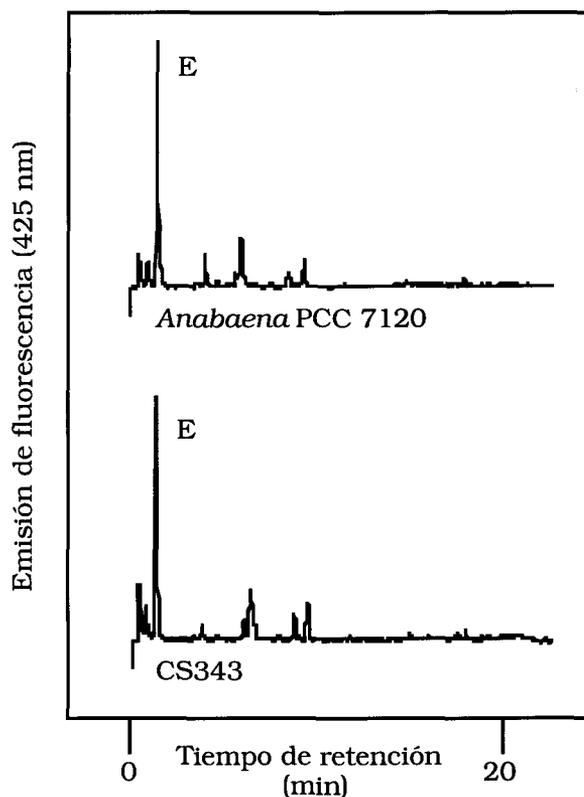


Figura 6. Cromatogramas de muestras de extractos celulares de las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7120 y CS343.

Células (una cantidad equivalente a 50 μ g de Chl) cultivadas en medio BG11 (con azaleucina en el caso de la estirpe CS343) se lavaron e hirvieron para obtener extractos celulares que se analizaron mediante HPLC (Método 1, véase Materiales y Métodos). La escala con la que se presenta la fracción correspondiente al Glu es menor que la escala de la parte basal del cromatograma, para permitir una mejor visualización de esta última. Cromatogramas similares a los mostrados se obtuvieron con extractos de las estirpes mutantes CS326, CS327, CS389 y CS349. E, Glu.

Se puede inferir, por lo tanto, que las estirpes recogidas en la Tabla 10 están realmente afectadas en las actividades de transporte de aminoácidos. En todos los casos, las mutaciones afectaron al transporte de grupos de aminoácidos y no de aminoácidos concretos, apoyando la idea, ya sugerida por los experimentos de competencia

presentados en la Tabla 6, de que los sistemas de transporte de la estirpe PCC 7120 poseen una baja especificidad de sustrato. El fenotipo de los mutantes CS343 y CS389, así como la incapacidad para obtener mutantes resistentes a azaserina o MSX a partir de la estirpe silvestre PCC 7120 pero no a partir del mutante CS343, sugería la existencia de dos vías de entrada en la célula para aminoácidos neutros, que denominaremos sistemas N-I y N-II, con especificidades solapantes aunque no idénticas. Otros mutantes, como las estirpes CS326, CS327 y CS349, apoyaban la existencia de elementos comunes entre distintos sistemas de transporte.

Tabla 11. Concentraciones intracelulares de Met, Gly, Ser, Thr e Ile en los mutantes CS341 y CS342 derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Células (una cantidad equivalente a 2,3-2,9 mg de proteína) cultivadas en medio con nitrato (sin análogos) se lavaron e hirvieron para obtener extractos celulares que se analizaron mediante HPLC para la determinación del contenido en aminoácidos de las mismas (Método 1, véase Materiales y Métodos). N.D., no detectado.

Estirpe	Concentración intracelular (mM)				
	Met	Gly	Ser	Thr	Ile
PCC 7120	N.D.	0,052	0,028	N.D.	N.D.
CS341	4,82	5,18	1,39	N.D.	N.D.
CS342	4,12	2,91	1,62	0,82	0,43

Tabla 12. Actividades de transporte de algunos aminoácidos de los mutantes CS341 y CS342 derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Células cultivadas en medio BG11 suplementado con etionina en el caso de los mutantes CS341 y CS342 se sometieron a ensayos de transporte de 30 min de duración en los que se suministraron los aminoácidos indicados a concentración 10 μ M.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (nmol·mg ⁻¹ Chl en 30 min)		
	PCC 7120	CS341	CS342
<i>Básicos</i>			
Arg	268,5	331,8	282,0
<i>Neutros</i>			
Asn	322,5	263,1	236,4
Leu	391,2	320,7	264,3
Thr	341,7	368,1	337,8
Met	223,0	210,7	244,5
<i>Ácidos</i>			
Glu	109,5	81,9	99,3

Se determinaron los parámetros cinéticos para la actividad remanente de transporte de Ala, Asn, Gln y Ser del mutante CS343. Los valores de K_S encontrados (Tabla 13) fueron similares a los mostrados por la estirpe silvestre PCC 7120 (Tabla 5), explicándose así el hecho de que se encontraran cinéticas de saturación monofásicas para el transporte de estos aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120, a pesar de la existencia en esta estirpe de dos sistemas de transporte para aminoácidos neutros.

Tabla 13. Características cinéticas del transporte de Ala, Asn, Gln y Ser en el mutante CS343 derivado de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Células cultivadas en medio BG11 suplementado con azaleucina se utilizaron en ensayos, de 1 min de duración, de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a distintas concentraciones comprendidas entre 5 y 400 μM . Los valores presentados son la media de dos determinaciones independientes con resultados similares; estos valores se dedujeron a partir de las correspondientes representaciones de Lineweaver-Burk.

Aminoácido	K_S (μM)	V_{max} ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ Chl}$)
Ala	22	11,4
Asn	9	6,1
Gln	35	19,0
Ser	12	12,5

3.2.2. Mutantes de transporte de aminoácidos de *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601 y *Pseudanabaena* sp. PCC 6903

Utilizando *Anabaena* sp. PCC 7937 como estirpe parental se aislaron mutantes resistentes a la azaleucina, como la estirpe CS440 (Tabla 9). Este mutante estaba notablemente afectado en el transporte de aminoácidos neutros, pero era capaz de transportar los aminoácidos ácidos, así como la Arg y la Lys, a niveles relativamente altos (Tabla 14). La actividad de transporte de aminoácidos básicos aún presente en el mutante CS440 no se manifestaba en el mutante doble CS454 (Tabla 14), aislado como resistente a la hidroxilisina a partir de la estirpe CS440 (Tabla 9). Del mismo modo, la actividad de transporte de aminoácidos ácidos todavía presente en la estirpe CS440 no se encontraba en el mutante CS447 (Tabla 14), aislado como resistente al MSX a partir del mutante CS440 (Tabla 9). Con objeto de disponer de un mutante que hubiera perdido la capacidad de transportar todos los aminoácidos estudiados, se aisló a partir de la estirpe CS447 un mutante resistente a la hidroxilisina, la estirpe CS453 (Tabla 9 y Tabla 14).

Se obtuvieron mutantes derivados de *Nostoc* sp. PCC 7413 resistentes a la azaleucina, como la estirpe CS441 (Tabla 9). Este mutante estaba afectado principalmente en el transporte de aminoácidos neutros, aunque también el transporte de aminoácidos básicos y ácidos se encontraba disminuido en el mismo (Tabla 14). A partir de la estirpe CS441 no se obtuvieron mutantes dobles resistentes a la hidroxilisina, la canavanina o la azaserina, pero sí al MSX, como la estirpe CS456 (Tabla 9), que exhibía menor actividad de transporte de los aminoácidos ácidos, His y Lys que su parental (Tabla 14).

Tabla 14. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos derivados de *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601 y *Pseudanabaena* sp. PCC 6903.

Células de las estirpes indicadas cultivadas en medio BG11 suplementado con el análogo correspondiente (véase Tabla 9) se utilizaron en ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μ M, durante 10 min. Los datos se presentan como porcentaje de la actividad de transporte mostrada por la estirpe parental correspondiente. Los valores son la media de 2-4 determinaciones independientes en cada caso.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (%)										
	Estirpe parental:										
	PCC 7937		PCC 7413		PCC 7107		PCC 7601		PCC 6903		
	Estirpe mutante:										
	CS440	CS454	CS447	CS453	CS441	CS456	CS442	CS457	CS451	CS448	CS446
<i>Básicos</i>											
Arg	81	8	81	5	65	58	128	2	40	1	2
His	50	11	38	1	28	15	89	4	21	11	3
Lys	75	1	70	<1	59	31	136	4	26	<1	<1
<i>Neutros</i>											
Ala	19	4	3	2	4	1	11	2	2	<1	<1
Asn	8	7	5	3	3	<1	5	5	2	16	7
Gln	15	15	1	2	5	1	27	33	6	9	3
Gly	9	3	11	5	1	2	7	9	<1	<1	<1
Leu	2	<1	<1	<1	<1	<1	10	9	<1	3	2
Phe	<1	2	<1	2	1	<1	6	6	<1	<1	2
Pro	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	2	<1	<1	<1
Ser	7	6	11	1	2	<1	6	7	1	1	<1
<i>Ácidos</i>											
Asp	67	67	4	3	36	8	175	202	34	47	26
Glu	71	79	3	2	29	15	92	77	40	47	51

A partir de *Nostoc* sp. PCC 7107 se obtuvieron mutantes resistentes a la azaleucina, como la estirpe CS442 (Tabla 9). Esta estirpe presentaba actividades disminuidas de transporte de aminoácidos neutros pero, curiosamente, mostraba actividades de transporte de Arg, Lys y Asp por encima de los niveles de la estirpe silvestre (Tabla 14). A partir de la estirpe CS442 se aisló un mutante resistente a la hidroxilisina, la estirpe CS457 (Tabla 9), que exhibía además una notable disminución en el transporte de aminoácidos básicos (Tabla 14).

En el caso de *Calothrix* sp. PCC 7601 sólo se obtuvieron mutantes resistentes a la azaleucina, como la estirpe CS451 (Tabla 9), pero no a otros análogos como la azaserina, el MSX o la hidroxilisina, ni siquiera al usar la estirpe CS451 como parental. Esta estirpe presentó un fenotipo similar al del mutante CS441, mostrando sobre todo una disminución en el transporte de los aminoácidos neutros, pero también en el de básicos y ácidos (Tabla 14).

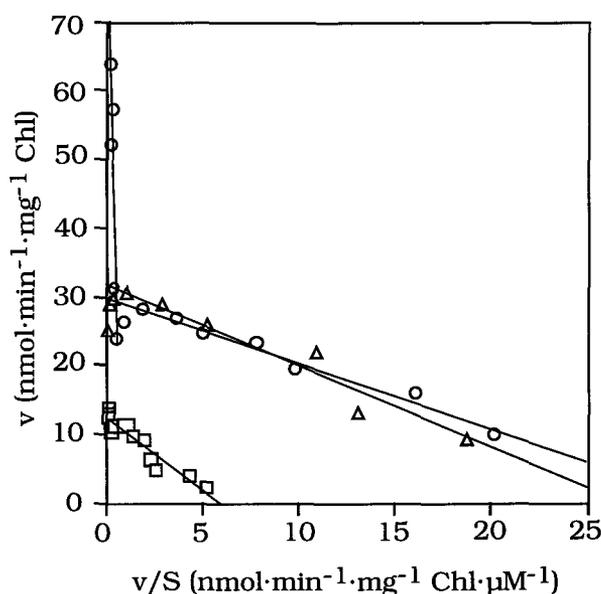


Figura 7. Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Asp sobre la tasa de transporte de Asp en los mutantes CS448 y CS446 derivados de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903.

Células de las estirpes CS448 (Δ) y CS446 (□) cultivadas en medio BG11 suplementado con azaleucina (CS448) o MSX (CS446) se utilizaron en ensayos de transporte de 1 min en los que se suministró Asp marcado radiactivamente a distintas concentraciones (0,5-400 μM). Se incluye, a efectos comparativos, la gráfica correspondiente a la estirpe silvestre PCC 6903 (O). v, velocidad de transporte de Asp; S, concentración de Asp.

A partir de *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 se aislaron mutantes resistentes a la azaleucina (estirpe CS448, Tabla 9) y al MSX (estirpe CS446, Tabla 9). Ambos mutantes mostraban el mismo fenotipo con respecto al transporte de aminoácidos, exhibiendo

actividades de transporte muy disminuidas de los aminoácidos neutros y básicos, al tiempo que las de Asp y Glu eran también menores que las de la estirpe silvestre (Tabla 14). Como se indicó anteriormente, *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 presenta dos componentes cinéticos para el transporte de Asp; los mutantes CS448 y CS446 mostraban sólo el componente de mayor afinidad (K_S de 1,3 y 1,9 μM , respectivamente) (Fig. 7), lo que sugería que en esta cianobacteria el sistema de transporte de aminoácidos neutros y básicos era también el responsable del transporte de baja afinidad de Asp (y probablemente también de Glu). También se realizaron ensayos de transporte de Asp marcado radiativamente en presencia de diversas concentraciones de Glu no marcado (Fig. 8). Cuando se utilizó una concentración de Asp de 1 μM , se obtuvo una inhibición del transporte del 84% en presencia de 100 μM de Glu, y del 99% con Glu 1 mM. Dado que la contribución del sistema de baja afinidad (K_S para el Asp 116 μM) al transporte de Asp a esta concentración (1 μM de Asp) puede despreciarse, estos resultados sugieren que el sistema de transporte de Asp de alta afinidad también es capaz de reconocer al Glu, aunque con una afinidad menor que la mostrada para el Asp.

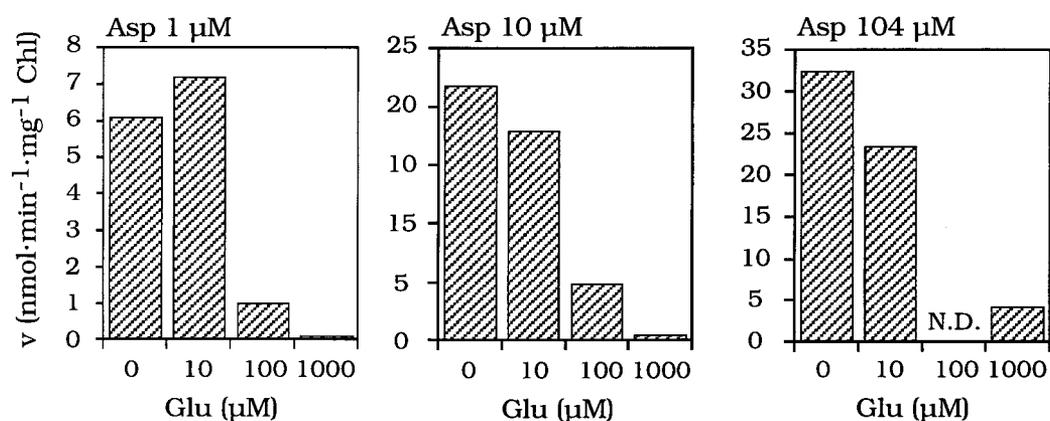


Figura 8. Efecto del Glu sobre el transporte de Asp en *Pseudanabaena* sp. PCC 6903.

Se llevaron a cabo ensayos de transporte de 1 min de duración en los que se empleó 1, 10 ó 104 μM de Asp marcado radiativamente y 0, 10, 100 ó 1000 μM de Glu no marcado. Los ensayos se realizaron de modo similar a como se describe en el apartado 2.3.3. de Materiales y Métodos. En el eje de ordenadas se expresa la velocidad de transporte de Asp. N.D., no determinado.

3.2.3. Estudio de la capacidad de crecimiento diazotrófico de algunos mutantes de cianobacterias afectados en el transporte de aminoácidos

Con objeto de investigar la posibilidad de que los sistemas de transporte de aminoácidos tengan un papel en el proceso de desarrollo del heterocisto y/o en el crecimiento diazotrófico, se realizaron curvas de crecimiento de las estirpes de cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos incluidas en este trabajo, así como de los mutantes de transporte de aminoácidos derivados de ellas, en medios que contenían como fuente de nitrógeno nitrato o nitrógeno atmosférico.

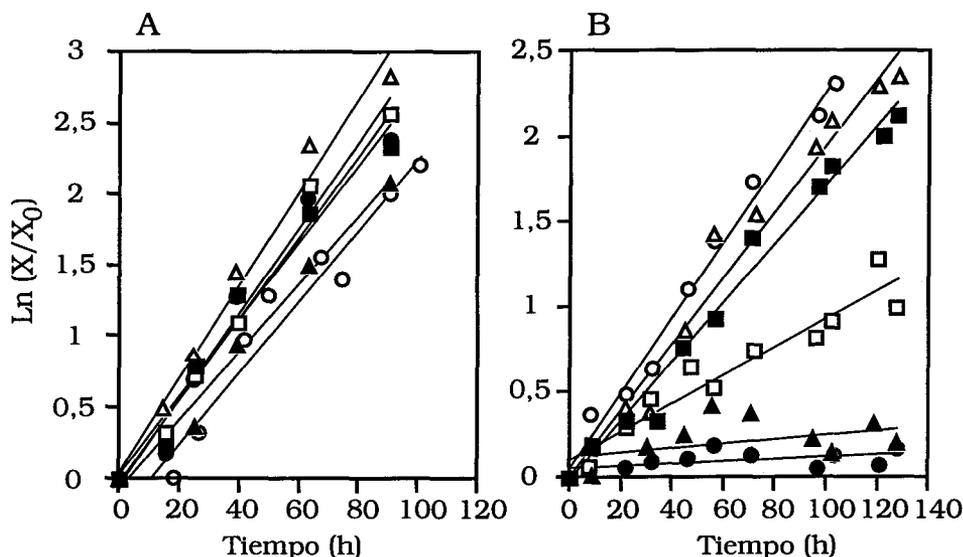


Figura 9. Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS389 y CS349 derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Células de las estirpes PCC 7120 (O), CS326 (●), CS327 (Δ), CS343 (□), CS389 (■) y CS349 (▲) cultivadas en medio BG11 (suplementado con el análogo correspondiente en el caso de los mutantes) se lavaron y resuspendieron en medio BG11 (con nitrato) (A), o BG11₀ (sin nitrógeno combinado) (B) sin análogos y se incubaron en condiciones de cultivo. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteína del cultivo. Las tasas de crecimiento de las estirpes en medio BG11₀ fueron: 0,53 (PCC 7120), 0,014 (CS326), 0,47 (CS327), 0,20 (CS343), 0,41 (CS389) y 0,061 (CS349) días⁻¹. X, μg de proteína·ml⁻¹ tras X horas de cultivo; X₀, μg de proteína·ml⁻¹ a tiempo cero.

Utilizando nitrato como fuente de nitrógeno, las tasas de crecimiento de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS389 y CS349, derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120, eran similares a la tasa de crecimiento de la estirpe silvestre (Fig. 9A). Sin embargo, en medio carente de nitrógeno combinado, las tasas de crecimiento de las estirpes mutantes eran en general menores que la de la estirpe silvestre PCC 7120 (Fig. 9B). Los mutantes más afectados en el transporte de aminoácidos, es decir los mutantes CS326 y CS349, eran también los que presentaban una menor capacidad de crecimiento a expensas de nitrógeno atmosférico (véase también la Fig. 10). Los mutantes CS458 y CS459 derivados de la estirpe CS389, así como el mutante CS460 derivado de la estirpe CS343, también mostraron en medio sin nitrógeno combinado tasas de crecimiento menores que las de sus correspondientes estirpes parentales, con valores de 0,18 días⁻¹ para el mutante CS458, 0,34 días⁻¹ para el mutante CS459 y 0,14 días⁻¹ para el mutante CS460.



Figura 10. Crecimiento en medio con nitrato o sin nitrógeno combinado de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS349 y CS389 derivados de la misma.

Las estirpes se cultivaron en medio BG11 (con nitrato) (A) o BG11₀ (sin nitrógeno combinado) (B), sin análogos añadidos, durante 10 días. Los cultivos se inocularon a razón de $0,2 \mu\text{g Chl}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Tabla 15. Frecuencia de heterocistos y actividad nitrogenasa de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS389 y CS349 derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Células cultivadas en medio BG11 (con o sin análogos añadidos, véase Materiales y Métodos) se lavaron y resuspendieron en medio sin fuente de nitrógeno combinado. Tras 48 horas de incubación en condiciones de cultivo se determinó la frecuencia de heterocistos y la actividad nitrogenasa. Los datos son la media de 3-8 determinaciones.

Estirpe	Frecuencia de heterocistos (%)	Actividad nitrogenasa ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl)
PCC 7120	5,3	7,1
CS326	<0,1	0,0
CS327	3,6	1,6
CS343	<0,1	0,05 ^a
CS389	3,0	1,6
CS349	0,5	0,0

^a En esta estirpe se encontraron niveles mayores de actividad nitrogenasa ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl) tras 72 horas de inducción.

Para establecer si los mutantes afectados en el crecimiento diazotrófico eran capaces o no de desarrollar heterocistos funcionales, se realizaron experimentos de inducción en medio sin nitrógeno combinado, determinándose la frecuencia de heterocistos maduros y la actividad nitrogenasa de las suspensiones celulares. Los mutantes de transporte de aminoácidos presentaban en general un porcentaje de heterocistos menor que la estirpe silvestre (Tabla 15) y, como consecuencia, la actividad nitrogenasa era también menor en todos los casos (Tabla 15). En los mutantes CS326 y CS349, los más afectados en el crecimiento diazotrófico, la actividad nitrogenasa era indetectable.

Por otra parte, se observó que las estirpes CS326, CS343 y CS349 (Fig. 11) mostraban una fuerte fragmentación, quedando la longitud de sus filamentos reducida a una media de 2 células tras 48 h de incubación en medio sin nitrógeno combinado.

En el caso de *Anabaena* sp. PCC 7937, las tasas de crecimiento de los mutantes CS440, CS454, CS447 y CS453 eran similares a las de la estirpe silvestre tanto en medio con nitrato (Fig. 12A) como en medio sin nitrógeno combinado (Fig. 12B). Lo mismo sucedió en el caso de *Nostoc* sp. PCC 7413 y sus mutantes CS441 y CS456 (Fig. 13A y B), así como en el de *Nostoc* sp. PCC 7107 y sus derivados CS442 y CS457 (Fig. 14A y B). En estas estirpes no se encontró, pues, ningún efecto de la inactivación de los sistemas de transporte de aminoácidos estudiados sobre la capacidad de crecimiento diazotrófico, a diferencia de lo que ocurrió en el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120.

3.2.4. Acumulación de aminoácidos en el medio de cultivo de los mutantes de transporte de aminoácidos neutros de diversas estirpes de cianobacterias

Con objeto de profundizar en el estudio de las posibles funciones fisiológicas de los sistemas de transporte de aminoácidos en las cianobacterias, se estudió si los mutantes de transporte derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120 mostraban pérdidas de aminoácidos, como consecuencia de la mutación, que pudieran correlacionarse con la incapacidad de crecimiento a expensas del nitrógeno atmosférico observada.

Para ello, tras la incubación de células de las distintas estirpes en medio con nitrato o sin fuente de nitrógeno combinado en condiciones de cultivo, se analizó, mediante HPLC, el contenido en aminoácidos de muestras del medio de cultivo. Mientras que la estirpe PCC 7120 no mostraba acumulación significativa de ningún aminoácido, los mutantes CS326, CS343, CS389 y CS349, afectados todos ellos en el transporte de Ala, Phe, Leu y, probablemente, Val e Ile, entre otros aminoácidos, mostraron una acumulación, a distintos niveles, de dichos aminoácidos en el medio extracelular, tanto en presencia como en ausencia de nitrato (Tabla 16; véase la Fig. 15 como muestra de los cromatogramas obtenidos). Por otra parte, la estirpe CS327, que presenta unos niveles

considerables de transporte de estos aminoácidos, se comportaba como la estirpe silvestre PCC 7120.

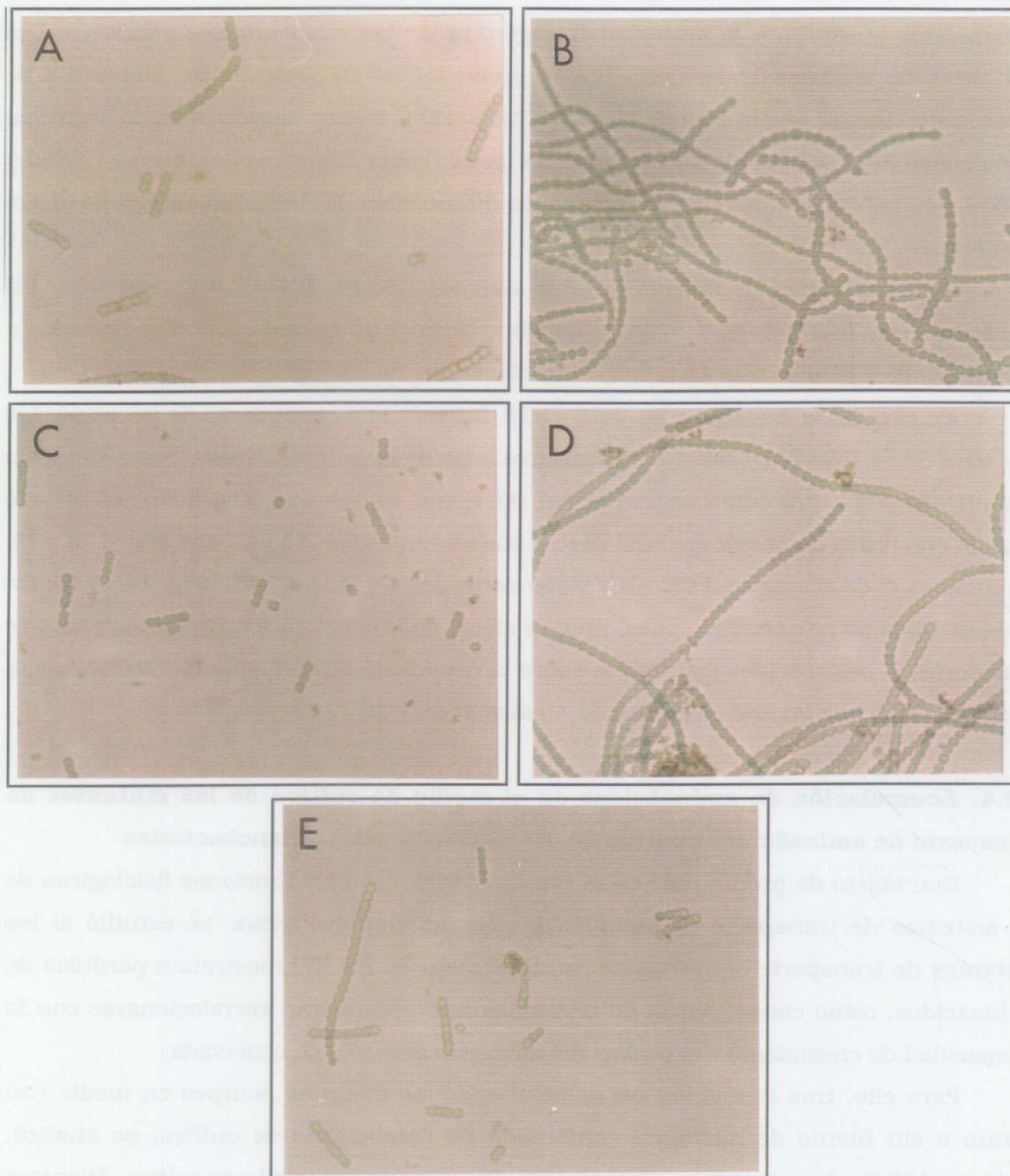


Figura 11. Fotografías al microscopio óptico de los mutantes CS326, CS327, CS343, CS389 y CS349 derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivados en medio sin nitrógeno combinado.

Fotografías al microscopio óptico (x417; campo claro) de suspensiones celulares de las estirpes CS326 (A), CS327 (B), CS343 (C), CS389 (D) y CS349 (E) cultivadas en medio BG11 (con el análogo correspondiente) e incubadas posteriormente durante 30 h en condiciones de cultivo en medio BG11₀.

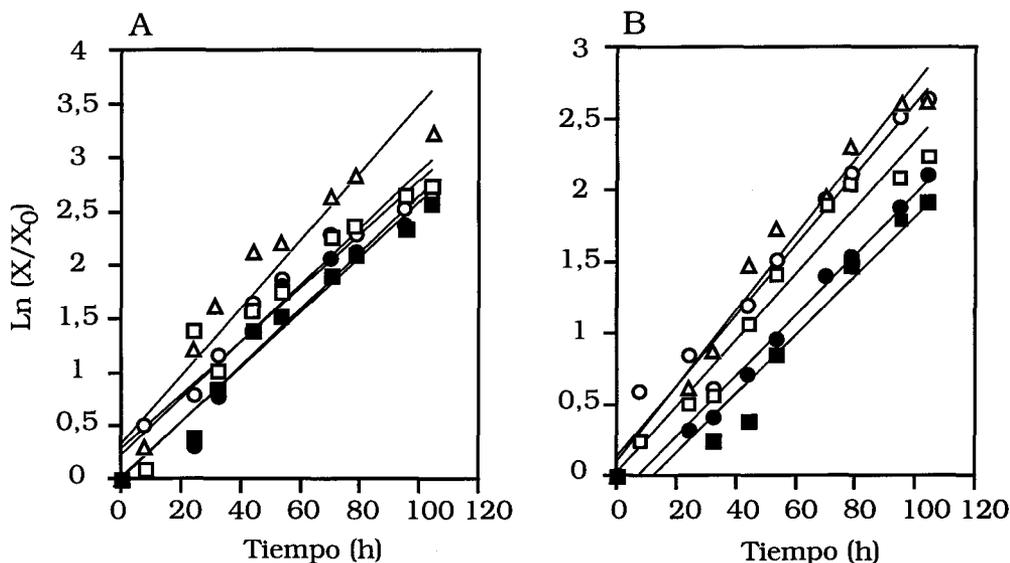


Figura 12. Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CS440, CS454, CS447 y CS453 derivados de *Anabaena* sp. PCC 7937.

Células de las estirpes PCC 7937(O), CS440 (□), CS454 (Δ), CS447 (●) y CS453 (■) cultivadas en medio BG11 (suplementado con el análogo correspondiente en el caso de los mutantes) se lavaron y resuspendieron en medio con BG11 (A) o BG11₀ (B) sin análogos y se incubaron en condiciones de cultivo. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteína del cultivo. X, μg de proteína· ml^{-1} tras X horas de cultivo; X₀, μg de proteína· ml^{-1} a tiempo cero.

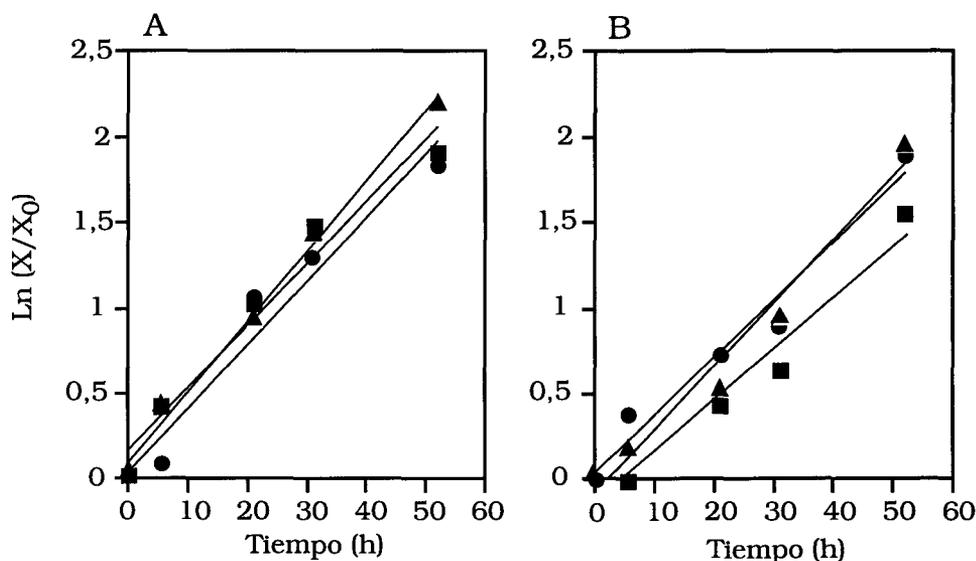


Figura 13. Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CS441 y CS456 derivados de *Nostoc* sp. PCC 7413.

Células de las estirpes PCC 7413 (●), CS441 (■) y CS456 (▲) cultivadas en medio BG11 (suplementado con el análogo correspondiente en el caso de los mutantes) se lavaron y resuspendieron en medio BG11 (A) o BG11₀ (B) sin análogos y se incubaron en condiciones de cultivo. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteína de los cultivos. X, μg de proteína· ml^{-1} tras X horas de cultivo; X₀, μg de proteína· ml^{-1} a tiempo cero.

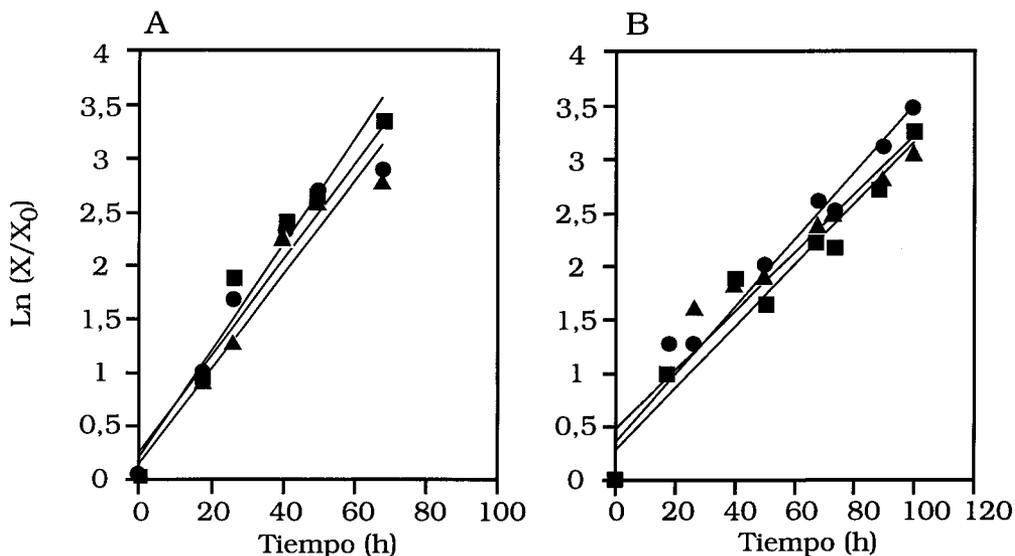


Figura 14. Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CS442 y CS457 derivados de *Nostoc* sp. PCC 7107. Células de las estirpes PCC 7107(●), CS442 (■) y CS457 (▲) cultivadas en medio BG11 (suplementado con el análogo correspondiente en el caso de los mutantes) se lavaron y resuspendieron en medio BG11 (A) o BG11₀ (B) sin análogos y se incubaron en condiciones de cultivo. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteína de los cultivos. X, μg de proteína $\cdot\text{ml}^{-1}$ tras X horas de cultivo; X₀, μg de proteína $\cdot\text{ml}^{-1}$ a tiempo cero.

La estirpe EF116 es un mutante derivado de PCC 7120 incapaz de fijar nitrógeno en condiciones aeróbicas debido a un defecto en la envuelta del heterocisto (Wolk *et al.*, 1988). Esta estirpe, que no está afectada en el transporte de aminoácidos (datos no mostrados), no acumulaba aminoácidos en el medio extracelular (Tabla 16). Se puede deducir, por lo tanto, que la acumulación de aminoácidos que se observaba en el medio de cultivo de algunos mutantes en ausencia de nitrógeno combinado no era una consecuencia del estrés de nitrógeno al que estarían sometidos dichos mutantes como consecuencia de su incapacidad de crecer diazotróficamente.

Los resultados obtenidos mediante HPLC se corroboraron para la estirpe CS326 utilizando un acercamiento experimental diferente. Las estirpes PCC 7120 y CS326 se cultivaron en medio con nitrato en presencia de bicarbonato marcado radiativamente con ¹⁴C durante 74 horas. El contenido en metabolitos del medio de cultivo se analizó mediante TLC bidimensional, detectándose los compuestos radiactivos presentes mediante autorradiografía (Fig. 16). En el caso de la estirpe silvestre PCC 7120 no se detectó ninguna mancha radiactiva (Fig. 16A), mientras que en el caso del mutante CS326 se observaron manchas que co-cromatografiaban con los aminoácidos Ala, Phe, Ile+Leu y Val, siendo la mancha más radiactiva la correspondiente a la Ala (Fig. 16B).

Tabla 16. Concentraciones de aminoácidos en el medio extracelular de cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de mutantes de transporte de aminoácidos derivados de la misma.

Células cultivadas en medio BG11 (suplementado con el análogo pertinente en el caso de cada mutante) se lavaron y resuspendieron en medio BG11 o BG11₀, sin análogos añadidos, incubándose durante 48 horas en condiciones de cultivo. Transcurrido este tiempo, se tomaron muestras de los cultivos que se filtraron para eliminar las células y se analizaron mediante HPLC para determinar el contenido en aminoácidos (Método 1, véase Materiales y Métodos). N.D., no detectado.

Medio	Aminoácido	Concentración de aminoácido en el medio extracelular (μM)						
		Estirpe:						
		PCC 7120	EF116	CS326	CS327	CS343	CS389	CS349
BG11	Ala	0,31	0,08	8,81	0,44	10,99	12,14	12,94
	Val	0,05	N.D.	1,18	0,08	1,07	0,89	0,99
	Ile	0,05	N.D.	0,77	0,04	1,21	0,75	0,68
	Phe	0,03	N.D.	1,14	0,08	1,51	1,08	1,26
	Leu	0,07	N.D.	0,27	0,05	0,23	0,45	0,31
BG11 ₀	Ala	0,04	0,19	15,46	0,17	8,97	4,99	7,16
	Val	N.D.	0,03	1,00	N.D.	0,48	0,28	0,39
	Ile	N.D.	0,04	1,75	N.D.	1,73	0,66	1,06
	Phe	N.D.	0,04	2,61	N.D.	1,52	1,14	1,93
	Leu	N.D.	0,03	2,06	N.D.	1,35	0,74	0,94

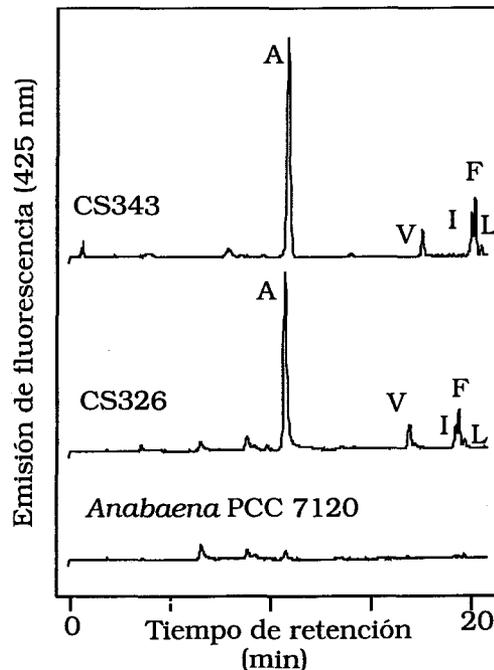


Figura 15. Cromatogramas de muestras del medio extracelular de cultivos de la estirpe *Anabaena* sp. PCC 7120 y de los mutantes CS326 y CS343.

Células cultivadas en medio BG11 (suplementado con análogos en el caso de las estirpes mutantes) se lavaron y resuspendieron en el mismo medio (sin análogos), incubándose durante unas 48 horas en condiciones de cultivo. A continuación, se tomaron muestras de las suspensiones celulares, se filtraron para eliminar las células y se analizaron mediante HPLC para la determinación de su contenido en aminoácidos (Método 1, véase Materiales y Métodos). A, Ala; V, Val; I, Ile; F, Phe; L, Leu.

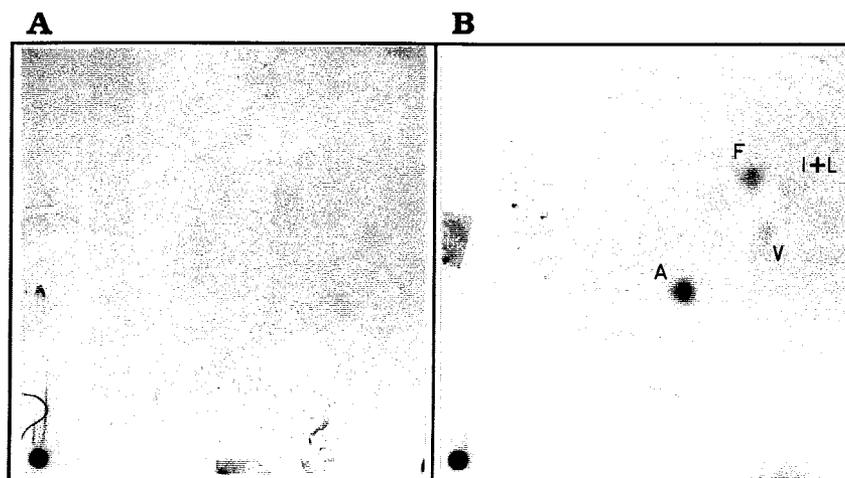


Figura 16. Cromatografía en capa fina (TLC) bidimensional de muestras del medio extracelular de cultivos de las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7120 y CS326 incubadas en medio con bicarbonato radiactivo.

Células (una cantidad equivalente a 5 µg de Chl) de las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7120 (A) y CS326 (B) cultivadas en medio BG11 (suplementado con hidroxilisina en el caso de CS326) se lavaron y resuspendieron en medio BG11 (sin análogos) suplementado con $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ y se incubaron durante 74 horas en condiciones de cultivo. Pasado este tiempo, se tomaron muestras del medio, se filtraron para eliminar las células y se analizaron mediante TLC bidimensional. La mancha de la esquina inferior izquierda corresponde al origen de la cromatografía, donde se acumula material radiactivo no soluble. A, Ala; F, Phe; V, Val; I+L, Ile+Leu.

La acumulación en el medio de cultivo de este conjunto de aminoácidos neutros hidrofóbicos resultó ser una característica común de los mutantes afectados en el transporte de aminoácidos neutros de las distintas estirpes de cianobacterias estudiadas, y no una particularidad de *Anabaena* sp. PCC 7120. La Figura 17 muestra los cromatogramas obtenidos mediante HPLC de muestras del medio en el que se habían incubado durante unas 48 horas células de las estirpes silvestres *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413 y PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601 y *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, así como sus correspondientes mutantes de transporte de aminoácidos neutros. Todos los mutantes mostraron una acumulación, a distintos niveles, de los aminoácidos Ala, Val, Phe, Ile y Leu, alcanzándose concentraciones significativamente superiores a las encontradas en el medio de cultivo de las estirpes silvestres correspondientes (Tabla 17). En el caso de los mutantes CS446 y CS448, se detectaron además otros aminoácidos, incluyendo Asp, Glu, Ser, Gly, Thr y Tyr (Fig. 17), pero este fenómeno también ocurría en el caso de su estirpe parental PCC 6903.

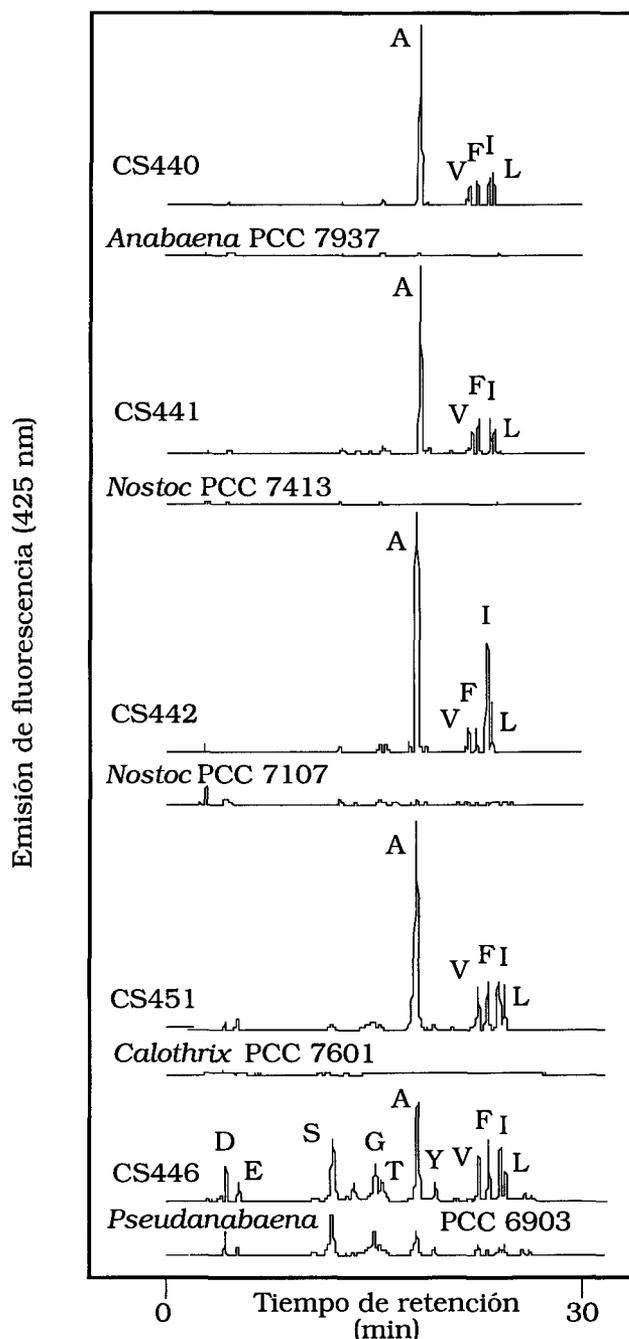


Figura 17. Cromatogramas de muestras del medio extracelular de cultivos de las estirpes *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601, *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 y de los mutantes de transporte de aminoácidos derivados de las mismas CS440, CS441, CS442, CS451 y CS446.

Células cultivadas en medio BG11 (suplementado con el análogo correspondiente en el caso de las estirpes mutantes) se lavaron y resuspendieron en medio BG11 (sin análogos), en el que se incubaron durante unas 48 horas en condiciones de cultivo. A continuación se tomaron muestras de las suspensiones celulares, que se filtraron para eliminar las células y se analizaron mediante HPLC (Método 2, véase Materiales y Métodos). A, Ala; V, Val; F, Phe; I, Ile; L, Leu; D, Asp; E, Glu; S, Ser; G, Gly; T, Thr; Y, Tyr. Se desconoce la identidad del compuesto que aparece entre S y G en la muestra del mutante CS446.

Tabla 17. Concentraciones de aminoácidos en el medio extracelular de cultivos de *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601 y *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 y de mutantes de transporte de aminoácidos derivados de dichas cianobacterias.

Células cultivadas en medio BG11 (suplementado con el análogo pertinente en el caso de cada estirpe mutante) se lavaron y resuspendieron en medio BG11 (sin análogos añadidos), en el que se incubaron durante unas 48 horas en condiciones de cultivo. A continuación se tomaron muestras de los cultivos, se filtraron para eliminar las células y se analizaron mediante HPLC para la determinación del contenido en aminoácidos (Método 2, véase Materiales y Métodos). En la tabla se recogen los aminoácidos que se encontraron en las estirpes mutantes a un nivel superior al de la correspondiente estirpe silvestre. N.D., no detectado.

Aminoácido	Concentración de aminoácido en el medio extracelular (μM)										
	PCC 7937	CS440	PCC 7413	CS441	PCC 7107	CS442	PCC 7601	CS451	PCC 6903	CS448	CS446
Ala	0,19	8,70	0,04	9,27	0,18	12,08	0,36	11,36	1,41	6,62	6,44
Val	N.D.	0,68	0,01	0,76	0,06	0,95	0,08	1,14	0,42	0,86	1,77
Ile	0,02	1,03	0,01	1,30	0,06	4,38	0,06	1,25	0,19	1,07	1,78
Phe	0,02	0,85	0,01	1,19	0,07	0,85	0,10	1,16	0,12	0,85	1,80
Leu	0,01	1,03	0,01	0,68	0,08	1,61	0,06	1,10	0,26	0,35	0,77

3.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *natA* y *natB* DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 Y CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE LOS MISMOS

El siguiente objetivo de este trabajo consistió en la clonación y análisis de algunos de los genes responsables de las actividades de transporte de aminoácidos que habían sido caracterizadas. Esto permitiría profundizar en el estudio de la función de dichos sistemas de transporte.

3.3.1. Generación de los mutantes *natA* y *natB* derivados de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y actividades de transporte de aminoácidos de los mismos

Durante el desarrollo de esta tesis se hizo disponible en las bases de datos 1 Mb, que suponía un 28% de la secuencia del genomio de la cianobacteria unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1995). La disponibilidad de esta secuencia nos permitió buscar las ORFs presentes en la misma cuyos productos hipotéticos mostraran homología con proteínas de otros organismos implicadas en el transporte a través de membranas, encontrándose 32 de tales ORFs, de las cuales se seleccionaron ocho para su estudio (Tabla 18). Como se mencionó en la Introducción, en el caso de las proteínas que constituyen sistemas de transporte, las homologías no necesariamente reflejan la naturaleza exacta del sustrato transportado. No obstante la selección de estas ocho ORFs se hizo en base a dicho criterio, descartando, en particular, las ORFs homólogas al componente conservado de sistemas exportadores de compuestos, y seleccionando las ORFs homólogas a elementos de sistemas de transporte de aminoácidos de otras bacterias.

Como puede observarse, los productos hipotéticos de las ORFs *slr0075*, *sll0484*, *slr0467* y *sll0374* muestran homología con componentes conservados de sistemas de transporte tipo ABC; los de las ORFs *sll0064*, *sll0606* y *slr0559* con proteínas periplásmicas de unión de sustrato características de los mismos sistemas de transporte y, finalmente, el producto hipotético de la ORF *slr0700* con una proteína de transporte de tipo monocomponente, con 12 dominios hidrofóbicos de expansión de membrana (Tabla 18).

La estrategia general que se siguió para el estudio de estas ORFs consistió en la amplificación mediante PCR de fragmentos pertenecientes a las mismas, clonación de dichos fragmentos en un vector apropiado, inserción de una casete de resistencia a Km interrumpiendo la ORF y transferencia de las construcciones resultantes a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mediante transformación, con objeto de reemplazar el gen silvestre de dicha estirpe por la versión mutada y estudiar las actividades de transporte de aminoácidos de las estirpes mutantes así generadas.

Tabla 18. ORFs de *Synechocystis* sp. PCC 6803 seleccionadas para su estudio en este trabajo cuyos productos hipotéticos muestran homología con proteínas de transporte de otros organismos.

Se seleccionaron 8 de entre unas 32 ORFs presentes en una región de 1 Mb de longitud del genomio de la estirpe PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1995) relacionadas con genes de transporte de membrana de otros organismos. La longitud de los productos hipotéticos de estas ORFs se indica en aminoácidos (aa). La posición relativa del comienzo de las ORFs en el genomio de la estirpe PCC 6803 se indica (en kb) según el sistema de referencia establecido por Kaneko *et al.* (1996).

ORF	Longitud (aa)	Homología con proteínas de otros organismos:	Identities (%)	Posición (kb)
<i>slr0075</i>	256	ycf16, componente conservado de un posible transportador dependiente de ATP de <i>Cyanophora paradoxa</i>	67	2873
<i>slr0484</i>	245	proteína DevA (componente conservado) de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	63	2911
<i>slr0467</i>	267	BraF, una subunidad del componente conservado del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	2601
<i>slr0374</i>	249	BraG, una subunidad del componente conservado del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada de <i>P. aeruginosa</i>	42	2709
<i>slr0064</i>	275	precursor de la proteína de unión de la Gln de un transportador tipo ABC de <i>Bacillus stearothermophilus</i>	27	2580
<i>slr0606^a</i>	464	BraC, proteína periplásmica de unión de Leu, Ile y Val de <i>P. aeruginosa</i>	25	2668
<i>slr0559^a</i>	454	proteína BraC de <i>P. aeruginosa^b</i>	25	2799
<i>slr0700</i>	452	proteína GabA, permeasa de 4-aminobutirato de <i>E. coli^c</i>	25	3089
<i>slr0468</i>	436	ninguna ^d	-	2602

^a En estos casos, Kaneko *et al.* no aportaban ninguna homología.

^b También se encontró homología con el receptor metabotrópico para Glu de *Rattus norvegicus* (23% de residuos idénticos).

^c También se encontró homología con permeasas para el transporte de aminoácidos catiónicos de diversos organismos.

^d Esta ORF se estudió por ser adyacente a la ORF *slr0467* (véase el texto), a pesar de no mostrar homología con ninguna proteína conocida.

Para la amplificación de fragmentos de DNA correspondientes a cada una de las ORFs indicadas se utilizaron como cebadores oligonucleótidos de 23-25 bases de longitud (cuyas secuencias se especifican en Materiales y Métodos) que apareaban con secuencias internas o adyacentes a la propia ORF, como se muestra en la Figura 18. Como molde se utilizó DNA genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Los productos resultantes de las reacciones de amplificación (de entre 893 y 1116 pb) se clonaron en el vector pGEM-T (Tabla 3, Materiales y Métodos). De este modo se generaron los plásmidos pCSX11, pCSX12, pCSX24, pCSX25, pCSX22, pCSX8, pCSX10, pCSX9 y pCSX38 (Tabla 19). Posteriormente, éstos se digirieron con endonucleasas de restricción que presentaban un único sitio de corte, localizado en su inserto, procediéndose después a la introducción en dicho sitio de la casete C.K3 (1,1 kb) (véase Tabla 3, Materiales y Métodos), que confiere resistencia a la Km y carece de terminadores de la transcripción. Así se generaron los plásmidos pCSX14, pCSX15, pCSX28a, pCSX28b, pCSX29a, pCSX29b, pCSX26, pCSX13, pCSX18a, pCSX18b, pCSX19 y pCSX39 (Tabla 19, Figura 18). Las letras a y b al final del nombre del plásmido indican que la casete C.K3 se insertó en la misma orientación que la ORF (a) o en sentido opuesto (b). Cuando no se especifica ninguna letra, la casete C.K3 se insertó en una única orientación, que no fue determinada. Estos plásmidos, que contenían las versiones mutadas de las ORFs sometidas a estudio, se utilizaron para transformar células de la estirpe silvestre PCC 6803, seleccionándose aquellos clones que habían adquirido resistencia a la Km como consecuencia de una doble recombinación que provocase la sustitución del gen silvestre por la versión mutante del mismo. De este modo, se obtuvieron las estirpes mutantes que se denominaron CSX14, CSX15, CSX28a, CSX28b, CSX29a, CSX29b, CSX26, CSX13, CSX18a, CSX18b, CSX19 y CSX39, en función del nombre del plásmido utilizado para su generación.

La estructura cromosómica de todos los mutantes se comprobó mediante PCR, utilizando el DNA genómico de los mismos como molde para las reacciones de amplificación y, como cebadores, los oligonucleótidos que se habían utilizado para la clonación de las ORFs. Los productos resultantes se resolvieron en geles de agarosa, observándose un incremento de 1,1 kb sobre el tamaño original del fragmento, debido a la inserción de la casete C.K3 (datos no mostrados). En aquellos casos en que se observaron tanto bandas del tamaño mutante como del silvestre, indicando que la estirpe poseía una mezcla de cromosomas, se procedió a cultivarla con una concentración de Km superior para favorecer la segregación de la mutación. Sólo en el caso del mutante CSX14 no fue posible la obtención de un clon mutante cromosómicamente homogéneo, a pesar de utilizarse concentraciones de Km superiores a $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, lo que sugiere que el producto de la ORF *slr0075* sea esencial, al menos en las condiciones de cultivo empleadas.

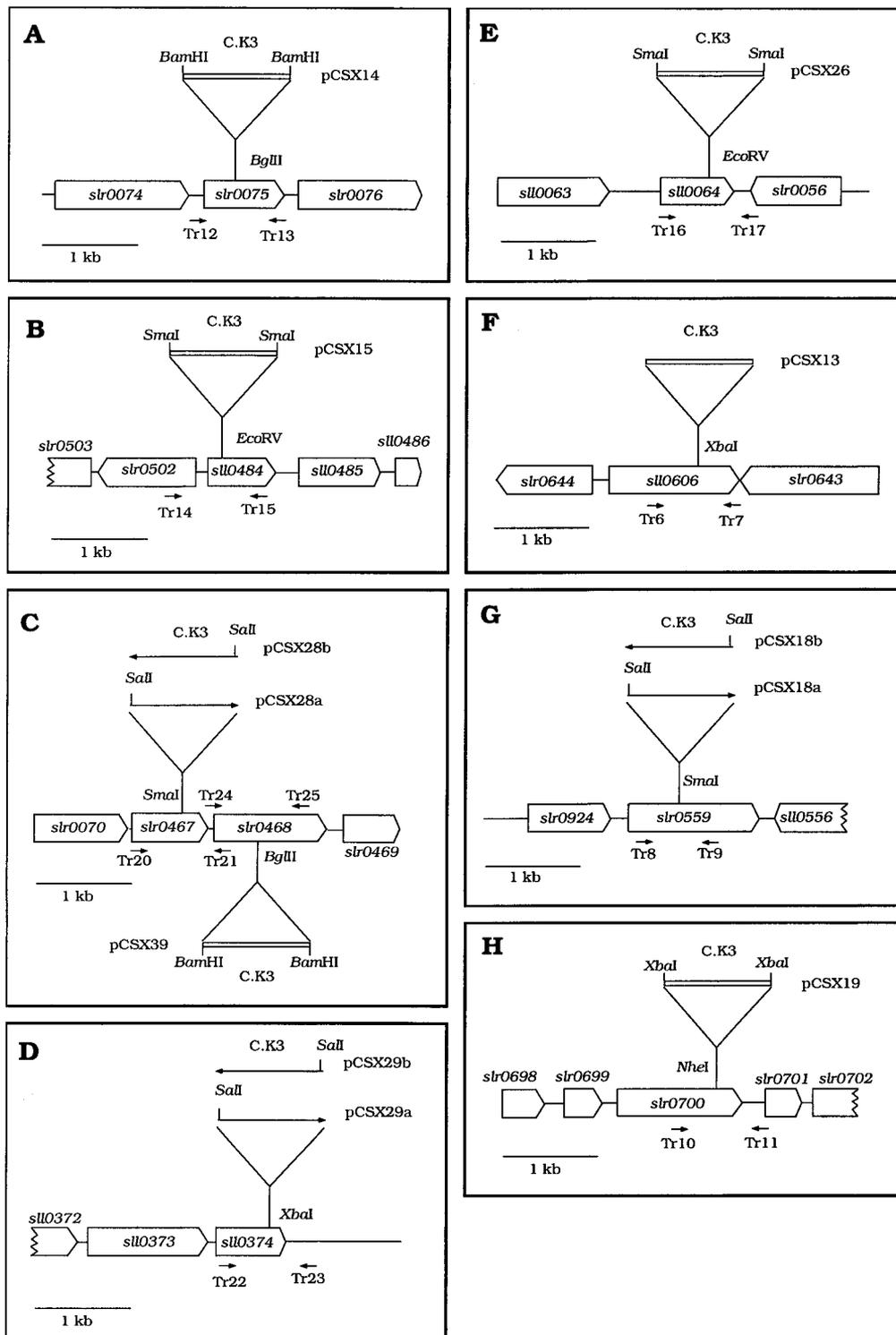


Figura 18. Representación esquemática de las ORFs del genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 inactivadas mediante inserción de la casete C.K3.

Se representan las ORFs seleccionadas para su inactivación, así como las ORFs adyacentes. Se indican (mediante flechas pequeñas) los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación por PCR de fragmentos pertenecientes a dichas ORFs, así como las posiciones correspondientes a los mismos, las dianas de restricción empleadas para la inserción de la casete C.K3 y el nombre del plásmido pCSX generado en cada caso. En las ORFs *str0467* (panel C), *sll0374* (panel D) y *str0559* (panel G), la casete C.K3 se insertó en ambas orientaciones, sirviendo la diana *Sall* interna a la misma para distinguir entre ellas.

Tabla 19. Plásmidos contruidos para la inactivación insercional de las ORFs *slr0075*, *sll0484*, *slr0467*, *sll0374*, *sll0064*, *sll0606*, *slr0559*, *slr0700* y *slr0468* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Plásmido	Descripción
pCSX11	fragmento de la ORF <i>slr0075</i> amplificado con los cebadores Tr12 y Tr13 clonado en pGEM-T
pCSX12	fragmento de la ORF <i>sll0484</i> amplificado con los cebadores Tr14 y Tr15 clonado en pGEM-T
pCSX24	fragmento de la ORF <i>slr0467</i> amplificado con los cebadores Tr20 y Tr21 clonado en pGEM-T
pCSX25	fragmento de la ORF <i>sll0374</i> amplificado con los cebadores Tr22 y Tr23 clonado en pGEM-T
pCSX22	fragmento de la ORF <i>sll0064</i> amplificado con los cebadores Tr16 y Tr17 clonado en pGEM-T
pCSX8	fragmento de la ORF <i>sll0606</i> amplificado con los cebadores Tr6 y Tr7 clonado en pGEM-T
pCSX10	fragmento de la ORF <i>slr0559</i> amplificado con los cebadores Tr8 y Tr9 clonado en pGEM-T
pCSX9	fragmento de la ORF <i>slr0700</i> amplificado con los cebadores Tr10 y Tr11 clonado en pGEM-T
pCSX38	fragmento de la ORF <i>slr0468</i> amplificado con los cebadores Tr24 y Tr25 clonado en pGEM-T
pCSX14	plásmido que contiene la ORF <i>slr0075</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Bgl</i> III de pCSX11
pCSX15	plásmido que contiene la ORF <i>sll0484</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Eco</i> RV de pCSX12
pCSX28a ^a	plásmido que contiene la ORF <i>slr0467</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Sma</i> I de pCSX24, en la misma orientación que la ORF
pCSX28b	plásmido que contiene la ORF <i>slr0467</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Sma</i> I de pCSX24, en orientación opuesta a la de la ORF
pCSX29a	plásmido que contiene la ORF <i>sll0374</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Xba</i> I de pCSX25, en la misma orientación que la ORF
pCSX29b ^a	plásmido que contiene la ORF <i>sll0374</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Xba</i> I de pCSX25, en orientación opuesta a la de la ORF
pCSX26	plásmido que contiene la ORF <i>sll0064</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Eco</i> RV de pCSX22
pCSX13	plásmido que contiene la ORF <i>sll0606</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Xba</i> I de pCSX8
pCSX18a	plásmido que contiene la ORF <i>slr0559</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Sma</i> I de pCSX10, en la misma orientación que la ORF
pCSX18b ^a	plásmido que contiene la ORF <i>slr0559</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Sma</i> I de pCSX10, en orientación opuesta a la de la ORF
pCSX19	plásmido que contiene la ORF <i>slr0700</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Nhe</i> I de pCSX9
pCSX39	plásmido que contiene la ORF <i>slr0468</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>Bgl</i> III de pCSX38

^a Mediante secuenciación parcial de estos plásmidos se comprobó que los fragmentos amplificados mediante PCR contenidos en los mismos eran correctos. En el resto de los casos se realizó dicha comprobación mediante análisis de restricción.

Se determinaron las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes obtenidos, utilizándose una concentración de sustrato de 10 μM , en ensayos de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg y el Glu). Las estirpes mutantes CSX15, CSX29b, CSX26, CSX13, CSX19 y CSX39 mostraron actividades de transporte de aminoácidos similares a las de la estirpe silvestre PCC 6803 (Tabla 20), descartándose de este modo la posibilidad de que las ORFs *sll0484*, *sll0374*, *sll0064*, *sll0606*, *slr0700* y *slr0468* determinaran proteínas necesarias para el transporte de los aminoácidos ensayados.

Tabla 20. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX15, CSX29b, CSX26, CSX13, CSX19 y CSX39 derivados de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μM , de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg y el Glu). La estirpe silvestre PCC 6803 se incluye con fines comparativos.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)						
	Estirpe:						
	PCC 6803	CSX15 (<i>sll0484</i>) ^a	CSX29b (<i>sll0374</i>)	CSX26 (<i>sll0064</i>)	CSX13 (<i>sll0606</i>)	CSX19 (<i>slr0700</i>)	CSX39 (<i>slr0468</i>)
<i>Básicos</i>							
Arg	3120	3640	3570	3580	2710	2580	3060
His	63,9	67,3	62,3	71,3	54,1	43,4	68,2
Lys	457,3	344,4	319,8	308,6	327,6	266,6	248,1
<i>Neutros</i>							
Ala	101,0	124,5	85,3	133,2	107,6	108,0	115,9
Gln	51,6	86,4	92,5	99,2	96,5	80,4	84,1
Gly	102,8	97,3	93,5	114,8	94,2	103,0	91,5
Leu	79,4	62,6	57,6	50,0	69,1	47,0	60,9
Phe	54,4	56,8	42,7	45,7	49,8	42,6	60,1
Pro	70,2	100,4	68,8	90,8	70,1	69,4	85,6
Ser	69,3	85,9	76,1	89,2	59,1	55,2	68,7
<i>Ácidos</i>							
Asp	2,6	2,5	2,8	3,2	2,2	2,1	3,1
Glu	568,3	621,1	562,4	647,4	571,0	567,0	466,4

^a Se indica entre paréntesis la ORF inactivada en cada una de las estirpes mutantes.

Sin embargo, los mutantes de las ORFs *slr0467* (estirpes CSX28a y CSX28b) y *slr0559* (estirpes CSX18a y CSX18b) resultaron estar severamente afectados en el transporte de los aminoácidos neutros Ala, Gly, Leu, Phe, Pro y Ser (Tabla 21). También el transporte de Asp se veía disminuido en un 73-81%. Por otra parte, la inactivación de la ORF *slr0467* provocaba una reducción de la actividad de transporte de Glu de un 33-53%, efecto que no se observaba en el caso de la inactivación de la ORF *slr0559*. Finalmente, las actividades de transporte de Gln, así como de aminoácidos básicos, no se vieron sustancialmente afectadas. Como ya se ha discutido con anterioridad, el aminoácido His puede comportarse en parte como aminoácido neutro (véase apartado 3.1.1).

El fenotipo de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX28a, CSX28b, CSX18a y CSX18b sugería que las ORFs *slr0467* y *slr0559* correspondían a genes que determinaban proteínas necesarias para el transporte de aminoácidos neutros en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. El hecho de que la mutación de cada una de las ORFs anulase de forma casi total la actividad de transporte de aminoácidos neutros (excepto Gln) sugería que ambas ORFs determinarían elementos de un mismo sistema de transporte. Se denominó *natA* a la ORF *slr0467* y *natB* a la ORF *slr0559* (*nat* de "neutral amino acid transport"). Por lo tanto, el sistema responsable del transporte de aminoácidos neutros (excepto Gln) en esta cianobacteria parece ser de tipo ABC o multicomponente.

Tabla 21. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes de las ORFs *slr0467* y *slr0559* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células cultivadas en medio BG11 suplementado con Km en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μ M, de 10 min de duración (1 min en el caso de la Arg y el Glu). Los datos se presentan como porcentaje de la actividad de transporte mostrada por la estirpe silvestre PCC 6803 y son la media de los valores obtenidos en 2-3 ensayos independientes.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (%)			
	Estirpe:			
	CSX28a (<i>slr0467</i>) ^a	CSX28b (<i>slr0467</i>)	CSX18a (<i>slr0559</i>)	CSX18b (<i>slr0559</i>)
<i>Básicos</i>				
Arg	92	71	100	98
His	70	70	73	68
Lys	80	88	94	84
<i>Neutros</i>				
Ala	<1	<1	<1	1
Gln	86	86	100	94
Gly	<1	<1	<1	1
Leu	<1	<1	<1	1
Phe	<1	<1	<1	1
Pro	<1	<1	<1	<1
Ser	5	3	4	5
<i>Ácidos</i>				
Asp	27	19	27	23
Glu	67	47	88	84

^a Se indica entre paréntesis la ORF inactivada en cada una de las estirpes mutantes.

Los genes *natA* y *natB* ocupan posiciones distantes (posición 2601 kb y 2799 kb, respectivamente) en el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803. El producto hipotético de la ORF *slr0468*, situada inmediatamente a continuación del gen *natA* (Fig. 18C) y que no muestra homología con ninguna proteína conocida (Tabla 18), no parece estar implicado en el transporte de aminoácidos como se ha indicado antes.

A pesar de no estar segregado, también se analizó la actividad de transporte de aminoácidos del mutante CSX14 (mutado en la ORF *str0075*), que presentó actividades normales en todos los casos (datos no mostrados).

El mutante CSX28a permitió analizar el transporte de Glu en *Synechocystis* sp. PCC 6803 en ausencia de cualquier posible contribución del sistema de transporte de aminoácidos neutros. Se determinaron los parámetros cinéticos para el transporte de Glu en la estirpe CSX28a, obteniéndose un valor de K_S de 44 μM y una V_{max} de 389 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl (Fig. 19). Con objeto de determinar si el transporte de Glu remanente en la estirpe CSX28a podía tener lugar a través del mismo sistema que mediaba el transporte de Gln, se determinaron los parámetros cinéticos para el transporte de Glu en presencia de Gln suministrada a concentraciones 0,01, 0,1 ó 1 mM. En todos los casos se encontraron valores de K_S y V_{max} similares a los observados en ausencia de Gln (Tabla 22). Por lo tanto, estos sustratos no parecen compartir el mismo sistema de transporte.

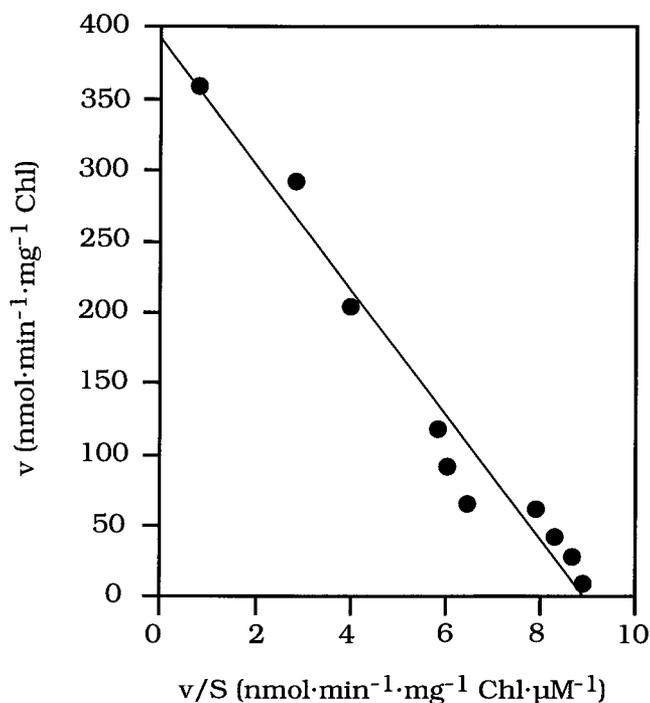


Figura 19. Representación de Eadie-Hofstee del efecto de la concentración de Glu sobre la tasa de transporte de Glu en el mutante CSX28a derivado de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km, se utilizaron en ensayos de transporte de 1 min de duración en los que se suministró Glu marcado radiactivamente a distintas concentraciones (0,25-400 μM). v, velocidad de transporte de Glu; S, concentración de Glu.

Tabla 22. Características cinéticas del transporte de Glu en presencia de diferentes concentraciones de Gln en el mutante CSX28a derivado de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km, se utilizaron en ensayos de transporte de 1 min de duración en los que se suministró Glu marcado radiactivamente a distintas concentraciones comprendidas entre 20 y 400 μM , en presencia de 0,01, 0,1 ó 1 mM de Gln no marcada. Los ensayos se realizaron de modo similar a como se describe en el apartado 2.3.3 (Materiales y Métodos).

Concentración de Gln en el ensayo (mM)	K_S (μM)	V_{max} ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl)
0,01	58	407
0,1	57	319
1	54	385

3.3.2. Acumulación de aminoácidos en el medio de cultivo de los mutantes *nataA* y *natB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803

Los mutantes espontáneos afectados en el transporte de aminoácidos neutros de las estirpes filamentosas *Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601 y *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 muestran, como se describió en el apartado 3.2.4, la acumulación de ciertos aminoácidos en el medio de cultivo. Para determinar si la inactivación de los genes *nataA* y *natB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 provocaba el mismo fenotipo, se analizaron mediante HPLC muestras del medio de cultivo en el que se había incubado a los mutantes CSX28a o CSX18b. En ambos casos se observó una acumulación de los aminoácidos Ala, Val, Phe, Ile y Leu (Fig. 20) por encima de los niveles encontrados en la estirpe silvestre PCC 6803. La concentración del aminoácido Ala en el medio extracelular, tras 46 horas de incubación en medio BG11, fue de 0,15 μM para la estirpe PCC 6803, 7,4 μM para el mutante CSX28a y 7,5 μM para el CSX18b.

3.3.3. Presencia de secuencias homólogas a los genes *nataA* y *natB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en otras estirpes de cianobacterias

Dado que todas las cianobacterias incluidas en este trabajo mostraron capacidad para transportar aminoácidos neutros, se estudió mediante análisis de Southern la existencia de secuencias homólogas a las de los genes *nataA* y *natB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en el resto de las estirpes utilizadas. En todos los casos se observaron bandas de hibridación, tanto con la sonda de *nataA* como con la sonda de *natB* (Fig. 21).

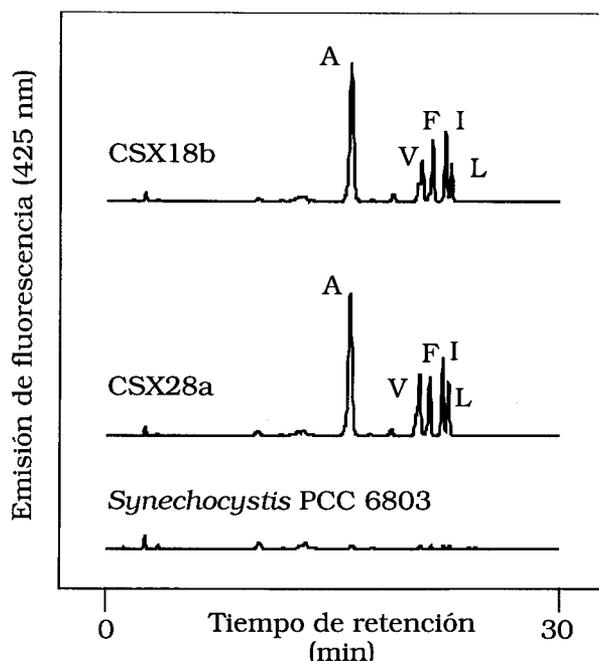


Figura 20. Cromatogramas de muestras del medio de cultivo de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de los mutantes CSX28a (*natA*) y CSX18b (*natB*).

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Km en el caso de los mutantes, se lavaron y resuspendieron en medio BG11 (sin antibióticos), incubándose durante 46 horas en condiciones de cultivo. A continuación se tomaron muestras del medio, se filtraron para eliminar las células y se analizaron mediante HPLC (Método 2, véase Materiales y Métodos). A, Ala; V, Val; F, Phe; I, Ile; L, Leu.

3.4. IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE GENES *nat* DE *Anabaena* sp. PCC 7120

3.4.1. Clonación y secuenciación de los genes *natA* y *natC* de *Anabaena* sp. PCC 7120

Con objeto de aislar el gen de *Anabaena* sp. PCC 7120 homólogo a *natA*, se procedió a la clonación del fragmento *Hind*III de 2,7 kb que había mostrado hibridación con la sonda *natA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Fig. 21A).

Para ello se aislaron mediante electroforesis preparativa en agarosa siete fracciones, conteniendo fragmentos *Hind*III del DNA total de la estirpe PCC 7120 de tamaño comprendido entre 1,9 y 3,7 kb. Para identificar la fracción que contenía el fragmento de interés, una alícuota de cada fracción se sometió a hibridación con la sonda de *natA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803. El DNA de la fracción que dió lugar a la hibridación más clara se sometió a ligación con el vector pIC20R (véase Tabla 3, Materiales y Métodos) linealizado con *Hind*III y desfosforilado, transformándose posteriormente la estirpe SURE de *E. coli* y seleccionándose clones transformantes que mostrasen hibridación con la sonda de *natA* de la estirpe PCC 6803.

De este modo se identificó un clon positivo, conteniendo un plásmido que se denominó pCSX36, que podría portar el gen *natA* de *Anabaena* sp. PCC 7120.

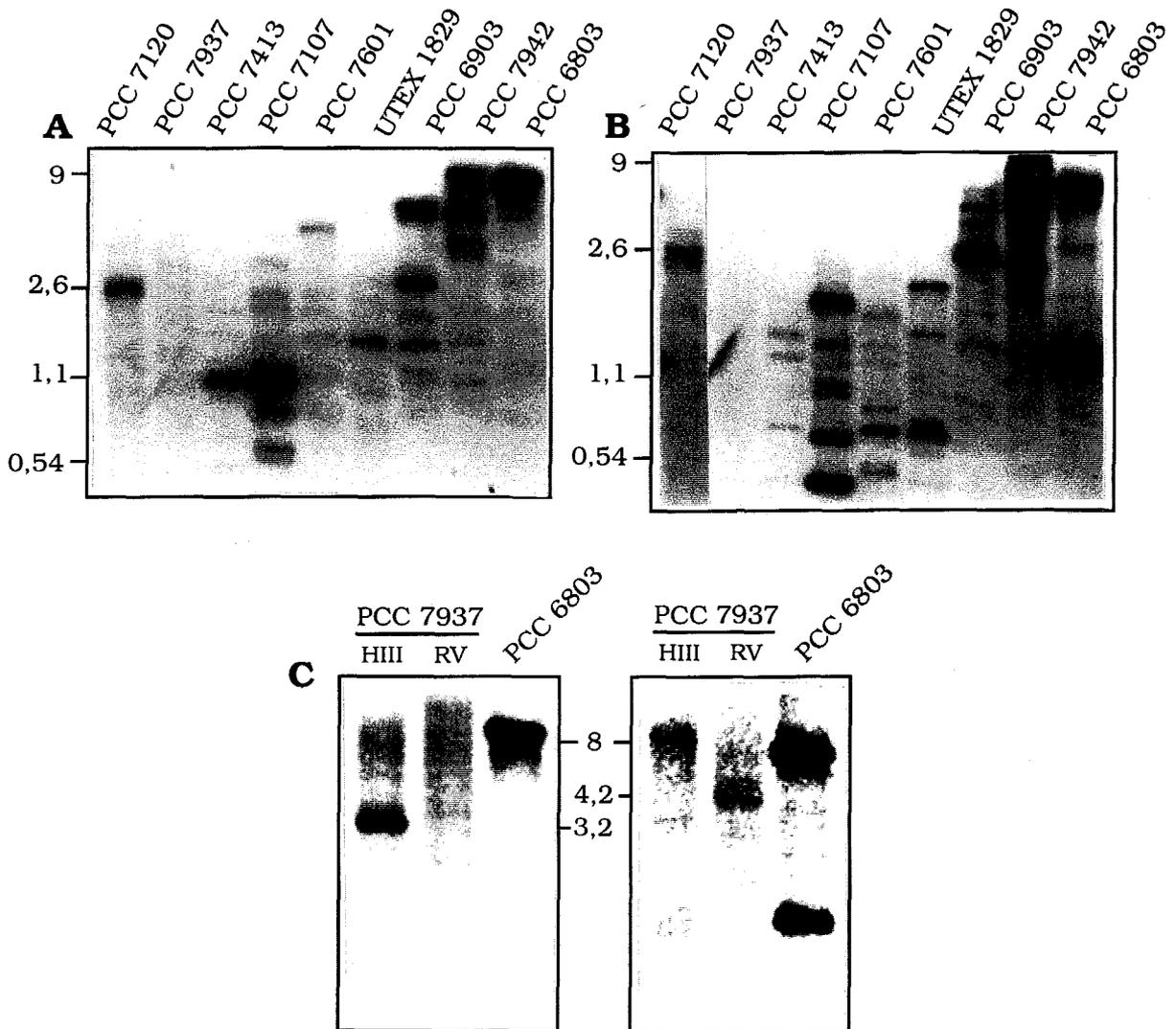


Figura 21. Presencia de secuencias homólogas a los genes *natA* y *natB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en otras estirpes de cianobacterias.

DNA total de las estirpes indicadas se digirió con las siguientes enzimas: *Hind*III, en el caso de la estirpe PCC 7120 en el panel A y PCC 7942; *Eco*RV en el caso de la estirpe PCC 7120 en el panel B; *Mva*I en el caso de las estirpes PCC 7413, PCC 7107, PCC 7601 y UTEX 1829 y *Dra*I en el caso de las estirpes PCC 6903 y PCC 6803. Las hibridaciones se realizaron en condiciones permisivas, utilizando como sonda un fragmento *Hpa*I de 609 pb que contenía parte del gen *natA* de la estirpe PCC 6803 (591 pb) y 18 pb por delante del mismo (panel A) o un fragmento interno del gen *natB* de la estirpe PCC 6803 de 893 pb (panel B). En ambos casos las sondas se obtuvieron a partir de un fragmento de DNA que se generó mediante PCR, utilizando como molde el plásmido pCSX24 para *natA* y pCSX10 para *natB*, y como cebadores las parejas de oligonucleótidos Tr20-Tr21 y Tr8-Tr9, respectivamente. El panel C muestra la hibridación obtenida con estas mismas sondas (*natA* a la izquierda, *natB* a la derecha) al digerir una mayor cantidad de DNA total de la estirpe PCC 7937 con *Hind*III (HIII) o *Eco*RV (RV); en estas hibridaciones también se incluyó como control el DNA de la estirpe PCC 6803 digerido con *Dra*I. Se indican las posiciones y tamaños (en kb) de algunos patrones.

Se realizó un análisis de Southern en condiciones restrictivas, utilizando DNA cromosómico de la estirpe PCC 7120 digerido con las enzimas *EcoRV*, *HindIII* y *DraI* y como sonda el fragmento *HindIII* correspondiente al inserto del plásmido pCSX36. Como se muestra en la Figura 22, el fragmento clonado mostró hibridación con el DNA de *Anabaena* sp. PCC 7120. El hecho de que se obtuviese una sola banda de hibridación sugería la presencia de una sola copia del gen *natA* de esta cianobacteria. Este hecho se corroboró mediante experimentos de hibridación realizados en condiciones permisivas (no mostrado).

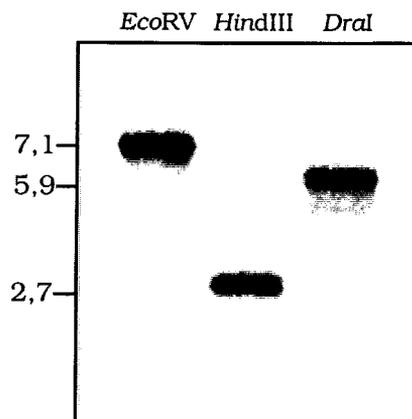


Figura 22. Hibridación del inserto del plásmido pCSX36 con DNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120.

DNA total de la estirpe PCC 7120 se digirió con las enzimas de restricción indicadas y se sometió a hibridación en condiciones restrictivas (véase Materiales y Métodos), utilizándose el inserto *HindIII* del plásmido pCSX36 como sonda. A la izquierda se indican (en kb) los tamaños de las bandas.

La secuenciación del inserto del plásmido pCSX36 reveló la existencia de una ORF (Fig. 23), cuyo producto era homólogo a *NatA* de la estirpe PCC 6803 y a *BraF*, componente conservado del sistema de transporte de aminoácidos de cadena lateral ramificada (LIV-I), de *Pseudomonas aeruginosa* (Hoshino y Kose, 1990a). Esta ORF no estaba completa en el inserto de pCSX36. Delante de la misma se encontró otra ORF (Fig. 23) cuyo producto era homólogo al producto hipotético de la ORF *sll0146* de la estirpe PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) y a *BraE*, proteína de membrana del sistema de transporte LIV-I de *P. aeruginosa* (Hoshino y Kose, 1990a). Esta ORF se denominó *natC*.

Con objeto de completar la secuencia del gen *natA* de la estirpe PCC 7120, se realizaron experimentos de Southern en condiciones restrictivas, utilizando DNA total de la estirpe PCC 7120 digerido con varias enzimas de restricción y como sonda el fragmento *HaeIII-HindIII* de 0,6 kb de pCSX36 (Fig. 23). De este modo, se identificó un fragmento *XbaI* de unas 6-7 kb que debía contener el gen completo, procediéndose a su clonación mediante la construcción, como en el caso anterior, de una subgenoteca de fragmentos de DNA de tamaños comprendidos entre 4,5 y 11 kb en el vector de selección positiva

pRL500 (véase Tabla 3, Materiales y Métodos) digerido con *Xba*I, en la estirpe HB101 de *E. coli*. Mediante hibridación, utilizando como sonda el fragmento *Bam*HI-*Eco*NI de pCSX36 que contenía parte del gen *natA* (la diana *Bam*HI pertenece al sitio de clonación múltiple del vector), se identificó un clon positivo, portador de un plásmido que se denominó pCSX50 (Fig. 23). Para facilitar la secuenciación, se subclonó un fragmento *Nhe*I de 1,7 kb del plásmido pCSX50 en el vector pIC20R cortado con *Xba*I y desfosforilado, originándose el plásmido pCSX51 (Fig. 23). La secuenciación parcial del inserto de pCSX51 permitió completar la secuencia del gen *natA*.

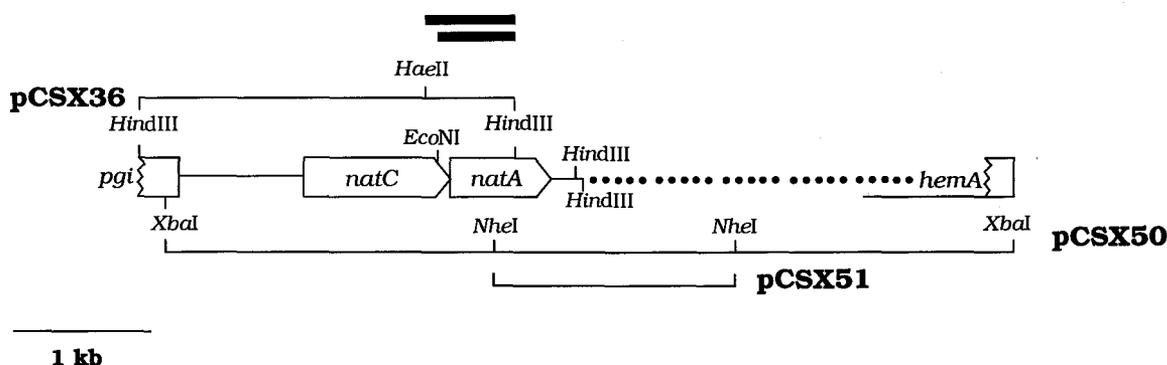


Figura 23. Representación esquemática de la región genómica que contiene los genes *natC* y *natA* de *Anabaena* sp. PCC 7120.

En el esquema se señalan algunas dianas de restricción, localizadas mediante secuenciación y/o análisis de restricción de la región. También se muestran los fragmentos de la misma que se clonaron en los plásmidos pCSX36, pCSX50 y pCSX51. El símbolo ● indica la parte no secuenciada de la región. En el caso de la ORF *hemA*, se indica la longitud aproximada esperada si dicha ORF tuviera la misma longitud que el gen *hemA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803. La localización de las sondas empleadas para la clonación del inserto *Xba*I de pCSX50 se muestra con líneas en trazo grueso.

Los genes *natC* y *natA* se secuenciaron en las dos cadenas (Fig. 24). Delante del triplete ATG del gen *natC*, y solapando con el mismo, se encontraron siete repeticiones directas imperfectas de un heptanucleótido cuya existencia se ha descrito en diversas regiones del genoma de varias cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos (Mazel *et al.*, 1990) y cuya función se desconoce. También se encontraron a continuación del gen *natA* tres repeticiones directas imperfectas de otro heptanucleótido, y más adelante cinco de otro diferente (Fig. 24). El codón de iniciación del gen *natA* podría ser TTG en lugar de ATG, de forma que las ocho últimas bases del gen *natC* coincidirían con las ocho primeras del gen *natA* (Fig. 24). El uso de este codón de iniciación se ha descrito ya para otros genes de cianobacterias. Nueve nucleótidos por delante de dicho triplete, se encuentra un posible sitio de unión al ribosoma (Shine y Dalgarno, 1974). La secuencia de este sitio, 5' AAAGGAGG 3', es complementaria al extremo 3' del RNAr 16S de

Anabaena sp. PCC 7120, cuya secuencia es 5' GGAUCACCUCCUUU 3' (Ligon *et al.*, 1991). No se encuentra ninguna secuencia similar delante del triplete ATG del gen *natC*. El gen *natC* de *Anabaena* sp. PCC 7120 posee una longitud de 1131 pb, que determinarían una proteína de 377 aminoácidos, y el gen *nataA* poseería una longitud de 780 pb, que determinarían una proteína de 260 aminoácidos.

La proteína NatC comparte un 33,9% de residuos idénticos con la proteína BraE de *P. aeruginosa* y un 32,4% con la proteína LivM de *S. tiphymurium*, pero el porcentaje de identidades es aún mayor (56,6%) con el producto de la ORF *sll0146* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) (Fig. 25), de modo que la función de la ORF *sll0146* de la estirpe PCC 6803 podría ser similar a la del gen *natC* de *Anabaena* sp. PCC 7120. El perfil de hidrofobicidad de la proteína NatC (Fig. 26) mostró la existencia de varios dominios hidrofóbicos de expansión de membrana, confirmando la posibilidad de que se tratase de la proteína de membrana de un sistema de transporte multicomponente de *Anabaena* sp. PCC 7120. En la Figura 27 se muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína NatA de *Anabaena* sp. PCC 7120 con NatA de *Synechocystis* sp. PCC 6803, BraF de *P. aeruginosa* y LivG de *S. tiphymurium*. El porcentaje de residuos idénticos entre las proteínas NatA de PCC 7120 y PCC 6803 es del 69,5%, entre NatA de PCC 7120 y BraF de *P. aeruginosa* del 40,9% y entre NatA de PCC 7120 y LivG de *S. tiphymurium* del 37,8%.

Dispuesta en sentido contrario a los genes *natC* y *nataA* se encontró una ORF (Fig. 23), cuyo producto es homólogo al producto del gen *pgi*, que determina la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa, de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Sakamoto *et al.*, 1995). Por otra parte, la secuenciación parcial del inserto del plásmido pCSX50 en el extremo opuesto al que contenía al gen *pgi* puso de manifiesto la existencia de otra ORF (Fig. 23), también en sentido contrario al de los genes *natC* y *nataA*, homóloga al gen *hemA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, gen que determina la glutamil-RNAt reductasa (Verkamp *et al.*, 1992). Las secuencias de estas ORFs no se completaron, ya que no parecían estar relacionadas con el transporte de aminoácidos.

Para determinar si existía alguna ORF homóloga al gen *natB* de la estirpe PCC 6803 en la región no secuenciada del plásmido pCSX50, se realizaron experimentos de hibridación en condiciones permisivas, utilizando como sonda el producto de PCR obtenido utilizando como molde el plásmido pCSX10 y como cebadores los oligonucleótidos Tr8 y Tr9 (véase Fig. 18G). No se obtuvieron resultados positivos de hibridación (no mostrado), por lo que no se obtuvo indicación de la existencia de secuencias homólogas a *natB* en el plásmido pCSX50.

TAAACAAGAATGACTATGGACTATTGACTACTGACCAATGACTATTGACCAATGACTAATGATTGAATATTTAATTTTTTTAGCAATTTCTACCGCCACATTTGCCCTGTTTAGCTTGGG 120
natC → M I E Y L I F L A I S T A T F A L F S L G
 ACTGAATTTACAGTGGGGTTTTACGGGGTTAATTAATTTTTGGTCAATATCGCTTTTATGACTTTGGGGGCTTACACTACCGTATTGTTAAGCCTTAAGGGTGTGCCGTTATTTATCTCAGC 240
 L N L Q W G F T G L I N F G H I A F M T L G A Y T T V L L S L K G V P L F I S A
 TATTGTTGGAGCAATTTTCGCCGCTTGTGGGATTGGTATTGGTTTTGCTACTTTGCGTCTGCCGGAAGATTATCTAGCCATTGTCACCATTGGGACGGGAGAATTGATTCGCTTGGT 360
 I V G A I F A A L L G L V I G F A T L R L R E D Y L A I V T I G T G E L I R L V
 GGTGAATAACCAAGATTTACCTGTAGGTGATACCTGGGTATCTGGAGCGTTTGGTGTCCAGAGTTATCCCTATCCCTTTATCCACAGAGCCAAATTTGTTTTTCCGCCTGTTGATGATTGG 480
 V N N Q D L P V G D T W V S G A F G V Q S Y P I P L S T E P N L F F R L L M I G
 AATTTAACGCTGCTGTTTGGCTGTGACTGTATTTTCCTTATGGCGCTGGATTTCGGAACGCGCAGAAATTACAGCTTACTGATGCCGACTGATAAAACAAGTAGCAAGCAAGAAATTCGCTTC 600
 I L T L L F A V T V F S L W R W I R N A Q K L Q L T D A T D K T S S K Q E I A S
 CCGTTTCGGTGTGGGAATTTTATAGGTTACTGGCAACAGCCATTTATATTTCTGGTGTCAATTACACTTTATACTACATCCCAGAAAGCCGTTTAAATGCTGGTTTCGCTGTTGGTATT 720
 R F G V G I I L G L L A T A I Y I S G V I T L Y N Y I P K A G L M L V S L L V L
 GGCCTTTGTTATTTTGGCGGTGGAAATTTTAGTGCATCGCCTTGGGGTTCGTTGTTAAAGCTATCCGCGAAGCAAGAAATAGGTAAAGCAATGGGTAAAAATGCTTTTGGTATAA 840
 A F V F W R L E Y L V R S P W G R V L K A I R E D E E I G K A M G K N V F W Y G
 GCTCAGTCTCTGTTTGGGGGTGCGATCGCTGGTATTCGCGGCTTCTTTGCTTGGCAAATCAGCCCAATTTACTGATAAATTTCCAGCCACAGTAACTTTTACTCTTGGAT 960
 L Q S L M L G G A I A G I A G A F F A W Q I S A I Y P D N F Q P Q L T F D S W I
 TATGGTAATTTTAGGGGGCGCTGGTAATAATATCGCTCAATTTTAGGTGCTGTAATTTACTTCGCTTACGATGCCATTACTCGTGAAGTTTACCAGAAATTTATCCCTTGTGATGAGGC 1080
 M V I L G G A G N N I G S I L G A V I Y F A Y D A I T R E V L P K I I P L D E A
 CGCTCGGGTGCATTCCGCATCATGTGTATTGGTTAATTTTGTATGGTGTGATGATTGGCGGCTCAAGGTATCTTAGGGAAAAGGAGGAACCTACCCTTGGTAAATAACCAAGTCAC 1200
 R L G A F R I M C I G L I L M V L M I W R P Q G I L G K K E E L T L G K
natA → M V N N Q S P
 CCCCACTTCCCCTATTAGCAGCTAGCGGACTTTGCAAGAGTTTGGCGGTATTAAAGCTGTTCAAGAAGCGAGAATCGAAGTTGCACAAGGCAGTATCACTGGCTTGGTGGCCCAATG 1320
 P L P L L A A S G L C K S F G G I K A V Q E A R I E V A Q G S I T G L I G P N G
 GTGCTGGCAAACTACCTTATTTAACCTACTTTCAAACTTATCCGCCAGATAAAGGACGTGTCATTTTGGATGGCGAACCATTCAACAGTTACAGCCGACCAATCGCCCAACAGG 1440
 A G K T T L F N L L S N F I R P D K G R V I F D G E P I Q Q L Q P H Q I A Q Q G
 GTATGGTACGGACTTTTACGGTAGCCGACTCTCTCCAGGCTGTCGGTGTAGAAAATATGCTGCTAGCCGCCAAAAGCAACAGGGGAGAATTTTGGCAGGTACAGTTACAACCCC 1560
 M V R T F Q V A R T L S R L S V L E N M L L A A Q K Q T G E N F W Q V Q L Q P Q
 AGGTAGTTGTTAAGGAAGAGAAGCAGCTGCAAGAACAAGCAATGTTTTGCTGGAATCGGTGGGTTTGGCTAAGAAAGCTTATGAATATGCTGGTGGCTTGTCTGGAGGACAACGCAAGC 1680
 V V V K E E K Q L Q E Q A M F L L E S V G L A K K A Y E Y A G G L S G G Q R K L
 TGCTAGAAATGGGTAGGGCTTTGATGACTAATCCCAAATGATTTTGTGGATGAACCAGCAGCCGAGTCAACCCAGATTAATTTGATGATATTGCGATCGCATCCTCACCTGGAACC 1800
 L E M G R A L M T N P K L I L L D E P A A G V N P R L I D D I C D R I L T W N R
 GTCAGATGGGATGACCTTCTTGATTATCGAACATAACATGGATGTGATCATGTCTTGTGCGATCGTGTGGGTTACTGCTGAAGGACAAAATTTAGCTGATGGAACCTCAGCCGAAA 1920
 Q D G M T F L I I E H N M D V I M S L C D R V W V L A E G Q N L A D G T P A E I
 TCCAACTAATCCCAAGTTTATAGAGCGTATTTAGGCAATAGTTTATGAATTGGGGATTGGGGACTGGGGACAAATTAATTTCTCTTTTATTACCCATTACCCATTACCCACTACCCA 2040
Q T N S Q V L E A Y L G K
TTACC

Figura 24. Secuencia de nucleótidos de la región genómica de *Anabaena* sp. PCC 7120 que contiene los genes *natC* y *natA* y secuencias de aminoácidos de las proteínas deducidas.

Se señalan las repeticiones directas imperfectas localizadas delante del gen *natC* y detrás del gen *natA* (subrayadas), así como un posible sitio de unión al ribosoma (enmarcado entre dos líneas) situado delante del gen *natA*.

NatC-PCC7120	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	50
sll0146	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
BraE-Pseae	~MSQSLKRAL	FSALLVILVS	YPILGLKLRT	VGIKLEV.LG	ADAQTLWTIA		
LivM-Salty	MKPMHIAMAL	FSAAMFFVLA	GVFMGVQLEL	DGTKLVVDTA	ADIRQWIFI		
Identidad	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
NatC-PCC7120	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	100
sll0146	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
BraE-Pseae	AAALAMFVWQ	LFRDRIPKL	GRGVGYKVN	SGLKNFLSLP	STQRWAVLAL		
LivM-Salty	GTAV.VFFFQ	LLRPMFQKAV	KHVSQPKFI.	.LPAIDGST	VRQKLFMLAL		
Identidad	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
NatC-PCC7120	~~~~~	MIEYLIFLAI	STATFALFSL	GLNLQWQFTG	LINFGHIAFM	150	
sll0146	~~~~~	M NFGYLIFLIT	SAATYGFAL	GLNLQWGFAG	LINFGHVAFM		
BraE-Pseae	VVAVFVWPF	ASRGAVDIAT	LILYVMLGI	GLNIVVGLAG	LLDLGYVGFY		
LivM-Salty	LVIAVAWPFM	VSRGSVDIAT	MTMIYIILGL	GLNVVVLGSG	LLVLGYGGFY		
Identidad	~~~~~	-----	-----	GLN---G--G	L---G---F-		
NatC-PCC7120	TLGAYTTVLL	S.LKGVPLFI	SAIVGAIFAA	LLGLVIGFAT	LRLREDYLAI	200	
sll0146	TLGAYATLL	S.LRGLPIPL	AVLVGMGLAM	ALGLLIGTST	LRLREDYLAI		
BraE-Pseae	AVGAYTYALL	AEYAGFGFWT	ALPIAGMMAA	LFGLLGFVP	LRLRGDYLA		
LivM-Salty	AI GAYTFALL	NHYGLGFWT	CLPLAGLVSA	AAGFLLGFV	LRLRGDYLA		
Identidad	--GAY--LL	---G---	-----	--G---G-	LRLR-DYLAI		
NatC-PCC7120	VTIGTGELIR	LVVNNQDLPV	GDTWVSGAFG	VQSYPIPLST	EPNLFRLLM	250	
sll0146	VTIGVSELIR	LIANNE....	.EWLTQGTFG	VQSFPPWMDP	NPTLLSRIVF		
BraE-Pseae	VTLGFGEIIR	ILLRNMTEIT	G....GPNG	IGSIP....	KPTLFG....		
LivM-Salty	VTLGFGEIVR	ILLLNTEIT	G....GPNG	ISQIP....	KPTLFG....		
Identidad	VT-G-E--R	----N----	-----G--G	----P----	-P-L-----		
NatC-PCC7120	IGILTLLFAV	TVFSLWRWIR	NAQKLQLTDA	TDKTSSKQEI	ASRFGVGIIL	300	
sll0146	VIWLTVLTIIY	AESILIKSLL	KQWK.EGKKI	QGKSYQPRKP	LALLIWGITI		
BraE-PseaeLTFERRAP	E.GMQTFHEF	FGIAYNTNY.		
LivM-SaltyLEFSRSTR	EGGWDTFSNF	FGVKYDPSD.		
Identidad	-----	-----	-----	-----	-----		
NatC-PCC7120	GLLATAIYIS	GVITLYNYIP	KAGMLVSL	VLAFVFWRLE	YLVRSPWGRV	350	
sll0146	TALILTAYVP	GVVSLYNYSG	KAGMLLALT	LLALTYAGLE	FVHSPWGRI		
BraE-Pseae	KVILLY....VVALL	LVLLALFVIN	RLMRMPIGRA		
LivM-Salty	RVIFLY....LVALL	LVVLSLFVIN	RLLRMPLGRA		
Identidad	-----	-V--LY---	-----L-	-----	-----P-GR-		
NatC-PCC7120	LKAIREDEEI	GKAMGKNVFW	YKLQSLMLGG	AIAGIAGAFF	AWQISAIYPD	400	
sll0146	LKAIREDEEI	PRALGKNVFW	YKLQAFMGGG	AIAGLAGALF	AWQLTSIYPS		
BraE-Pseae	WEALREDEVA	CRALGLNPTI	VKLSAFTTGA	SFAGFAGSFF	AARQGLVTPE		
LivM-Salty	WEALREDEIA	CRSLGLSPTR	IKLTAFTTISA	AFAGFAGTLF	AARQGFVSPE		
Identidad	--A-REDE--	----G----	-KL-----	--AG-AG--F	A-----P-		
NatC-PCC7120	NFQPQLTFDS	WIMVILGGAG	NNIGSILGAV	IYFAYDAITR	EVLPKIIPLD	450	
sll0146	NFDTLTTFNA	WIIVVLGGAG	SNAGTVLGTI	IFWAYDSLTR	FLLPQIAFLD		
BraE-Pseae	SPTFIESAMI	LAIIVLGGMG	SQLGVILAAV	VMVLLQE.MR	GF.....		
LivM-Salty	SPTFAESAFV	LAIIVLGGMG	SQFAVILAAV	LLVVSRELMR	DF.....		
Identidad	-F-----	---V-LGG-G	-----L---	-----R	-----		
NatC-PCC7120	EARLGAFRIM	CIGLILMVL	IWRPQGILGK	KEELTLGK~	~~~~~	497	
sll0146	QSQAGALRVM	VIGLILMVL	VWRPQGILGK	KEELTLGR~	~~~~~		
BraE-Pseae	...NEYRML	IFGLTMIVMM	IWRPQGLLPM	QRPHELEK~	~~~~~		
LivM-Salty	...NEYSML	MLGGLMVLMM	IWRPQGLLPM	TRPQLKLGK	QAKGEQA		
Identidad	-----	--G-----M	-WRPQG-L-	-----	~~~~~		

Figura 25. Comparación de la secuencia de aminoácidos del producto del gen *natC* de *Anabaena* sp. PCC 7120 con la del producto hipotético de la ORF *sll0146* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y con las de las proteínas BraE de *Pseudomonas aeruginosa* y LivM de *Salmonella typhimurium*.

La comparación se realizó mediante el programa PILEUP contenido en el paquete informático GCG (Devereux *et al.*, 1984). Los residuos conservados en todas las proteínas se presentan en la última línea de la comparación (Identidad).

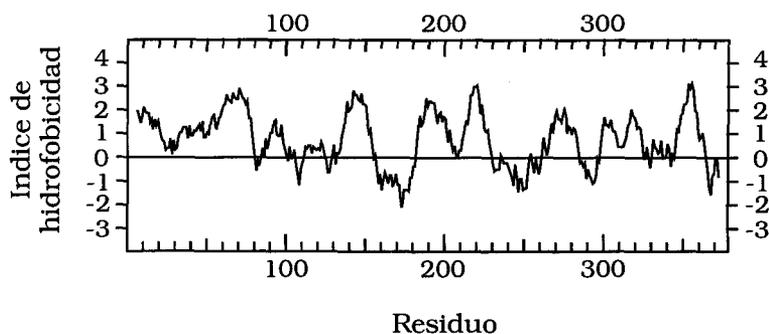


Figura 26. Perfil de hidrofobicidad de la proteína NatC de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Se indica el índice de hidrofobicidad calculado según Kyte y Doolittle (1982).

Nata-PCC7120	~~~~~MVN	NQSPPLPLLA	ASGLCKSFGG	IKAVQEARIE	VAQGSITGLI	50
Nata-PCC6803	MSDRITPAEN	LGSPESLLL	AQGLSKSFGG	LRAVDHADIV	VKEGSITGLI	
BraF-Pseae	~~~~~	~MSRPIL	VSGLTMRFGG	LLAVNGVNLK	VEEKQVSMI	
LivG-Salty	~~~~~	~MSQPLLA	VNGLMMRFGG	LLAVNVSLE	LREREIVSLI	
Identidad	~~~~~	-----L-	--GL---FGG	--AV-----	-----I	
Nata-PCC7120	GPNGAGKTTL	FNLLSNFIRP	DKGRVIFDGE	PIQQLQPHQI	AQQGMVRTFQ	100
Nata-PCC6803	GPNGAGKTTL	FNLLSNFIRP	DQGEVLFNGD	SIGQLAPHQI	ALRGSVRTFQ	
BraF-Pseae	GPNGAGKTTV	FNCLTGFYQP	TGGLIRLDGE	EIQGLPGHKI	ARKGVVRTFQ	
LivG-Salty	GPNGAGKTTV	FNCLTGFYKP	TGGTITLRER	HLEGLPGQOI	ARMGVVRTFQ	
Identidad	GPNGAGKTT-	FN-L--F--P	--G-----	----L----I	A--G-VRTFQ	
Nata-PCC7120	VARTLSRLSV	LENMLLAAQK	QTGENFWQVQ	LQPQVVVKEE	KQLQEQAMFL	150
Nata-PCC6803	VAKVLSRLTV	LENMLLADQH	QTGEKFLPRL	INFRRVQKEE	RANREKAMAM	
BraF-Pseae	NVRLFKEMTA	VENLLVAQHR	HLNTNFLAGL	FKTPAFRRSE	REAMEYAAHW	
LivG-Salty	HVRLFREMTV	IENLLVAQHQ	QLKTGLFSGL	LKTPAFRRAQ	SEALDRAATW	
Identidad	-----	-EN-L-A--	-----	-----	-----A--	
Nata-PCC7120	LESVGLAKKA	YEYAGGLSGG	QRKLEMGRA	LMTNPKLILL	DEPAAGVNPR	200
Nata-PCC6803	LESVGLGAKA	QDYAGALSGG	QRKLEMARA	LMSNPKLILL	DEPAAGVNPT	
BraF-Pseae	LEEVNLTEFA	NRSAGTLAYG	QORRLEIARC	MMTRPRIIML	DEPAAGLNPK	
LivG-Salty	LERIGLLEHA	NRQASNLAYG	DQRRLEIARC	MVTQPEILML	DEPAAGLNPK	
Identidad	LE---L---A	---A--L--G	----LE--R-	----P---L	DEPAAG-NP-	
Nata-PCC7120	LIDDICDRIL	TWNRQDGMTF	LIIEHNMDVI	MSLCDRVVWL	AEQNLADGT	250
Nata-PCC6803	LIGIQCEHIV	NWNRQ.GITF	LVIEHNMDVI	MTLCHHVVWL	AEGRLADGT	
BraF-Pseae	ETDDLKALIA	KLRSEHNVTV	LLIEHDMKLV	MSISDHIVVI	NQGAPLADGT	
LivG-Salty	ETKELDELIA	ELRNHHNTTI	LLIEHDMKLV	MGISDRIYVV	NQGTPLANGT	
Identidad	-----I-	-----T-	L-IEH-M--	M-----V-	--G--LA-GT	
Nata-PCC7120	PAEIQTNSQV	LEAYLGK~	268			
Nata-PCC6803	PEQIQSDPRV	LEAYLGDS				
BraF-Pseae	PEQIRDNPV	IKAYLGEA				
LivG-Salty	PEEIRNPDV	IRAYLGEA				
Identidad	P--I-----V	--AYLG--				

Figura 27. Comparación de la secuencia de aminoácidos del producto del gen *nata* de *Anabaena* sp. PCC 7120 con la de las proteínas *NataA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, *BraF* de *Pseudomonas aeruginosa* y *LivG* de *Salmonella typhimurium*.

La comparación se realizó mediante el programa PILEUP contenido en el paquete informático GCG (Devereux *et al.*, 1984). Los residuos conservados en todas las proteínas se presentan en la última línea de la comparación (Identidad).

3.4.2. Inactivación de los genes *nataA* y *nataC* de *Anabaena* sp. PCC 7120 y actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes generados

Con objeto de determinar el papel de los genes *nataA* y *nataC* de *Anabaena* sp. PCC 7120, se procedió a su inactivación mediante la inserción de la casete de resistencia a Sm y Sp C.S3 (véase Tabla 3, Materiales y Métodos). Esta casete posee terminadores de la transcripción y tiene una longitud de 2 kb.

Para la inactivación del gen *nataA* (Fig. 28A) el plásmido pCSX50 se digirió con *HindIII*, lo cual provocó una deleción de un fragmento de 0,5 kb que incluía los 325 últimos nucleótidos del gen. La casete C.S3, escindida con *HindIII*, se insertó en pCSX50, originándose el plásmido pCSX55. Posteriormente, el inserto del plásmido pCSX55 se escindió con *XbaI* y se clonó en el vector pRL278 (véase Tabla 3, Materiales y Métodos) digerido con la misma enzima, generándose el plásmido pCSX60. Este plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, seleccionándose la resistencia a Sm y Sp. Se eligió un clon que era además resistente a la sacarosa y sensible a la Nm, lo que indicaba que había incorporado la construcción transferida mediante recombinación doble (véase Materiales y Métodos). Este mutante se denominó CSX60.

Para la generación de los mutantes insercionales del gen *nataC* (Fig. 28A), el plásmido pCSX36 se digirió con *EcoNI* y, tras rellenar los extremos de los fragmentos obtenidos con la enzima Klenow, se ligó con la casete C.S3 escindida con *HincII*, originándose así el plásmido pCSX61. Posteriormente, el inserto de este plásmido se escindió mediante una digestión doble *XhoI-SalI* y se clonó en el vector pRL278 digerido con *XhoI*, originándose el plásmido pCSX62. Este plásmido se transfirió a *Anabaena* sp. PCC 7120 mediante conjugación, como en el caso anterior, y se seleccionó un clon, que se denominó CSX62, que era resistente a Sm, Sp y sacarosa y sensible a la Nm.

La estructura cromosómica de los mutantes CSX60 y CSX62 se analizó mediante hibridación utilizando DNA total de estas estirpes digerido con *NheI*. En el caso del mutante CSX60 se empleó como sonda el inserto del plásmido pCSX51 (véase Fig. 23), y en el caso de la estirpe CSX62 se utilizó el fragmento *HindIII-NheI* de 2,3 kb del plásmido pCSX36 (Fig. 28A). Los resultados obtenidos mostraron que ambos mutantes tenían la estructura esperada y que estaban completamente segregados, de modo que, en el caso de la estirpe CSX60, el fragmento *NheI* silvestre de 1,7 kb había sido sustituido por un fragmento *NheI* de 3,2 kb (Fig. 28B) y, en el caso del mutante CSX62, el fragmento *NheI* silvestre de 2,4 kb por otro de 4,4 kb (Fig. 28C).

Se midieron las actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX60 y CSX62 (Tabla 23), observándose en ambos una actividad muy reducida de transporte de los aminoácidos Gly, Leu, Phe y Pro, a la vez que la actividad de transporte de otros aminoácidos neutros como la Ala, la Gln y la Ser se encontraba parcialmente afectada. Las actividades de transporte de aminoácidos básicos y ácidos no se vieron

significativamente alteradas. Este fenotipo de transporte es similar al del mutante espontáneo resistente a la azaleucina CS343 (véase Tabla 10), lo que sugiere que los genes *natA* y *natC* de *Anabaena* sp. PCC 7120 podrían determinar elementos del sistema de transporte de aminoácidos neutros N-I mutado en la estirpe CS343.

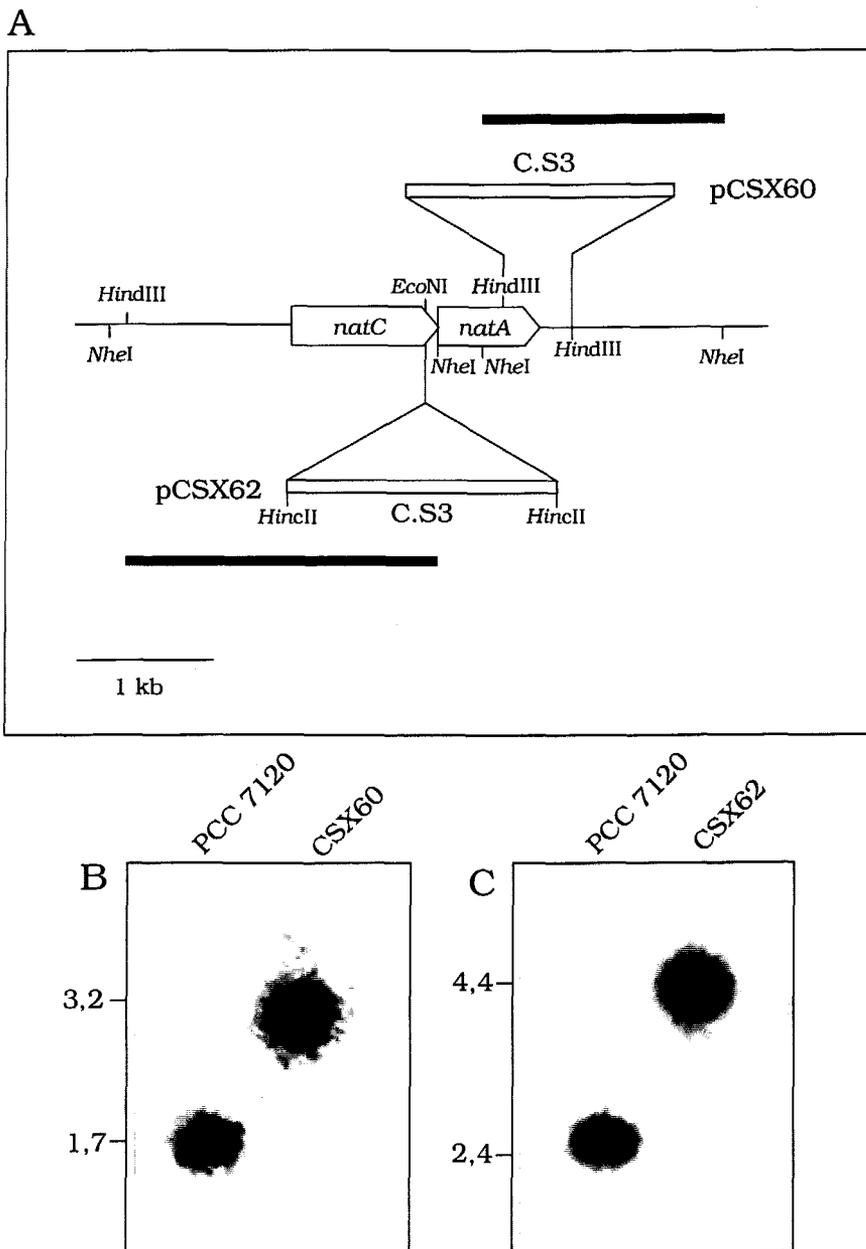


Figura 28. Estructura cromosómica de los mutantes CSX60 y CSX62 derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120 en la zona que contiene los genes *natC* y *natA*.

En el panel A se muestra de forma esquemática la región genómica de *Anabaena* sp. PCC 7120 que contiene a los genes *natC* y *natA*, y se indican las dianas de restricción utilizadas para la inserción de la casete de resistencia a Sm/Sp C.S3 en dichos genes, originándose los plásmidos pCSX60 y pCSX62, los cuales se transfirieron mediante conjugación a la estirpe PCC 7120 para originar los mutantes CSX60 y CSX62, respectivamente. Con trazo más grueso se indican las sondas utilizadas para la comprobación de la estructura cromosómica de dichos mutantes. En los paneles B y C se muestran los resultados de las hibridaciones correspondientes, realizadas en condiciones restrictivas, utilizando DNA de las estirpes indicadas digerido con la enzima de restricción *NheI*. A la izquierda de las figuras B y C se indica el tamaño de las bandas en kb.

Tabla 23. Actividades de transporte de aminoácidos de los mutantes CSX60 y CSX62 derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120.

Células cultivadas en medio BG11, suplementado con Sm y Sp en el caso de los mutantes, se sometieron a ensayos de transporte de los aminoácidos indicados, suministrados a concentración 10 μ M, de 10 min de duración. Los datos se presentan como porcentaje de la actividad de transporte mostrada por la estirpe silvestre PCC 7120 y son la media de 2-5 determinaciones independientes en cada caso.

Aminoácido sustrato	Actividad de transporte (%)	
	Estirpe:	
	CSX60	CSX62
<i>Básicos</i>		
Arg	90	97
His	65	90
Lys	84	94
<i>Neutros</i>		
Ala	15	13
Gln	71	66
Gly	5	5
Leu	4	5
Phe	3	3
Pro	<1	<1
Ser	27	23
<i>Ácidos</i>		
Asp	161	164

3.4.3. Crecimiento diazotrófico de los mutantes *natA* y *natC* de *Anabaena* sp. PCC 7120

Debido a que los mutantes *natA* y *natC* de *Anabaena* sp. PCC 7120 presentaban el mismo fenotipo de transporte de aminoácidos que el mutante CS343, parcialmente afectado en el crecimiento a expensas de nitrógeno atmosférico, se procedió a determinar la capacidad de crecimiento diazotrófico de los mutantes CSX60 y CSX62. Para ello se realizaron curvas de crecimiento en medio conteniendo nitrato como fuente de nitrógeno o carente de nitrógeno combinado. En presencia de nitrato, las tasas de crecimiento de los mutantes fueron similares a la de la estirpe silvestre PCC 7120 (Fig. 29A). Sin embargo, como ocurría también en el caso del mutante CS343, en medio sin nitrógeno combinado la tasa de crecimiento de los mutantes CSX60 y CSX62 era aproximadamente un 65% de la exhibida por la estirpe silvestre (Fig. 29B).

La Figura 30 muestra el aspecto de unos cultivos de las estirpes CSX60 y CSX62 en medio carente de nitrógeno combinado inoculados con células cultivadas con nitrato. Puede observarse una manifiesta incapacidad de crecimiento diazotrófico de ambas estirpes bajo estas condiciones. La observación al microscopio óptico de muestras de cultivos de estos mutantes en medio sin nitrógeno combinado puso de manifiesto una notable fragmentación de sus filamentos celulares (no mostrado), fenómeno que también ocurre en el caso del mutante espontáneo CS343 (véase Fig. 11C).

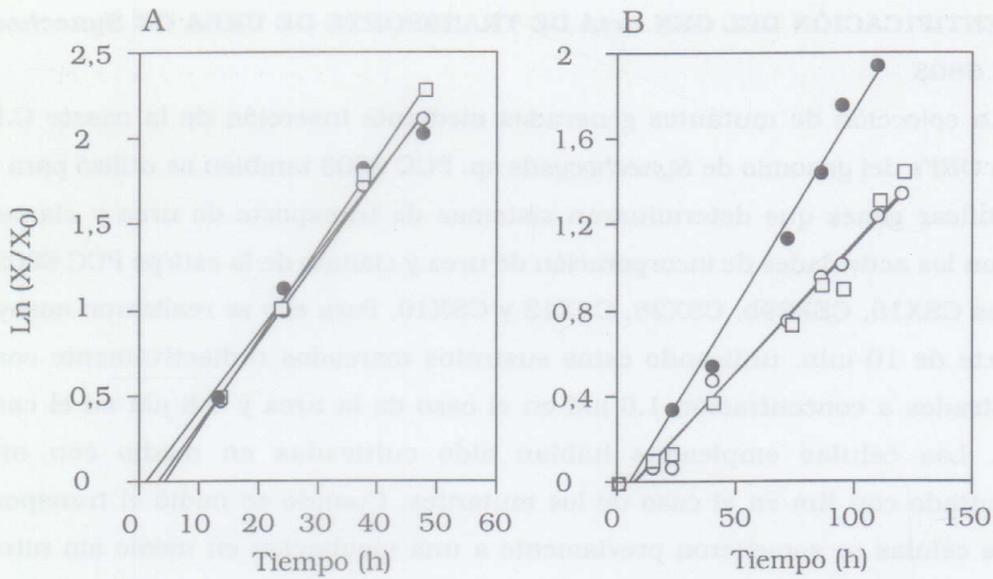


Figura 29. Curvas de crecimiento, utilizándose nitrato o dinitrógeno como fuente de nitrógeno, de los mutantes CSX60 y CSX62 derivados de *Anabaena sp.* PCC 7120.

Células de las estirpes PCC 7120 (●), CSX60 (□) y CSX62 (○), cultivadas en medio BG11 (suplementado con Sm y Sp en el caso de los mutantes) (A) o en medio BG11₀ (sin antibióticos) (B), se lavaron y resuspendieron en medio BG11 (A) o BG11₀ (B) sin antibióticos y se incubaron en condiciones de cultivo. A distintos tiempos se tomaron muestras para la determinación de la concentración de proteína de los cultivos. X, μg de proteína $\cdot\text{ml}^{-1}$ tras X horas de cultivo; X₀, μg de proteína $\cdot\text{ml}^{-1}$ a tiempo cero.



Figura 30. Inducción del crecimiento diazotrófico de los mutantes CSX60 y CSX62 derivados de *Anabaena sp.* PCC 7120.

Células cultivadas en medio BG11 (sin análogos), se recogieron y se lavaron con medio BG11₀ (sin nitrógeno combinado) y se utilizaron para inocular matraces conteniendo el mismo medio, a razón de $1 \mu\text{g Chl} \cdot \text{ml}^{-1}$. La fotografía muestra el aspecto de los cultivos tras 111 h de incubación en condiciones de cultivo.

3.5. IDENTIFICACIÓN DEL GEN *urtA* DE TRANSPORTE DE UREA DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

La colección de mutantes generados mediante inserción de la casete C.K3 en diversas ORFs del genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 también se utilizó para tratar de identificar genes que determinaran sistemas de transporte de urea y cianato. Se ensayaron las actividades de incorporación de urea y cianato de la estirpe PCC 6803 y los mutantes CSX15, CSX29b, CSX26, CSX13 y CSX19. Para ello se realizaron ensayos de transporte de 10 min, utilizando estos sustratos marcados radiactivamente con ^{14}C suministrados a concentración 1,6 μM en el caso de la urea y 0,8 μM en el caso del cianato. Las células empleadas habían sido cultivadas en medio con nitrato, suplementado con Km en el caso de los mutantes. Cuando se midió el transporte de urea, las células se sometieron previamente a una incubación en medio sin nitrógeno combinado durante 8-10 horas.

Ninguno de los mutantes mostró una actividad de incorporación de cianato significativamente inferior a la de la estirpe silvestre, pero la estirpe CSX29b, en la que se había inactivado la ORF *sl0374* (Fig. 18D), mostró una actividad muy inferior de incorporación de urea (Tabla 24). Las actividades de incorporación de urea y cianato también se determinaron en el mutante CSX14 (Fig. 18A), a pesar de no estar segregado, resultando valores similares a los obtenidos con la estirpe silvestre (no mostrado).

Tabla 24. Actividades de transporte de urea y cianato de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de los mutantes CSX15, CSX29b, CSX26, CSX13 y CSX19 derivados de la misma.

Células que se habían cultivado en medio BG11, suplementado con Km en el caso de las estirpes mutantes, sometidas a carencia de nitrógeno durante 8-10 horas en el caso del transporte de urea, se utilizaron en ensayos de transporte de 10 min de duración en los que se empleó [^{14}C]urea 1,6 μM o [^{14}C]cianato 0,8 μM como sustrato. Los valores presentados son el resultado de una única determinación (tres determinaciones en el caso del transporte de urea en la estirpe CSX29b).

Estirpe	Actividad de transporte (nmol·mg ⁻¹ Chl en 10 min)	
	Sustrato:	
	Urea	Cianato
PCC 6803	202	34
CSX15	108	31
CSX29b	4	67
CSX26	91	43
CSX13	333	69
CSX19	84	52

Dado que la actividad de transporte se estimaba midiendo la radiactividad intracelular tras la incubación de las células en presencia de [^{14}C]urea, la detección de un menor nivel de radiactividad en el interior celular podía deberse a una mutación que

afectara al sistema de transporte de este sustrato o, alternativamente, a una mutación que afectara a la enzima ureasa. Esta enzima metaboliza rápidamente la urea intracelular y permite que el átomo de carbono radiactivo de la urea marcada quede incorporado en otros compuestos. Gracias a ello se puede medir la radiactividad retenida en las células, ya que, de otro modo, la urea se perdería del interior celular durante el proceso de lavado que incluye el ensayo de transporte (Valladares *et al.*, en preparación). Para descartar la posibilidad de que el mutante CSX29b estuviera afectado en la actividad ureasa, se determinó dicha actividad utilizando suspensiones de células que se habían cultivado en medio con nitrato. En el caso de la estirpe silvestre PCC 6803, la actividad detectada fue de 2,71 μmol de NH_4^+ producido $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl, y para el mutante CSX29b, 2,83 μmol de NH_4^+ producido $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Chl.

Para confirmar el papel de la ORF *sll0374* en el transporte de urea, se generó el mutante CSX29a, en el que la casete C.K3 se insertó en la misma orientación que la ORF, a diferencia de lo que ocurre en el mutante CSX29b en el que la casete se encuentra insertada en sentido opuesto (Fig. 18D). Se determinó la actividad de incorporación de urea de la estirpe CSX29a en suspensiones celulares cultivadas en medio con nitrato, obteniéndose un valor que representaba un 1,1% del de la estirpe silvestre, de modo similar a lo que ocurría en el caso del mutante CSX29b (1,9 %).

Los resultados obtenidos sugieren que la ORF *sll0374* determina un componente del sistema de transporte de urea de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Dada la homología del producto de la ORF *sll0374* con los componentes conservados de numerosos sistemas de transporte de tipo multicomponente (Tabla 18), se puede deducir también que este sistema de transporte de urea ha de ser de tipo ABC o multicomponente. Este gen se denominó *urtA*.

Se analizó la presencia de secuencias homólogas a la del gen *urtA* en otras cianobacterias, para lo cual se llevó a cabo un análisis de Southern en condiciones permisivas, utilizando DNA genómico de diferentes estirpes y, como sonda del gen *urtA*, un fragmento de DNA de 581 pb que contenía 20 pb situados delante del codón de iniciación del gen y los primeros 561 pb del mismo. Este fragmento se obtuvo digiriendo con *XbaI* el producto de PCR obtenido utilizando como molde el plásmido pCSX25 (Tabla 19) y como cebadores los oligonucleótidos Tr22 y Tr23 (Fig. 18D).

En todas las estirpes analizadas se encontraron bandas de hibridación con la sonda del gen *urtA* (Fig. 31). En el carril correspondiente al DNA del propio *Synechocystis* sp. PCC 6803 se encontraron dos bandas de hibridación. La banda superior correspondía al tamaño esperado considerando la situación de las dianas *DraI* localizadas a ambos lados del gen (unas 7 kb). La banda adicional de 3,6 kb podría deberse a la existencia de otro gen homólogo a *urtA* en la estirpe PCC 6803.

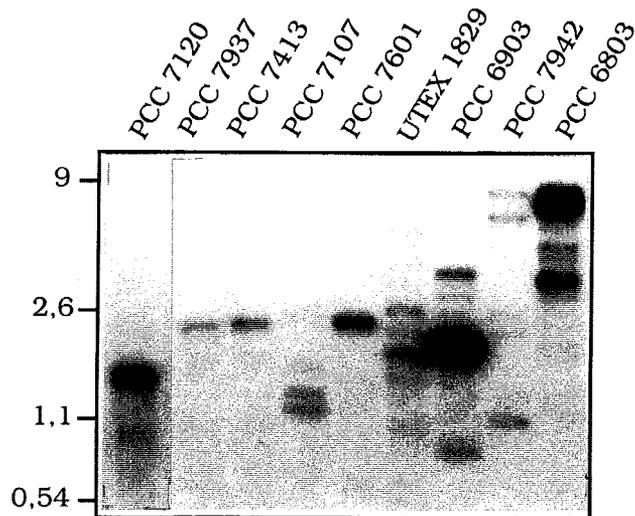


Figura 31. Presencia de secuencias homólogas al gen *urtA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en otras estirpes de cianobacterias.

DNA total de las estirpes indicadas se digirió con las siguientes enzimas: *MvaI* en el caso de las estirpes PCC 7413, PCC 7107, PCC 7601 y UTEX 1829, *DraI* en el caso de las estirpes PCC 7120, PCC 6903 y PCC 6803 y *EcoRV* en el caso de las estirpes PCC 7937 y PCC 7942. Las hibridaciones se realizaron en condiciones permisivas (véase Materiales y Métodos). Las posiciones ocupadas por los patrones se indican a la izquierda, así como su tamaño en kb.

3.6. TRANSPORTE DE AMONIO/METILAMONIO: CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *amt1*, *amt2* Y *amt3* DE *Synechocystis* sp. PCC 6803

En el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996) se encuentran tres ORFs cuyos productos hipotéticos muestran homología con el recientemente identificado transportador de amonio/metilamonio AMT1 de la planta *Arabidopsis thaliana* (Ninnemann *et al.*, 1994). Nuestro interés por los procesos de transporte de compuestos nitrogenados nos llevó al estudio del transporte de amonio (metilamonio) en la estirpe PCC 6803 y a la clonación e inactivación de dichas ORFs, con objeto de establecer si en efecto tenían un papel en el transporte de amonio.

3.6.1. Caracterización del transporte de amonio/metilamonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803

La dificultad de trabajar con el sustrato NH_4^+ marcado radiactivamente en el átomo de N es la causa de que tradicionalmente se haya empleado un análogo estructural de dicho sustrato, el compuesto CH_3NH_3^+ , marcado con ^{14}C , para estudios de transporte.

Se determinó la actividad de transporte de metilamonio utilizando células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que habían sido cultivadas en medio con amonio e incubadas durante 6 horas en medio sin nitrógeno combinado. Cuando se suministraba metilamonio marcado a concentración $1 \mu\text{M}$, se encontraba una fase rápida de

transporte durante los dos primeros minutos, y una fase más lenta, que mostraba una dependencia lineal respecto al tiempo, que se mantenía aproximadamente durante 8 min más (Fig. 32).

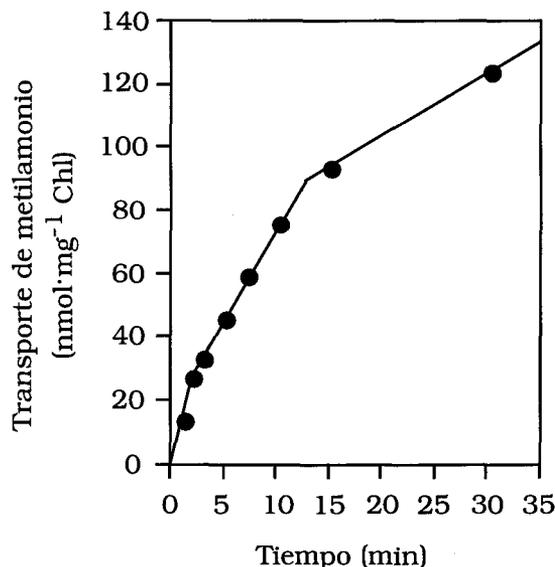


Figura 32. Cinética de la actividad de transporte de metilamonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células cultivadas en medio BG110 suplementado con amonio (2,5 mM) y sometidas posteriormente a deficiencia de nitrógeno durante 6 h se incubaron con [¹⁴C]metilamonio, suministrado a concentración 1 μM, determinándose la incorporación de radiactividad en las células tras distintos tiempos de incubación (1, 2, 3, 5, 7, 10, 15 y 30 min).



Para averiguar si el NH_4^+ tiene un efecto inhibitorio sobre el transporte de metilamonio, se utilizaron suspensiones celulares de la estirpe PCC 6803 cultivadas en medio con nitrato e incubadas en medio sin nitrógeno combinado durante 6 horas antes de los ensayos. Se midió la incorporación de [¹⁴C]metilamonio, suministrado a concentración 7,9 μM, a distintos tiempos antes y después de la adición de NH_4^+ (25 μM) a la mezcla de ensayo. La Figura 33 muestra cómo la adición de NH_4^+ a la suspensión celular provocaba una inhibición total de la incorporación de metilamonio, indicando una preferencia del sistema (o los sistemas) de transporte por el sustrato NH_4^+ . El transporte de metilamonio se reestablecía unos minutos después, presumiblemente tras el consumo total del amonio añadido. Estos resultados, junto con la observación de que *Synechocystis* sp. PCC 6803 es incapaz de crecer utilizando metilamonio como fuente de nitrógeno (datos no mostrados), sugerían que el NH_4^+ es el sustrato natural del sistema (o los sistemas) que median el transporte de metilamonio en esta cianobacteria.

Para determinar si el transporte de metilamonio era concentrativo y comprobar el destino metabólico de dicho sustrato, se analizó mediante TLC unidimensional y autorradiografía una muestra del extracto celular de la estirpe PCC 6803 obtenido tras

hervir las células utilizadas en un ensayo de transporte de 9 min de duración en el que se había suministrado [^{14}C]metilamonio a concentración 1 μM . La suspensión celular empleada procedía de un cultivo en medio con nitrato incubado durante 6 h en medio sin nitrógeno combinado. También se incluyó en este experimento un extracto de células de la estirpe PCC 6803 tratadas como en el caso anterior, pero que además habían sido sometidas a un tratamiento con 1 mM de MSX durante 25 min antes del ensayo de transporte. El tratamiento con MSX pretendía inhibir la enzima glutamina sintetasa, ya que en *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Anabaena variabilis* se ha descrito que el metilamonio es incorporado a Glu por la acción de la glutamina sintetasa para originar γ -metilglutamina (Boussiba *et al.*, 1984; Rai *et al.*, 1984). Como se recoge en la Tabla 25, en el extracto de la estirpe PCC 6803 se observó una mancha mayoritaria correspondiente al compuesto γ -metilglutamina y una mancha minoritaria que co-cromatografiaba con metilamonio. Los valores de radiactividad encontrados permitieron establecer una relación entre la concentración de metilamonio intracelular (deducida según la radiactividad específica del [^{14}C]metilamonio) y la extracelular (al final del experimento de transporte) de 57 veces. Cuando las células se trataron con MSX, la radiactividad correspondiente al metilamonio permaneció invariable, mientras que se observó una fuerte disminución (del 96%) de la radiactividad asociada a γ -metilglutamina. En este caso se encontró una concentración intracelular de metilamonio 35 veces superior a la concentración extracelular.

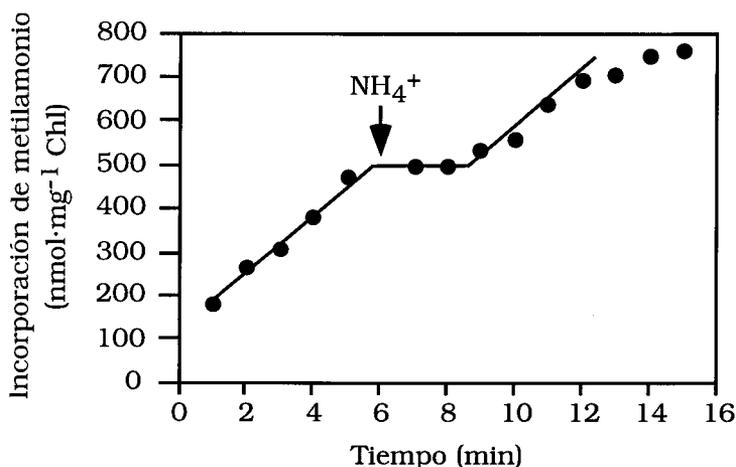


Figura 33. Inhibición por amonio del transporte de metilamonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células que se habían cultivado en medio BG11 y sometidas posteriormente a carencia de nitrógeno durante 6 h, se emplearon en ensayos de transporte de [^{14}C]metilamonio suministrado inicialmente a concentración 7,9 μM . Se tomaron muestras a intervalos de 1 min, antes y después de la adición de amonio 25 μM (indicado en la figura con una flecha) que se utilizaron para determinar la radiactividad retenida por las células.

Tabla 25. Destino metabólico del metilamonio suministrado en los ensayos de transporte en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células cultivadas en medio BG11 y sometidas posteriormente a deficiencia de nitrógeno durante 6 h se emplearon en ensayos de transporte de [^{14}C]metilamonio suministrado a concentración 1 μM . Antes del ensayo, una parte de la suspensión celular se incubó durante 25 min a 30°C con iluminación en presencia de MSX a concentración 1 mM. Tras 9 min de ensayo de transporte, se tomaron, filtraron e hirvieron muestras para obtener extractos celulares, que fueron analizados mediante TLC unidimensional y autorradiografía, midiéndose las CPM (cuentas por minuto) asociadas a las manchas radiactivas correspondientes. La eficiencia para ^{14}C del detector bidimensional de radiación β InstantImager empleado es del 1,5%.

Pretratamiento con MSX	Marcaje en metilamonio (CPM)	Marcaje en γ -metilglutamina (CPM)
-	1,24	33,00
+	1,37	1,18

Tabla 26. ORFs del genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cuyos productos hipotéticos muestran homología con la permeasa AMT1 de *Arabidopsis thaliana*.

Se indica la longitud en número de aminoácidos (aa) de los productos de las tres ORFs. El porcentaje de residuos idénticos a los de AMT1 se calculó mediante el programa GAP contenido en el paquete informático GCG (Devereux *et al.*, 1984). La posición relativa aproximada de las ORFs en el genomio de la estirpe PCC 6803 se indica (en kb) según el sistema de referencia establecido por Kaneko *et al.* (1996).

ORF	Longitud (aa)	Residuos idénticos a los de AMT1 (%)	Posición (kb)
<i>sll0108</i>	507	37,0	2971
<i>sll1017</i>	442	37,9	402
<i>sll0537</i>	541	33,1	3242

3.6.2. Inactivación de las ORFs *sll0108*, *sll1017* y *sll0537* y actividades de transporte de metilamonio de los mutantes generados

Se procedió a la inactivación de las ORFs de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que muestran homología con la permeasa AMT1 de *A. thaliana* (Tabla 26). Para la amplificación mediante PCR de fragmentos de DNA correspondientes a las ORFs *sll0108*, *sll1017* y *sll0537* se utilizó DNA genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803 como molde y, como cebadores, las parejas de oligonucleótidos Tr18-Tr19, Tr2a-Tr2b y Tr3a-Tr3b, respectivamente (Fig. 34). Estos fragmentos (de entre 971 y 1023 pb) se clonaron en el vector pGEM-T, originándose los plásmidos pCSX23, pCSX53 y pCSX52 (Tabla 27). Con objeto de eliminar la diana *HincII* presente en el sitio de clonación múltiple de pCSX23 para facilitar la inserción de la casete C.K3 (véase Tabla 3, Materiales y Métodos), el plásmido pCSX23 se digirió con las enzimas de restricción *ApaI* y *PstI*, clonándose el fragmento que contenía el inserto en el plásmido pBluescript SK(+) digerido con las mismas enzimas, originándose así el plásmido pCSX46. La casete de resistencia a Km

C.K3 (1,1 kb), escindida con extremos *Sma*I, se insertó, en cada una de las dos posibles orientaciones, en el sitio único *Hinc*II del plásmido pCSX46, para dar lugar a los plásmidos pCSX47a y pCSX47b. Por otra parte, la casete de resistencia a Cm C.C1 (1,9 kb) (véase Tabla 3, Materiales y Métodos), escindida con extremos *Hinc*II se insertó en el sitio único *Msc*I del plásmido pCSX53 para originar el plásmido pCSX57, y en el sitio único *Msc*I de pCSX52 para generar el plásmido pCSX56 (Tabla 27). Esta casete C.C1 no posee terminadores de la transcripción.

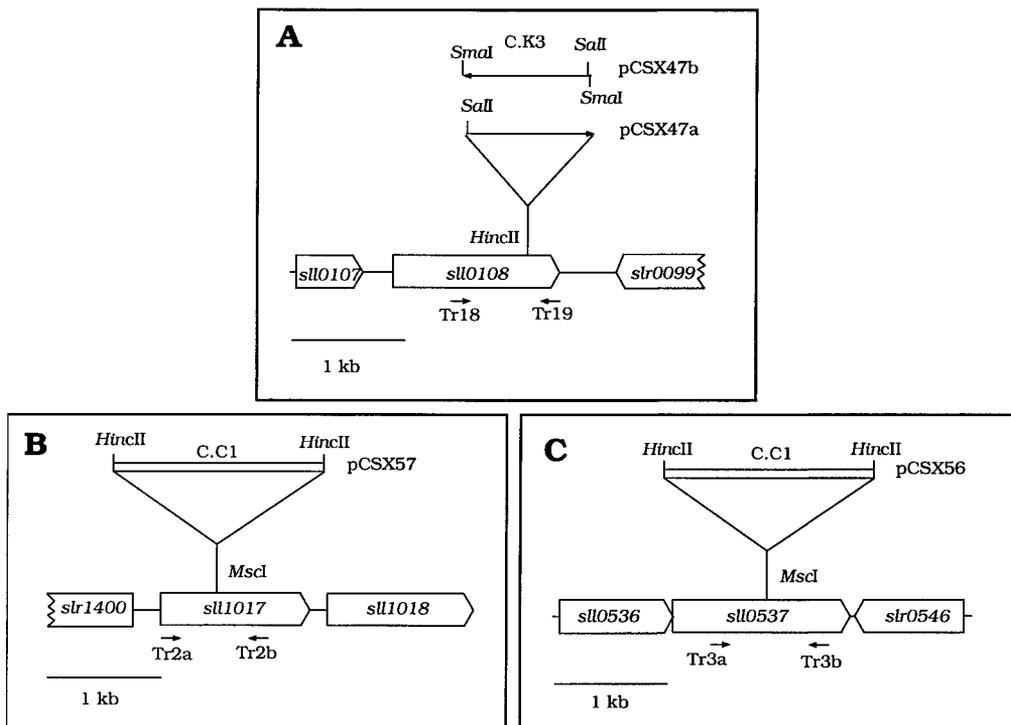


Figura 34. Representación esquemática de las ORFs *sll0108*, *sll0107* y *sll0537* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y de las inserciones llevadas a cabo en las mismas.

En el esquema se indican las ORFs de la estirpe PCC 6803 cuyos productos hipotéticos muestran homología con la permeasa del amonio/metilamonio AMT1 de *Arabidopsis thaliana*, así como las ORFs adyacentes. También se indican las posiciones de los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación mediante PCR de fragmentos de las mismas, las dianas de restricción empleadas para la inserción de la casete C.K3 o C.C1 y los nombres de los plásmidos generados tras las inserciones.

Los plásmidos pCSX47a, pCSX47b, pCSX57 y pCSX56 se utilizaron para transformar suspensiones celulares de *Synechocystis* sp. PCC 6803, con objeto de obtener clones resistentes a la Km (en el caso de pCSX47a y pCSX47b) o al Cm (en el caso de pCSX57 y pCSX56) en los que las copias silvestres de las ORFs en cuestión se hubieran sustituido por las versiones mutantes. De este modo se obtuvieron las estirpes mutantes CSX47a, CSX47b, CSX57 y CSX56, respectivamente. La estructura genómica de estos mutantes se analizó mediante PCR, utilizándose DNA cromosómico total de los mismos como molde y las parejas de oligonucleótidos mostradas en la Figura 34 como cebadores.

Todas las estirpes resultaron ser cromosómicamente homogéneas y portadoras de las versiones inactivadas de las correspondientes ORFs (no mostrado).

Los plásmidos pCSX57 y pCSX56 también se utilizaron para transformar la estirpe mutante CSX47a, con objeto de obtener mutantes dobles, resistentes a la Km y al Cm, afectados simultáneamente en las ORFs *sll0108* y *sll1017* (mutante CSX201) o en las ORFs *sll0108* y *sll0537* (mutante CSX200). Las estirpes mutantes CSX200 y CSX201 también resultaron ser cromosómicamente homogéneas para la nueva mutación cuando se analizaron mediante PCR (no mostrado).

Tabla 27. Plásmidos construidos para la inactivación insercional de las ORFs *sll0108*, *sll1017* y *sll0537* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Plásmido	Descripción
pCSX23 ^a	fragmento de la ORF <i>sll0108</i> amplificado con los cebadores Tr18 y Tr19 clonado en pGEM-T
pCSX53 ^a	fragmento de la ORF <i>sll1017</i> amplificado con los cebadores Tr2a y Tr2b clonado en pGEM-T
pCSX52 ^a	fragmento de la ORF <i>sll0537</i> amplificado con los cebadores Tr3a y Tr3b clonado en pGEM-T
pCSX46	fragmento <i>Apal-PstI</i> de pCSX23, conteniendo el fragmento amplificado de la ORF <i>sll0108</i> , clonado en pBluescript SK(+)
pCSX47a	plásmido que contiene parte de la ORF <i>sll0108</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>HincII</i> de pCSX46, en la misma orientación que la ORF
pCSX47b	plásmido que contiene parte de la ORF <i>sll0108</i> interrumpida por inserción de la casete C.K3 en el sitio <i>HincII</i> de pCSX46, en orientación opuesta a la ORF
pCSX57	plásmido que contiene parte de la ORF <i>sll1017</i> interrumpida por inserción de la casete C.C1 en el sitio <i>MscI</i> de pCSX53
pCSX56	plásmido que contiene parte de la ORF <i>sll0537</i> interrumpida por inserción de la casete C.C1 en el sitio <i>MscI</i> de pCSX52

^a Mediante la secuenciación parcial de los insertos de estos plásmidos se verificó que los fragmentos amplificados mediante PCR eran correctos.

Se realizó, mediante hibridación, una comprobación adicional de que los mutantes simples y dobles obtenidos tenían la estructura genómica esperada y estaban segregados. Para ello se emplearon como sondas los fragmentos de las ORFs obtenidos mediante PCR. De este modo, se pudo observar que la versión silvestre de la ORF *sll0108* (fragmento *AseI* de 1,4 kb) había sido sustituida por la versión mutante *sll0108::C.K3* (fragmento *AseI* de 2,5 kb), tanto en el mutante CSX47a como en CSX47b (Fig. 35A), la versión silvestre de la ORF *sll1017* (fragmento *BglI* de 580 pb) por la versión mutante *sll1017::C.C1* en las estirpes CSX57 y CSX201 (fragmentos *BglI* de aprox. 2 kb y 0,5 kb, ya que la casete C.C1 presenta una diana *BglI*) (Fig. 35B) y, finalmente, la versión silvestre de la ORF *sll0537* (fragmento *HincII* de 570 pb) por la versión mutante *sll0537::C.C1*, originando un fragmento *HincII* de aprox. 2,5 kb (Fig. 35C), en las estirpes CSX56 y CSX200.

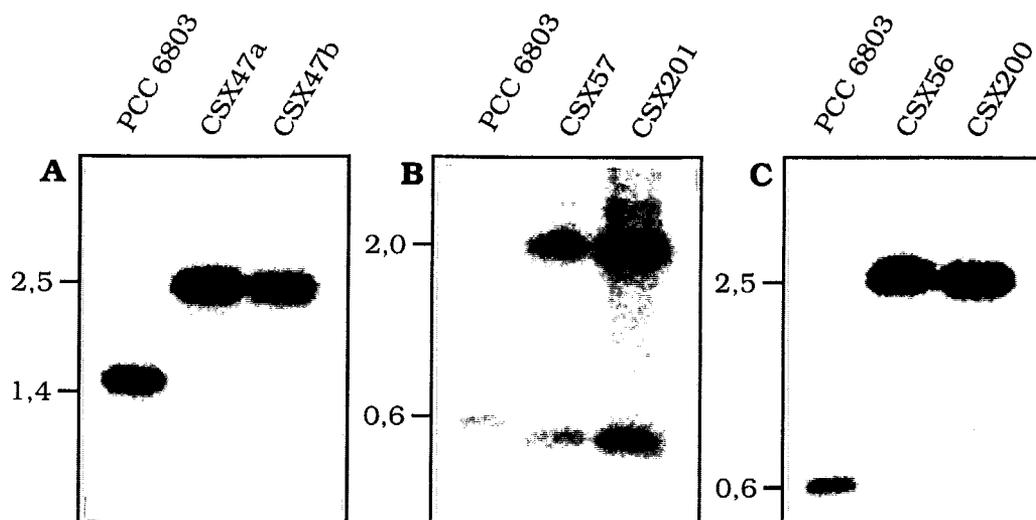


Figura 35. Estructura genómica de los mutantes CSX47a, CSX47b, CSX57, CSX201, CSX56 y CSX200 derivados de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

DNA total de las estirpes indicadas se digirió con las enzimas de restricción *AseI* (panel A), *BglI* (panel B) o *HincII* (panel C). Se realizaron hibridaciones en condiciones restrictivas utilizando como sondas fragmentos de las ORFs *sll0108* (panel A), *sll1017* (panel B) o *sll0537* (panel C), obtenidos mediante PCR empleando como molde los plásmidos pCSX23, pCSX53 o pCSX52 y como cebadores las parejas de oligonucleótidos correspondientes (descritos en la Fig. 34). A la izquierda de cada panel se indica el tamaño de las bandas en kb.

Se determinó la capacidad de incorporación de [^{14}C]metilamonio de las estirpes CSX47a, CSX47b, CSX57, CSX56, CSX201 y CSX200. Para ello se utilizaron células que se habían cultivado en medio con amonio, nitrato, o bien que habían sido incubadas durante 6 horas en medio sin nitrógeno combinado tras haber sido cultivadas en medio con nitrato. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 28.

Tabla 28. Actividades de transporte de metilamonio de los mutantes CSX47a, CSX47b, CSX57, CSX56, CSX201 y CSX200 derivados de *Synechocystis* sp. PCC 6803, cultivados con distintas fuentes de nitrógeno.

Células cultivadas en medio con amonio (2,5-10 mM), nitrato (17,6 mM) o sometidas a deficiencia de nitrógeno durante 6 horas tras haber sido cultivadas en medio con nitrato (-N), se emplearon en ensayos de transporte de [^{14}C]metilamonio, suministrado a concentración 1 μM , durante 10 min. En el caso de los mutantes simples, el medio se suplementó con Km (estirpes CSX47a y CSX47b) o con Cm (estirpes CSX57 y CSX56) y en el caso de los mutantes dobles, con Km y Cm. Los valores presentados son la media de 2-4 determinaciones independientes.

Estirpe	Genotipo	Actividad de transporte ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ Chl}$)		
		Fuente de nitrógeno:		
		NH_4^+	NO_3^-	-N
6803		3,20	4,28	8,85
CSX47a	<i>sll0108::C.K3</i>	0,11	0,10	0,31
CSX47b	<i>sll0108::C.K3</i>	0,08	0,05	0,24
CSX57	<i>sll1017::C.C1</i>	3,70	4,77	7,95
CSX56	<i>sll0537::C.C1</i>	3,04	6,36	8,15
CSX201	<i>sll0108::C.K3, sll1017::C.C1</i>	0,11	0,17	0,20
CSX200	<i>sll0108::C.K3, sll0537::C.C1</i>	0,07	0,08	0,21

La estirpe silvestre *Synechocystis* sp. PCC 6803 mostró actividades de transporte de metilamonio similares cuando se empleó amonio o nitrato como fuente de nitrógeno para el cultivo de las células, aunque en medio con amonio la actividad fue ligeramente menor. Se observó una mayor actividad de transporte en células sometidas a carencia de nitrógeno, aproximadamente el doble que la obtenida con células cultivadas con nitrato. Los mutantes insercionales de la ORF *sll0108*, estirpes CSX47a y CSX47b, resultaron estar severamente afectados en la capacidad de transporte de metilamonio, mostrando una incorporación de radiactividad que suponía un 1-3% del valor observado en la estirpe silvestre. Los mutantes insercionales de las ORFs *sll0107* y *sll0537*, las estirpes CSX57 y CSX56, respectivamente, no se vieron claramente afectados en su capacidad para transportar metilamonio en las condiciones de estos ensayos. Por otra parte, como cabía esperar de los resultados anteriores, los mutantes dobles CSX201 y CSX200 mostraron un fenotipo de transporte similar al de su parental, la estirpe CSX47a.

Como control, se determinó la actividad glutamina sintetasa de los mutantes CSX47a y CSX47b, ya que, como ya se ha indicado, el metilamonio que es transportado al interior celular se convierte en γ -metilglutamina mediante dicha actividad enzimática, por lo que una disminución de la radiactividad retenida por las células en los ensayos de transporte podría, en principio, deberse un defecto tanto en el sistema de transporte como en la glutamina sintetasa. Los mutantes CSX47a y CSX47b presentaron niveles altos de actividad glutamina sintetasa (Tabla 29).

Tabla 29. Niveles de actividad glutamina sintetasa de los mutantes CSX47a y CSX47b derivados de *Synechocystis* sp. PCC 6803 cultivados con distintas fuentes de nitrógeno.

Células cultivadas con amonio (5 mM), nitrato (17,6 mM) o sometidas a deficiencia de nitrógeno durante 6 h tras haber sido cultivadas en medio con nitrato (-N), se emplearon para la determinación de la actividad glutamina sintetasa mediante el ensayo de actividad transferasa. El medio de cultivo en el caso de los mutantes se suplementó con Km.

Estirpe	Actividad glutamina sintetasa (mU· μg^{-1} Chl)		
	Fuente de nitrógeno		
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	-N
PCC 6803	1,25	39,99	42,16
CSX47a	1,32	20,31	34,91
CSX47b	2,67	21,68	31,28

Los resultados que se acaban de presentar indicaron que el producto de la ORF *sll0108* era el responsable cuantitativamente más importante de la entrada de metilamonio en la estirpe PCC 6803. Esta ORF se denominó *amt1*. Los resultados no permitían descartar, sin embargo, un papel de las ORFs *sll0107* y/o *sll0537* en el transporte de metilamonio a otras concentraciones o en otras condiciones distintas a las utilizadas en estos ensayos.

Con objeto de estudiar en más detalle si las ORFs *sll1017* y *sll0537* podían tener una función en el transporte de metilamonio, se determinó en las estirpes CSX47a, CSX200 y CSX201, la cinética de incorporación de [^{14}C]metilamonio suministrado a distintas concentraciones (5 a 100 nM). La actividad de transporte de [^{14}C]metilamonio 50 nM observada en la estirpe CSX47a (*amt1*) resultó ser mayor que la del mutante CSX200, y ésta, a su vez, superior a la del mutante CSX201 (Fig. 36). Estos resultados permiten sugerir que las ORFs *sll1017* (inactivada en el mutante CSX201) y *sll0537* (inactivada en el mutante CSX200) también estaban implicadas en el transporte de metilamonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803. La ORF *sll1017*, que se denominó *amt2*, era responsable de una mayor actividad de transporte que la ORF *sll0537*, que se denominó *amt3*, ya que el doble mutante CSX201 (*amt1 amt2*) resultó estar más afectado en el transporte que el doble mutante CSX200 (*amt1 amt3*). De hecho, la actividad de transporte encontrada en el mutante CSX47a era igual a la suma de las actividades de los mutantes CSX200 y CSX201. Estos resultados se corroboraron en experimentos similares en los que se utilizaron concentraciones de metilamonio de 5, 10 y 100 nM (no mostrado).

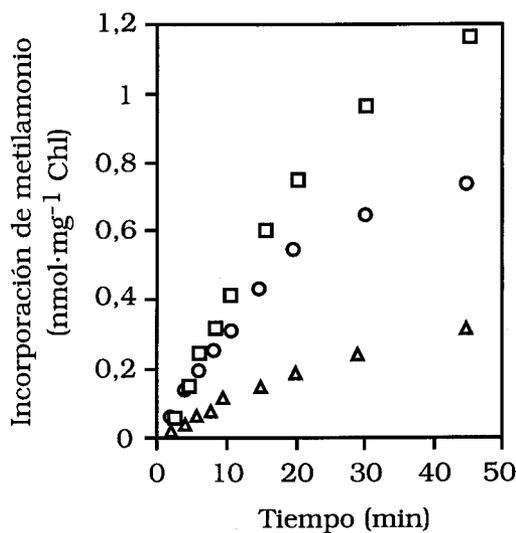


Figura 36. Transporte de metilamonio, suministrado a baja concentración, en los mutantes CSX47a, CSX200 y CSX201 derivados de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Células de las estirpes CSX47a (□), CSX200 (○) y CSX201 (△) cultivadas en medio con nitrato, suplementado con Km en el caso del mutante CSX47a, y con Km y Cm en el de los mutantes CSX200 y CSX201, se lavaron y sometieron a deficiencia de nitrógeno durante 6 h. Las suspensiones celulares se emplearon para realizar ensayos de transporte de [^{14}C]metilamonio, suministrado a una concentración inicial de 50 nM, determinándose a distintos tiempos (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30 y 45 min) la radiactividad acumulada por las células.

3.6.3. Regulación por nitrógeno de la expresión de los genes *amt1*, *amt2* y *amt3*

Se analizó mediante análisis de "Northern" la expresión de los genes *amt1*, *amt2* y *amt3*, utilizando para ello RNA aislado a partir de células de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que habían sido cultivadas en medio con amonio, con nitrato o que se habían sometido a deficiencia de nitrógeno durante 6 horas tras su cultivo en medio con nitrato.

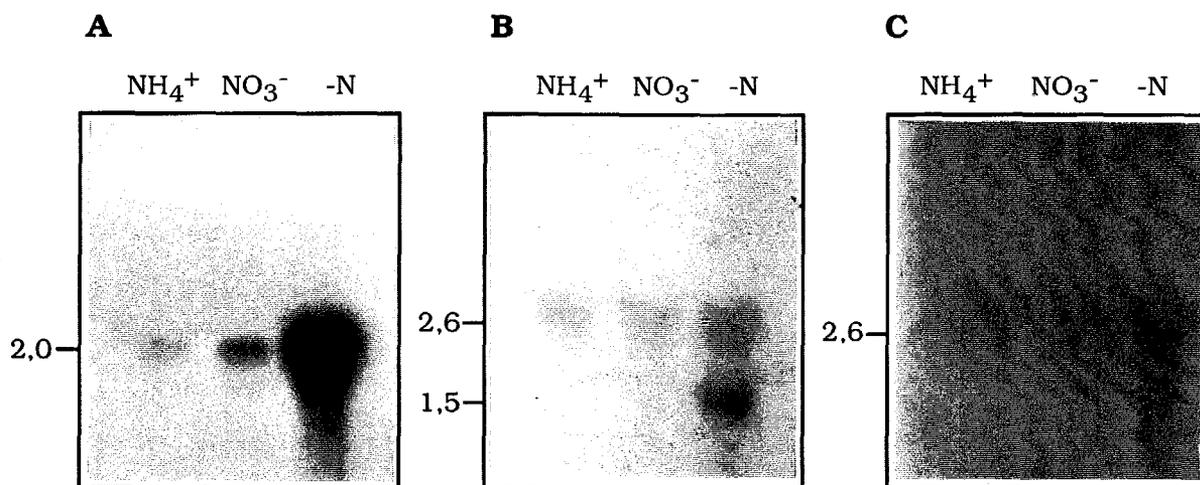


Figura 37. Análisis de "Northern" de la expresión de los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno.

Se analizó la expresión de los genes *amt1* (panel A), *amt2* (panel B) y *amt3* (panel C) de la estirpe PCC 6803 mediante análisis de "Northern", empleando RNA aislado de células que habían sido cultivadas en medio con amonio (15 mM), nitrato (17,6 mM) o que se habían sometido a deficiencia de nitrógeno durante 6 h tras haber sido cultivadas en medio con nitrato. Como sondas se utilizaron fragmentos de DNA de los genes correspondientes, obtenidos mediante PCR utilizando los plásmidos pCSX23 (para *amt1*), pCSX53 (para *amt2*) o pCSX52 (para *amt3*) como molde y las parejas de oligonucleótidos Tr18-Tr19, Tr2a-Tr2b o Tr3a-Tr3b, respectivamente, como cebadores.

El gen *amt1* se expresaba en las tres condiciones de nutrición nitrogenada ensayadas, si bien la señal de hibridación era mucho más fuerte con RNA de células sometidas a carencia de nitrógeno. La expresión relativa de *amt1* en las diferentes condiciones nitrogenadas fue: 1:1,8:30 (amonio:nitrato:deficiencia de nitrógeno). En los tres casos, el RNAm detectado presentaba el mismo tamaño, aproximadamente 2 kb (Fig. 37A).

El gen *amt2* también se expresaba en las tres condiciones estudiadas, siendo el nivel de expresión de un transcrito de aproximadamente 2,6 kb similar en presencia de amonio y de nitrato. En condiciones de deficiencia en nitrógeno también se observó este transcrito de 2,6 kb, siendo su nivel de expresión 2 veces superior al encontrado en medios con amonio o nitrato. En las células incubadas en ausencia de nitrógeno combinado se detectó, además, un RNAm de 1,5 kb, cuya expresión fue 1,5 veces superior a la del RNAm de 2,6 kb observado en la misma preparación de RNA (Fig. 37B). Por lo

tanto, también el gen *amt2* se expresaba preferentemente en situación de deficiencia de nitrógeno.

En el caso de *amt3*, sólo se detectó una tenue banda de hibridación con RNA aislado de células sometidas a deficiencia de nitrógeno. Esta banda correspondería a un transcrito de unas 2,6 kb (Fig. 37C).

Los resultados obtenidos mediante análisis de "Northern" indicaban, por lo tanto, que los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* están sometidos a control por nitrógeno, siendo su expresión mayor en condiciones de deficiencia en nitrógeno. Estos resultados son consistentes con las medidas de actividad de transporte de [¹⁴C]metilamonio (Tabla 28).

Para comparar el nivel de expresión de los tres genes, *amt1*, *amt2* y *amt3*, en una misma situación de nutrición nitrogenada, se llevaron a cabo experimentos de hibridación entre fragmentos de DNA correspondientes a dichos genes (fijados en filtros) y RNA total de *Synechocystis* sp. PCC 6803 parcialmente hidrolizado y marcado en sus extremos 5'. Los fragmentos de DNA de *amt1*, *amt2* y *amt3* se obtuvieron mediante PCR, utilizando como molde los plásmidos pCSX23, pCSX53 y pCSX52, respectivamente, y como cebadores las parejas de oligonucleótidos correspondientes. Cuando se utilizó RNA aislado de células cultivadas con amonio como fuente de nitrógeno, sólo se observó hibridación del RNA con el DNA de *amt1*. Lo mismo ocurrió cuando se empleó RNA procedente de cultivos con nitrato. Sin embargo, cuando se utilizó RNA aislado de suspensiones celulares que habían sido sometidas a deficiencia de nitrógeno durante 6 h, se encontró hibridación con el DNA de los tres genes, correspondiendo a *amt1* la expresión más alta, seguido de *amt2* y, finalmente, *amt3*, en relación 59,2:6,4:1 (Fig. 38). Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos mediante la mutagénesis de los tres genes que mostraron que la permeasa Amt1 tiene el papel cuantitativamente más importante en el transporte de amonio/metilamonio, al ser el gen *amt1* el que se expresa mayoritariamente en cualquiera de las tres condiciones de nutrición de nitrógeno estudiadas y ser asimismo aquel cuya mutación altera de forma más notable la actividad de transporte (véase Tabla 28).

3.6.4. Determinación del nucleótido de inicio de la transcripción del gen *amt1*

Se abordó la determinación de presuntos sitios de inicio de la transcripción del gen *amt1* mediante experimentos de elongación de cebadores. Para ello se clonó mediante PCR un fragmento de DNA que comprendía la región situada entre las posiciones -235 y +289 con respecto al codón inicial del gen *amt1*, que presumiblemente contendría la zona promotora del gen. Como molde para la reacción de PCR se utilizó DNA cromosómico de la estirpe PCC 6803 y como cebadores los oligonucleótidos Am1 y Am2 (véase Materiales y Métodos). El fragmento de DNA obtenido (525 pb) se clonó en el vector pGEM-T, originándose el plásmido pCSX49. Este plásmido se empleó como molde en las reacciones

de secuenciación utilizadas para calibrar los fragmentos obtenidos en los experimentos de elongación de cebadores. En estos experimentos se utilizó RNA aislado de células de la estirpe PCC 6803 cultivadas con amonio, nitrato o sometidas a deficiencia de nitrógeno durante 6 h después de haber sido cultivadas con nitrato, como en experimentos anteriores. Como cebadores se emplearon los oligonucleótidos Am2 (complementario a la secuencia situada entre las posiciones +289 y +268 con respecto al codón inicial del gen) y Am3 (complementario a la secuencia situada entre las posiciones +146 y +125) (véase Materiales y Métodos).

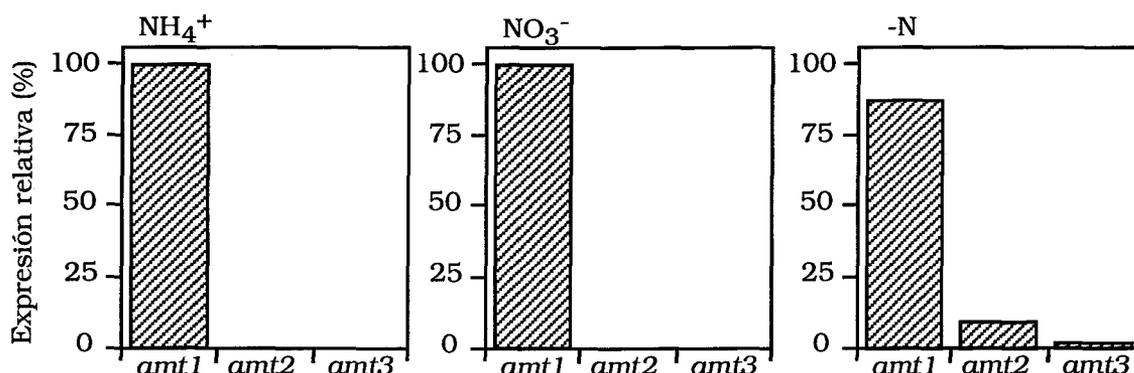


Figura 38. Expresión relativa de los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en distintas condiciones de disponibilidad de nitrógeno.

Se aisló RNA total de células de la estirpe PCC 6803 que se habían cultivado en medio con amonio (15 mM) o nitrato (17,6 mM) o que se habían sometido a deficiencia de nitrógeno durante 6 h después de haber sido cultivadas en medio con nitrato (-N). El RNA total (15 µg) se hidrolizó parcialmente y se marcó radiactivamente en sus extremos 5', empleándose como sonda en experimentos de hibridación en los que se utilizaron fragmentos de DNA pertenecientes a los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* inmovilizados en filtros de nitrocelulosa. Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes con resultados similares, en los que se empleó una cantidad de DNA saturante (2 picomol ó 4 picomol). En la figura se indica, para cada condición de disponibilidad de nitrógeno, la expresión relativa de los genes como porcentaje de la radiactividad retenida por cada fragmento con respecto a la radiactividad total retenida por los tres fragmentos, considerando la radiactividad como CPM/tamaño en kb del fragmento de DNA, con objeto de normalizar los valores. La eficiencia para ³²P del detector bidimensional de radiación b InstantImager empleado es del 25%.

Cuando se utilizó el cebador Am3, se observó un posible sitio de inicio de la transcripción situado 142 ó 143 pb por delante del codón de iniciación del gen. Este posible inicio de la transcripción se observó con RNA aislado de células cultivadas con amonio, con nitrato o sometidas a deficiencia de nitrógeno (Fig. 39B). El nivel de transcrito en condiciones de deficiencia de nitrógeno fue notablemente mayor que en las otras condiciones ensayadas, seguido por el observado en nitrato y, finalmente, en amonio, lo que coincidía con los resultados obtenidos mediante análisis de "Northern" de la expresión del gen *amt1*. El sitio de inicio de la transcripción encontrado estaba precedido por una posible caja promotora -10 y un posible sitio de unión de la proteína reguladora NtcA, cuya secuencia consenso es GTA...Ng...TAC (Luque *et al.*, 1994), situado 20 pb por delante de la posible caja -10 (Fig. 39A).

A



B

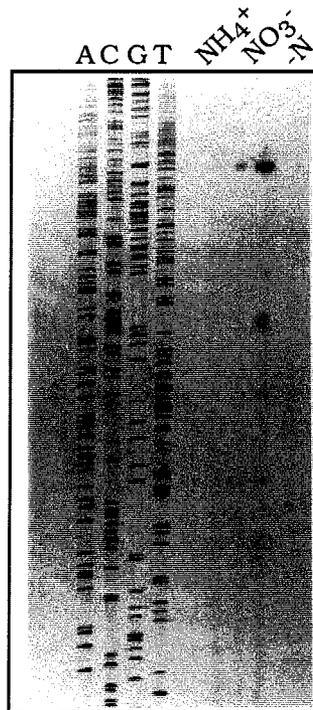


Figura 39. Determinación del nucleótido de inicio de la transcripción del gen *amt1* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

En el panel A se muestra la región promotora del gen *amt1*, incluyendo (enmarcadas) las dos secuencias características del sitio de unión de la proteína NtcA, la posible caja -10 (subrayada) y el sitio de inicio de la transcripción (+1). En el panel B se muestra el gel correspondiente al ensayo de extensión del cebador Am3, realizado con RNA procedente de células de la estirpe PCC 6803 cultivadas en medio con amonio (15 mM) o nitrato (17,6 mM) o sometidas a 6 h de deficiencia de nitrógeno tras haber sido cultivadas con nitrato.

3.6.5. Ensayos de retardo en gel de la región promotora del gen *amt1*

Para averiguar si la proteína NtcA era realmente capaz de unirse al fragmento de DNA correspondiente a la región promotora del gen *amt1*, se realizaron ensayos de retardo en gel. Como fuente de NtcA se utilizaron extractos celulares de una estirpe de *E. coli* portadora del gen *ntcA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 clonado bajo el control del promotor inducible por IPTG del vector pQE9 (A.M. Muro-Pastor, no publicado). La proteína NtcA de la estirpe PCC 7120 muestra un 86% de residuos idénticos con la proteína de la estirpe PCC 6803 (Frias *et al.*, 1993), siendo idéntica en ambas proteínas la secuencia del dominio hélice-vuelta-hélice de unión al DNA.

Mediante PCR se amplificó un fragmento de DNA de la estirpe PCC 6803 de 382 pb, utilizando el plásmido pCSX49 como molde y los oligonucleótidos Am1 y Am3 como cebadores, que contenía el extremo 5' del gen *amt1* y la región de DNA situada por delante del mismo. Este fragmento presentaba dos sitios cuyas secuencias se ajustaban al consenso del sitio de unión propuesto para NtcA (véase Fig. 39A). Para separar ambos sitios, el fragmento amplificado se digirió con la enzima de restricción *Bst*XI, obteniéndose un fragmento de 138 pb, que contenía el posible sitio de unión de NtcA situado a 20 pb de la caja -10 en el posible promotor del gen *amt1*, y un fragmento de 244 pb, que contenía un posible sitio de unión de NtcA situado 3 pb por delante del codón de iniciación del gen (Fig. 39A).

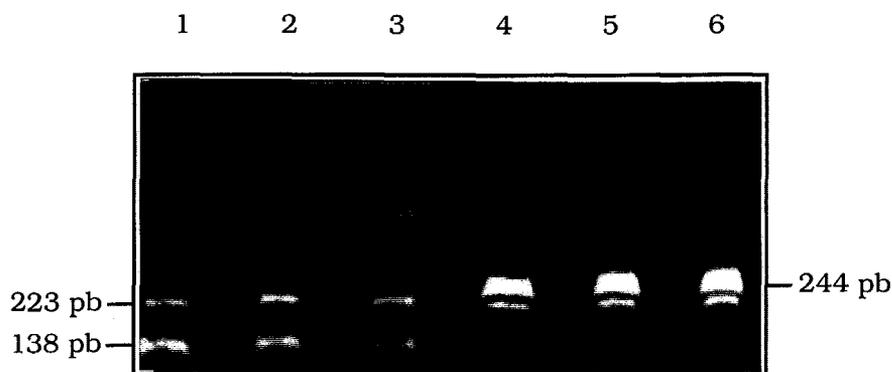


Figura 40. Ensayos de retardo en gel, provocado por la proteína NtcA, de fragmentos de DNA de la zona 5' del gen *amt1* de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se realizaron ensayos de unión empleando como sustrato 75-100 ng de los fragmentos *Bst*XI de 138 (carriles 1-3) y 244 pb (carriles 4-6), cada uno de los cuales contiene uno de los dos posibles sitios de unión de NtcA situados delante del gen *amt1*. Como fuente de proteína NtcA se utilizó un extracto (1,4 μ g de proteína total, carriles 2 y 5; 2,8 μ g de proteína total, carriles 3 y 6) de la estirpe BL21 de *E. coli* que contenía el plásmido pCSAM70 (véase Tabla 3). El extracto se obtuvo mediante sonicación tras inducir la expresión de la proteína NtcA. Como control para asegurar la especificidad de la unión se incluyó en los ensayos un fragmento de DNA de 223 pb perteneciente al vector pBluescript SK(+) (75 ng). Las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida, que se tiñeron posteriormente con bromuro de etidio para visualizar las bandas. En las muestras de los carriles 1 y 4 no se añadió extracto conteniendo NtcA.

Los resultados de los experimentos de retardo en gel de estos dos fragmentos con la proteína NtcA se muestran en la Figura 40. Como se puede observar, el fragmento de 138 pb, pero no el de 244 pb ni el control de 223 pb, era retardado por el extracto que contenía NtcA. Estos resultados, junto con el esquema de regulación encontrado para el gen *amt1*, apoyaban la posibilidad de que dicho gen estuviera controlado transcripcionalmente por la proteína NtcA.

3.6.6. Presencia de secuencias homólogas a los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* en otras estirpes de cianobacterias

Se investigó, mediante análisis de Southern, la existencia en otras estirpes de cianobacterias de secuencias homólogas a las de los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Fig. 41). Para ello se digirió el DNA cromosómico de dichas cianobacterias con las enzimas de restricción indicadas en el pie de la figura. Como sondas de los genes se emplearon los mismos fragmentos que se utilizaron en el análisis de "Northern" descrito en el apartado 3.6.3 (véase pie de la Fig. 37).

Como se muestra en la Figura 41, los genes *amt1* y *amt2* parecían estar más ampliamente distribuidos entre las cianobacterias que el gen *amt3*, siendo la hibridación más patente en el caso del gen *amt1*. Por otra parte, las bandas de hibridación obtenidas con el DNA de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con cada una de las sondas fueron de los tamaños esperados para los tres genes clonados al considerar la localización de las dianas *DraI* en las regiones genómicas que los contienen, sin que se observara hibridación cruzada entre los tres genes.

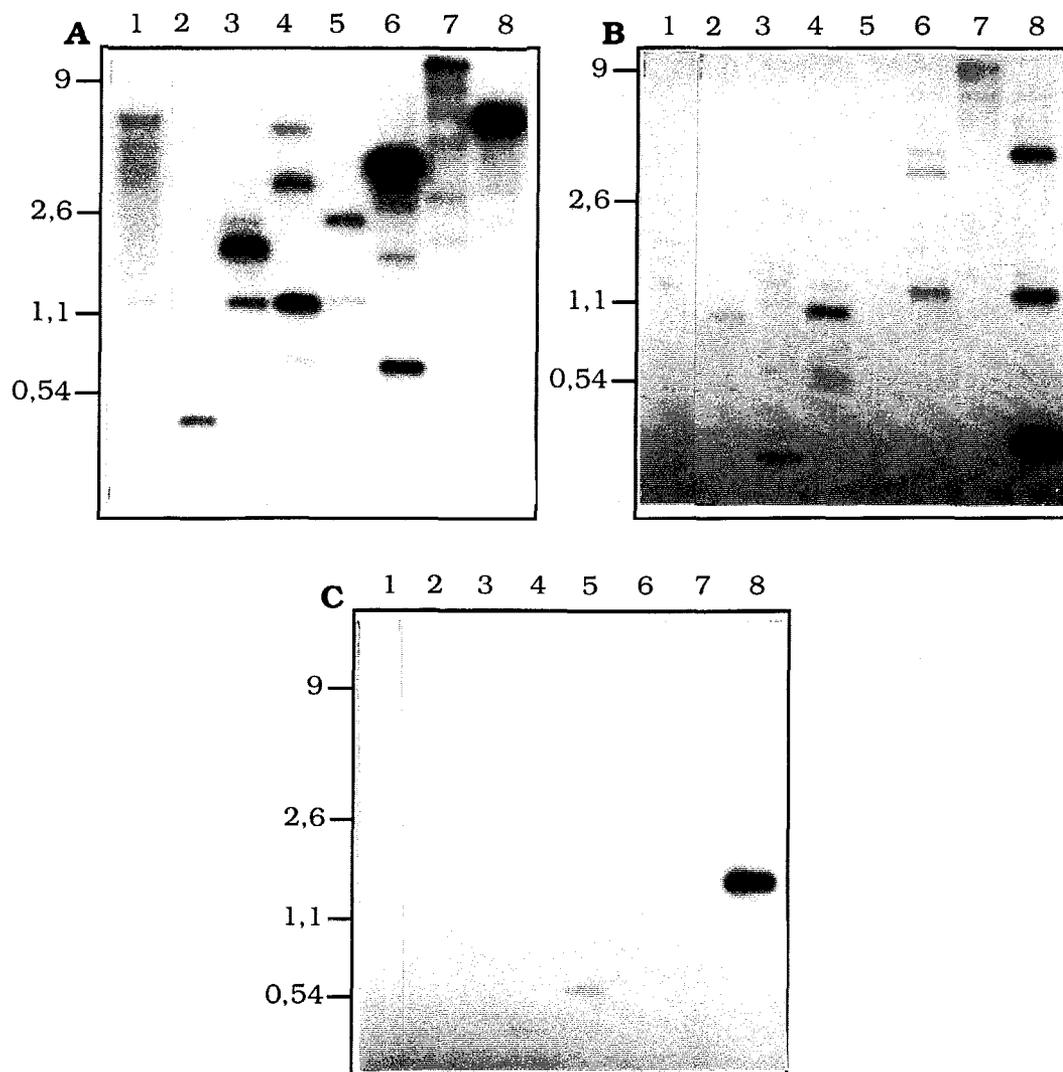


Figura 41. Presencia de secuencias homólogas a los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 en otras estirpes de cianobacterias.

DNA total de las estirpes PCC 7120 (1), PCC 7413 (2), PCC 7107 (3), PCC 7601 (4), UTEX 1829 (5), PCC 6903 (6), PCC 7942 (7) y PCC 6803 (8) se digirió con las siguientes enzimas: *MvaI* en el caso de las estirpes PCC 7413, PCC 7107, PCC 7601 y UTEX 1829, *DraI* en el caso de las estirpes PCC 7120, PCC 6903 y PCC 6803 y *EcoRV* en el caso de la estirpe PCC 7942. Las hibridaciones se realizaron en condiciones permisivas, utilizando como sonda un fragmento del gen *amt1* (panel A), *amt2* (panel B) o *amt3* (panel C) generado mediante PCR (véase pie Fig. 37). Las posiciones y los tamaños (en kb) de algunos patrones se indican a la izquierda de cada panel.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

4.1. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EN CIANOBACTERIAS

El transporte de aminoácidos constituía un aspecto prácticamente desconocido de la biología de las cianobacterias, y sólo en la estirpe unicelular *Synechocystis* sp. PCC 6803 se había realizado un estudio algo detallado de sus capacidades de transporte de aminoácidos (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990). Para compensar esta falta de información, y como primer paso para intentar aclarar las funciones fisiológicas de los mismos, se procedió a la caracterización de los sistemas de transporte de aminoácidos en nueve estirpes cianobacterianas pertenecientes a distintos grupos taxonómicos.

4.1.1. Transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120

Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con los publicados por Herrero y Flores (1990), muestran que la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120 es capaz de transportar un amplio rango de aminoácidos, incluyendo aminoácidos básicos, neutros y ácidos, aunque con diferentes afinidades. El análisis de los mutantes espontáneos obtenidos como clones resistentes a diversos análogos tóxicos de aminoácidos ha puesto de manifiesto, sin embargo, que existe un bajo número de sistemas implicados en el transporte y que estos sistemas exhiben una baja especificidad de sustrato.

Los mutantes resistentes a la azaleucina, representados por la estirpe CS343, resultaron estar fuertemente afectados en el transporte de los aminoácidos Pro, Phe, Gly y Leu (Tabla 10), lo que sugiere que carecen de un sistema de transporte para aminoácidos neutros, que se ha denominado sistema N-I. Este sistema constituye la principal vía de entrada de estos aminoácidos en la célula, y también es importante para el transporte de Thr y Ala.

No pudieron obtenerse mutantes resistentes al MSX o a la azaserina a partir de la estirpe silvestre PCC 7120, lo que sugiere que se requiere la inactivación de más de un gen para conferir resistencia a estos análogos y que, por lo tanto, podría existir más de un sistema capaz de transportarlos al interior celular. Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que pudieran obtenerse mutantes resistentes al MSX o a la azaserina a partir de la estirpe CS343, en la que una de las vías de transporte ya estaba anulada. El mutante doble CS389, aislado como resistente al MSX, había perdido prácticamente toda capacidad de transportar aminoácidos neutros (excepto Gln), por lo que podría haber surgido mediante la mutación de un segundo sistema de transporte de aminoácidos neutros, que se ha denominado sistema N-II. Sin embargo, estos resultados no permitían descartar la posibilidad de que los denominados sistemas N-I y N-II fuesen en realidad dos componentes de un único sistema de transporte.

Los sistemas N-I y N-II, definidos mediante el análisis de los mutantes CS343 y CS389, muestran especificidades solapantes, pero no idénticas. La especificidad para aminoácidos neutros de estos sistemas se apoya también por el hecho de que, en general, el transporte de aminoácidos neutros en *Anabaena* sp. PCC 7120 se inhiba notablemente por la presencia de otros aminoácidos neutros en el ensayo, pero muy poco por aminoácidos básicos o ácidos (Tabla 6).

Los valores de K_S para el transporte de los aminoácidos Ala, Asn, Gln y Ser en el mutante CS343 (Tabla 13) son similares a los encontrados en la estirpe silvestre PCC 7120 (Tabla 5). Estos resultados, junto con la observación de que las cinéticas para el transporte de los distintos aminoácidos neutros en la estirpe PCC 7120 fueran monofásicas, sugiere que los sistemas N-I y N-II poseen valores de K_S similares para el transporte de los aminoácidos indicados. Por otra parte, estos sistemas median un transporte de tipo activo, ya que permiten la concentración del sustrato en el interior celular en contra del gradiente electroquímico y son sensibles a los inhibidores metabólicos DCCD y CCCP (Tabla 5).

Con respecto al transporte de aminoácidos ácidos, *Anabaena* sp. PCC 7120 muestra una baja afinidad para el Asp y el Glu (Tabla 5). Una parte del transporte de estos aminoácidos podría tener lugar en su forma protonada (neutra) a través de los sistemas de transporte N-I y N-II, ya que los mutantes CS343 y CS389 también están parcialmente afectados en el transporte de Asp y Glu (Tabla 10). No obstante, el transporte de aminoácidos neutros se ve sólo ligeramente afectado por la presencia de Asp o Glu en el ensayo (Tabla 6), lo que sugiere que los sistemas de transporte de aminoácidos neutros deben mostrar muy baja afinidad por los aminoácidos ácidos. Por otra parte, el transporte de Glu en la estirpe PCC 7120 también se inhibe parcialmente por aminoácidos neutros (Flores y Muro-Pastor, 1988). El transporte de Asp y Glu que tendría lugar a través de los sistemas de transporte de aminoácidos neutros podría corresponder a la pequeña fracción de actividad de transporte de estos aminoácidos que se inhibe por DCCD o CCCP (Tabla 5). El transporte remanente de Asp y Glu podría ocurrir a través de otro(s) sistema(s) no caracterizados, que podrían ser de naturaleza pasiva.

En *Anabaena* sp. PCC 7120 se había descrito previamente la existencia de dos sistemas para el transporte de aminoácidos básicos, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad (Herrero y Flores, 1990). El fenotipo del mutante CS460, aislado como resistente a la hidroxilisina a partir de la estirpe CS343 e incapaz de transportar los aminoácidos Arg y Lys (Tabla 10), corrobora la existencia del sistema de transporte de aminoácidos básicos de alta afinidad. La comparación de las actividades de transporte de los mutantes CS349 (afectado en el transporte de los aminoácidos básicos, además de los neutros; véase más adelante) y CS389 sugiere que el aminoácido Gln podría

transportarse en cierta medida a través de este sistema para aminoácidos básicos, de manera similar a lo descrito en *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990). Por otra parte, los aminoácidos básicos His y Orn podrían transportarse parcialmente a través de los sistemas de transporte de aminoácidos neutros, como sugieren los fenotipos de los mutantes CS460 y CS327 (véase más adelante), que muestran una considerable actividad de transporte de His, a pesar de estar fuertemente afectados en el transporte de aminoácidos básicos, y el fenotipo del mutante CS343, claramente afectado en el transporte de Orn (Tabla 10).

Algunas mutaciones parecen inactivar simultáneamente más de un sistema de transporte. Así, en el caso de la estirpe CS326, la mutación afecta al sistema de alta afinidad para aminoácidos básicos y a los dos sistemas de aminoácidos neutros; la mutación de la estirpe CS327 inactivaría simultáneamente el sistema N-II y el sistema de alta afinidad para aminoácidos básicos y la estirpe CS349 (derivada de CS343) podría haberse originado por una mutación similar a la del mutante CS327. Por otra parte, las mutaciones que confieren resistencia a la hidroxilisina o a la azaserina estirpes derivadas de la CS389 (los mutantes CS458 y CS459, respectivamente) afectarían simultáneamente al sistema de transporte de aminoácidos básicos de alta afinidad y al transporte de aminoácidos ácidos (Tabla 10). Se desconoce la naturaleza, estructural o reguladora, de los genes afectados en todos estos mutantes, pero los resultados sugieren en cualquier caso la existencia de elementos comunes entre distintos sistemas de transporte.

En resumen, los datos presentados apoyan la existencia de al menos cinco sistemas de transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120:

- dos sistemas para aminoácidos básicos, uno activo de alta afinidad y otro pasivo de baja afinidad (Herrero y Flores, 1990)
- dos sistemas activos de alta afinidad para el transporte de aminoácidos neutros, con especificidades solapantes pero no idénticas
- al menos un sistema para aminoácidos ácidos, de baja afinidad, que podría ser pasivo.

4.1.2. Transporte de aminoácidos en otras estirpes de cianobacterias

Las actividades de transporte de aminoácidos observadas en otras cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos incluidas en la Sección IV, concretamente *Anabaena* sp. PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413, *Nostoc* sp. PCC 7107 y *Calothrix* sp. PCC 7601, así como el aislamiento de mutantes resistentes a la azaleucina a partir de dichas estirpes, permite deducir la existencia en todas ellas de un sistema de transporte para aminoácidos neutros. Estas estirpes, a diferencia de lo descrito en el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120, en la que parecen existir dos sistemas de transporte de aminoácidos

neutros, presentarían un único sistema, a juzgar por las bajas actividades de transporte de aminoácidos neutros de los mutantes CS440, CS441, CS442 y CS451 (Tabla 14). En el caso de las estirpes PCC 7937, PCC 7413 y PCC 7601 el sistema de transporte de aminoácidos neutros podría transportar también, aunque limitadamente, aminoácidos básicos y ácidos, ya que los mutantes CS440, CS441 y CS451 muestran una menor capacidad de transporte de Arg, His, Lys, Asp y Glu que la correspondiente estirpe silvestre. El sistema de transporte de aminoácidos neutros de *Anabaena* sp. PCC 7937, mutado en la estirpe CS440, probablemente corresponde al sistema descrito previamente en esta misma estirpe como transportador de Leu (Thiel, 1988).

En cuanto al transporte de aminoácidos básicos y ácidos, las actividades exhibidas por las cianobacterias de la Sección IV mencionadas en el párrafo anterior son similares a las de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Tabla 8). En el caso de *Anabaena* sp. PCC 7937, los fenotipos de los mutantes CS454 y CS447, aislados a partir de la estirpe CS440 como resistentes a la hidroxilisina y al MSX, respectivamente, sugieren la existencia en esta cianobacteria de un sistema para el transporte de aminoácidos básicos (mutado en la estirpe CS454) y de un sistema para aminoácidos ácidos (mutado en la estirpe CS447) (Tabla 14). El transporte remanente de Gln mostrado por el mutante CS440 (15%) desaparecía completamente en el mutante CS447, lo que sugiere que este aminoácido puede ser también incorporado al interior celular en esta cianobacteria mediante el sistema de transporte de aminoácidos ácidos. Esta observación es consistente con la existencia, previamente establecida, de un elemento común para el transporte de alta afinidad de Gln y Glu en la estirpe PCC 7937 (Chapman y Meeks, 1983).

Por otra parte, las actividades de transporte exhibidas por el mutante CS457 (Tabla 14), aislado como resistente a la hidroxilisina a partir de la estirpe CS442, indican que también en *Nostoc* sp. PCC 7107 las capacidades para transportar aminoácidos básicos y ácidos pueden separarse mediante mutación, lo que permite definir la existencia de un sistema de transporte de aminoácidos básicos. Sin embargo, en el caso de *Nostoc* sp. PCC 7413, el análisis del mutante CS456, obtenido a partir de la estirpe CS441 como resistente al MSX, no permite establecer una clara separación entre las capacidades de transporte de aminoácidos básicos y ácidos. El mutante CS456 mantenía una notable actividad de transporte de Arg (Tabla 14), sugiriendo que *Nostoc* sp. PCC 7413 posee un sistema específico para el transporte de este aminoácido. De hecho, la estirpe PCC 7413 mostró una notabilísima capacidad de transporte de Arg, con un valor de K_S de 3,3 μ M, similar al del sistema de transporte de aminoácidos básicos de *Anabaena* sp. PCC 7120 (K_S para la Arg 1,7 μ M; Herrero y Flores, 1990), aunque con una V_{max} diez veces superior. Debido a que no pudieron obtenerse mutantes resistentes a la hidroxilisina o al MSX derivados de la cianobacteria *Calothrix* sp. PCC 7601, no hay datos que permitan separar las actividades de transporte de aminoácidos básicos y ácidos en

este organismo.

La cianobacteria *Fischerella muscicola* UTEX 1829, perteneciente a la Sección V, muestra actividades de transporte relativamente bajas comparadas con las de *Anabaena* sp. PCC 7120, sobre todo en el caso de los aminoácidos básicos (Tabla 8). No pudieron obtenerse mutantes resistentes a análogos tóxicos de aminoácidos a partir de esta estirpe, por lo que no se puede concluir nada respecto al número de sistemas ni a la especificidad de los mismos en esta cianobacteria.

El estudio de las actividades de transporte de la estirpe filamentosa no formadora de heterocistos *Pseudanabaena* sp. PCC 6903, perteneciente a la Sección III, así como la caracterización de mutantes derivados de la misma, permitieron establecer la existencia de al menos dos sistemas de transporte de aminoácidos: un sistema general capaz de transportar aminoácidos básicos, neutros y ácidos (mutado en las estirpes CS448 y CS446, Tabla 14) y un sistema de transporte de Asp de alta afinidad (K_s 1,1 μ M). Así, el análisis cinético del transporte de Asp en la estirpe PCC 6903 mostró dos componentes, uno de alta y otro de baja afinidad (Fig. 4). El componente de baja afinidad no se encuentra en los mutantes CS448 y CS446 (Fig. 7), lo que sugiere que dicho componente corresponde al sistema que hemos denominado general. Los ensayos de competencia realizados (Fig. 8) permiten concluir que el sistema de alta afinidad de transporte de Asp también reconoce, aunque con una afinidad menor, al aminoácido Glu, por lo que podría considerarse más bien como un sistema de transporte de aminoácidos ácidos.

En este trabajo se incluyeron asimismo las cianobacterias unicelulares *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Synechocystis* sp. PCC 6803, ambas pertenecientes a la Sección I. En el caso de *Synechococcus* sp. PCC 7942 no pudieron obtenerse mutantes, pero el estudio de las actividades de transporte de aminoácidos mostradas por esta estirpe (Tabla 8) sugiere la existencia de un sistema de transporte para aminoácidos neutros no polares, que también podría transportar His y, en menor grado, Gln y otros aminoácidos neutros. Este sistema podría corresponder al de transporte de aminoácidos neutros de cadena lateral ramificada identificado previamente en *Anacystis nidulans* (Lee-Kaden y Simonis, 1982), una cianobacteria estrechamente relacionada con la estirpe PCC 7942. Por otra parte, *Synechococcus* sp. PCC 7942 no parece poseer ningún sistema de transporte para aminoácidos básicos, a juzgar por las prácticamente indetectables actividades de transporte de Arg y Lys, aunque podría presentar un sistema para el transporte de aminoácidos ácidos similar al de las cianobacterias formadoras de heterocistos.

En *Synechocystis* sp. PCC 6803 se había establecido la existencia de un sistema de transporte para aminoácidos neutros (excepto Gln) (Labarre *et al.*, 1987) y un sistema para aminoácidos básicos y Gln (Labarre *et al.*, 1987; Flores y Muro-Pastor, 1990). También se había sugerido la presencia adicional de un sistema de transporte de alta

afinidad para la Gln que podría transportar además Glu (Labarre *et al.*, 1987). Las actividades de transporte de aminoácidos de la estirpe PCC 6803 obtenidas en este trabajo son similares a las publicadas previamente, destacándose las altas actividades de transporte de Arg, Lys y Glu encontradas (Tabla 8). El análisis de los parámetros cinéticos para el transporte de Glu en la estirpe PCC 6803 puso de manifiesto que la actividad de transporte observada se debía a un sistema de alta capacidad (V_{max} 529 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ Chl) y de afinidad relativamente alta (K_S 49 μM). Los estudios de competencia realizados utilizando la estirpe mutante CSX28a, que permitía estudiar el transporte de Glu en ausencia de cualquier posible contribución debida al sistema de transporte de aminoácidos neutros (véase más adelante), mostraron, en contraste con lo sugerido por Labarre *et al.*, que el transporte de Gln y Glu debe tener lugar a través de vías independientes, ya que el transporte de Glu marcado radiactivamente no se veía afectado por la presencia de Gln no marcada (Tabla 22).

En la Tabla 30 se recogen, a modo de resumen, los sistemas de transporte de aminoácidos que se pueden definir en cada estirpe estudiada en base a las actividades de transporte encontradas y al análisis de los mutantes obtenidos. Los datos presentados, analizados en conjunto, permiten concluir que las cianobacterias poseen un bajo número de sistemas de transporte de aminoácidos que muestran especificidad por grupos químicos de aminoácidos más que por aminoácidos concretos. Esta situación, parecida a la que se encuentra en algas verdes (Sauer y Tanner, 1985) y plantas superiores (Li y Bush, 1990; Tanner y Caspari, 1996), contrasta con la de otras bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* o *Pseudomonas* spp., que poseen un elevado número de permeasas específicas para aminoácidos concretos o subgrupos de aminoácidos químicamente relacionados (Antonucci y Oxender, 1986; Furlong, 1987). Sin embargo, como se comentará a continuación, la estructura de al menos algunos de los sistemas cianobacterianos de transporte de aminoácidos sería del tipo multicomponente encontrado comunmente en bacterias, en contraste con los sistemas monocomponente típicos de plantas (Tanner y Caspari, 1996).

En todas las estirpes de cianobacterias estudiadas existe un sistema de transporte de aminoácidos neutros cuya especificidad concreta es variable según el caso, de modo que, por ejemplo, en la estirpe PCC 7942 parece tener una preferencia por aminoácidos neutros no polares, mientras que en la estirpe PCC 6903 también reconoce aminoácidos básicos y ácidos, hasta el punto de comportarse con un sistema general de aminoácidos.

Tabla 30. Sistemas o actividades de transporte de aminoácidos presentes en las cianobacterias incluidas en este trabajo.

Se especifican los sistemas de transporte que se han definido en cada caso mediante mutación; entre paréntesis se indican los aminoácidos (aas) que se transportan sólo parcialmente (con baja afinidad o baja velocidad) a través de dichos sistemas. El asterisco indica las actividades de transporte de aminoácidos que se han detectado pero no se han inactivado mediante mutación.

Estirpe	Sistemas o actividades de transporte de aminoácidos		
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Sistemas para aas básicos, de alta afinidad (Gln) y de baja* afinidad	Sistemas N-I y N-II para aas neutros	Aas ácidos*
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7937	Sistema para aas básicos	Sistema para aas neutros (ácidos y básicos)	Sistema para aas ácidos (Gln)
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7413	Arg* y otros aas básicos*	Sistema para aas neutros (ácidos y básicos)	Aas ácidos*
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7107	Sistema para aas básicos	Sistema para aas neutros	Aas ácidos* (Gln)
<i>Calothrix</i> sp. PCC 7601	Aas básicos*	Sistema para aas neutros (ácidos y básicos)	Aas ácidos*
<i>Fischerella muscicola</i> UTEX 1829	Aas básicos*	Aas neutros*	Aas ácidos*
<i>Pseudanabaena</i> sp. PCC 6903		Sistema general de transporte de aas	Asp* (Glu)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942		Aas neutros no polares* (His, Gln, Gly, Ser y Asn)	Aas ácidos*
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Sistema para aas básicos (Gln)	Sistema para aas neutros excepto Gln y sistema para Gln* de alta afinidad	Glu*

4.1.3. Identificación de genes de sistemas de transporte de aminoácidos

En este trabajo se han identificado los genes que determinan algunos de los elementos de los sistemas de transporte de aminoácidos neutros de las cianobacterias *Synechocystis* sp. PCC 6803 y *Anabaena* sp. PCC 7120.

La disponibilidad de una parte de la secuencia del genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1995) permitió seleccionar ocho ORFs cuyos productos hipotéticos eran homólogos a proteínas de transporte de otros organismos. Estas ORFs

fueron inactivadas mediante inserción de una casete de resistencia al antibiótico Km, consiguiéndose en siete de los casos mutantes cromosómicamente homogéneos. Se determinó que las ORFs *slr0467* y *slr0559* (inactivadas en las estirpes CSX28a, CSX28b, CSX18a y CSX18b) son necesarias para el transporte de los aminoácidos neutros Ala, Gly, Leu, Phe, Pro y Ser (Tabla 21), por lo que las denominamos *natA* y *natB*, respectivamente. Los mutantes de estas ORFs también estaban afectados en el transporte de Asp. No obstante, puesto que la velocidad de transporte de este aminoácido en la estirpe PCC 6803 es notablemente baja (Tabla 8), no sería extraño que dicho transporte tuviera lugar en realidad a través del sistema de transporte para aminoácidos neutros.

El gen *natA* determinaría una proteína de 267 aminoácidos homóloga al componente conservado de los sistemas de transporte tipo ABC y el gen *natB* una proteína de 454 aminoácidos homóloga a la proteína periplásmica de unión de sustrato de algunos sistemas de transporte tipo ABC y también al receptor metabotrópico del Glu de *Rattus norvegicus* (Tabla 18). Como ya se ha indicado, en base a la obtención de un mutante resistente a la azaleucina, denominado AZA1, Labarre *et al.* (1987) habían descrito que *Synechocystis* sp. PCC 6803 posee un sistema capaz de transportar todos los aminoácidos neutros excepto la Gln. Puesto que los mutantes insercionales de los genes *natA* o *natB* reproducían el fenotipo de transporte de aminoácidos del mutante AZA1, se concluye que los genes *natA* y *natB* determinan el componente conservado y la proteína periplásmica, respectivamente, del sistema de transporte de aminoácidos neutros de *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Las proteínas que muestran los mayores porcentajes de identidad con los productos teóricos de los genes *natA* y *natB* de la estirpe PCC 6803 son BraF (40% de residuos idénticos) y BraC (25%) de *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Las proteínas BraF y BraC son elementos del sistema de transporte de alta afinidad de aminoácidos de cadena lateral ramificada LIV-I (Hoshino y Kose, 1989, 1990a). En *P. aeruginosa* se han descrito tres sistemas para el transporte de este tipo de aminoácidos, denominados sistema LIV-I, LIV-II y LIV-III. El sistema LIV-I transporta Leu, Ile, Val, Ala y Thr, y es un sistema de tipo multicomponente que está determinado por la agrupación de genes *braCDEFG* (Hoshino y Kose, 1990a), que constituye un operón (Hoshino y Kose, 1990b). BraC es la proteína periplásmica de unión de sustrato (Hoshino y Kose, 1989), BraD y BraE son las proteínas integrales de membrana y BraF y BraG los componentes conservados del sistema (Hoshino y Kose, 1990a). Los sistemas LIV-II y LIV-III son de tipo monocomponente.

Los genes *natA* y *natB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 no están agrupados, sino que, por el contrario, ocupan posiciones distantes en el genomio (posición 2601 kb y 2799 kb, respectivamente). Permanece sin identificar al menos otro gen del sistema de

transporte de aminoácidos neutros de la estirpe PCC 6803 (que hemos denominado sistema Nat), el correspondiente a la proteína integral de membrana. La ORF *slr0468*, adyacente al gen *natA*, también fue inactivada debido a su proximidad a dicho gen (Fig. 18C), a pesar de que el producto hipotético de esta ORF no mostraba homología con ninguna proteína conocida. El fenotipo de transporte de aminoácidos de este mutante (estirpe CSX39) resultó ser completamente normal, descartándose una posible implicación de dicha ORF en el transporte de aminoácidos. Al igual que ocurre con *natA* y *natB*, muchos genes que en otras bacterias y cianobacterias se encuentran organizados en operones ni siquiera están agrupados en el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Una característica de la organización genómica de esta estirpe que podría contribuir a explicar esta peculiaridad es la existencia de 99 ORFs, dispersas por todo el genomio, que muestran similitud con genes de transposasas, lo que sugiere que durante la evolución de este organismo han ocurrido reorganizaciones genómicas frecuentes (Kaneko *et al.*, 1996).

En todas las estirpes incluidas en este trabajo se encuentran secuencias homólogas a los genes *natA* y *natB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Fig. 21). Puesto que, como ya se ha mencionado, todas las estirpes muestran la capacidad de transportar al menos aminoácidos neutros, es posible que los genes *natA* y *natB* estén ampliamente distribuidos entre las cianobacterias.

También se ha clonado y secuenciado en este trabajo una región del genomio de *Anabaena* sp. PCC 7120 que hibrida con el gen *natA* de la estirpe PCC 6803. Esta región incluye dos ORFs cuyos productos hipotéticos muestran homología con proteínas de sistemas de transporte, que hemos denominado *natC* y *natA*.

El gen *natC* determinaría una proteína de 377 aminoácidos homóloga a la proteína BraE de *P. aeruginosa* (34% de residuos idénticos) con varios dominios de expansión de membrana (Fig. 26), lo que sugiere que podría tratarse del componente hidrofóbico de membrana del sistema de transporte de la estirpe PCC 7120 homólogo al sistema Nat de la cianobacteria PCC 6803. El grado de similitud es aún mayor (57%) con el producto hipotético de la ORF *sll0146* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Fig. 25). Esta ORF, situada en la posición 2192 kb, determinaría una proteína de 372 aminoácidos (Kaneko *et al.*, 1996) que, por lo tanto, podría ser el componente de membrana del sistema Nat de la estirpe PCC 6803, aunque su función ha de estudiarse mediante su inactivación.

El gen *natA* de la estirpe PCC 7120 determinaría una proteína de 260 aminoácidos homóloga a la proteína NatA de la estirpe PCC 6803 (69% de residuos idénticos) y a la proteína BraF de *P. aeruginosa* (41% de residuos idénticos) (Fig. 27). El codón de iniciación propuesto para el gen *natA*, TTG, se ha encontrado en otros genes de cianobacterias (Tsinoremas *et al.*, 1991; García-Domínguez y Florencio, en prensa),

existiendo delante del mismo una posible secuencia de unión al ribosoma (Fig. 24).

La inactivación de los genes *natC* y *natA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 confirmó el papel de esta región genómica en el transporte de aminoácidos neutros. De hecho, el fenotipo de transporte de los mutantes CSX60 (*natA*::C.S3) y CSX62 (*natC*::C.S3) (Tabla 23) resultó ser similar al del mutante espontáneo resistente a la azaleucina CS343 (Tabla 10), lo que sugiere que los genes *natC* y *natA* determinarían el componente integral de membrana y el componente conservado, respectivamente, del sistema de transporte de aminoácidos neutros N-I de *Anabaena* sp. PCC 7120. No obstante, puesto que la casete C.S3 empleada para generar el mutante CSX62 posee terminadores de la transcripción y el gen *natC* está localizado delante del gen *natA*, no se puede descartar la posibilidad de que el fenotipo de dicho mutante se deba a un efecto polar sobre la transcripción de *natA*.

No se ha identificado el gen de la proteína periplásmica de unión de sustrato de este sistema, habiéndose descartado, sin embargo, la posibilidad de que se encuentre un gen homólogo a *natB* en la región clonada que contiene los genes *natC* y *natA*. Los genes *natC* y *natA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 están agrupados y, aunque no se han realizado estudios a nivel transcripcional, su disposición sugiere que podrían constituir un operón. De hecho, el análisis de su secuencia indica que el final de la región codificante del gen *natC* solapa con el inicio del gen *natA*, lo que permitiría que hubiera incluso acoplamiento traduccional (Fig. 24). Esta disposición facilitaría la expresión coordinada de ambos genes.

La región que contiene los genes *natC* y *natA* se encuentra flanqueada por una serie de repeticiones directas imperfectas de heptanucleótidos cuyas secuencias consenso son GACTA(AT)T, GGATTGG y CATTACC. Como se indicó en la sección de Resultados, se ha descrito la existencia de secuencias similares en regiones adyacentes a otros genes de cianobacterias formadoras de heterocistos (Mazel *et al.*, 1990), concretamente en genes implicados en la diferenciación del heterocisto (Holland y Wolk, 1990), en la fijación de nitrógeno (Mulligan y Haselkorn, 1989), en el transporte de electrones fotosintético (Kallas *et al.*, 1988), en la biosíntesis de Arg (Floriano *et al.*, 1992), en la biosíntesis de Thr (Parsot y Mazel, 1987) y en la determinación de componentes estructurales del ficobilisoma (Mazel *et al.*, 1990), entre otros. Estos elementos repetidos podrían proceder de elementos móviles similares a secuencias de inserción que hubieran quedado en una posición fija en el genomio, confiriendo alguna ventaja selectiva (Mazel *et al.*, 1990) o actuando como sitios de unión de proteínas específicas (Holland y Wolk, 1990; Mazel *et al.*, 1990). No obstante, la función de estas secuencias, caso de tener alguna, se desconoce realmente.

Como ya se comentó, los resultados obtenidos mediante el análisis de los mutantes espontáneos de transporte derivados de la estirpe PCC 7120 no permitían

distinguir si los sistemas N-I y N-II eran independientes o si se trataba en realidad de dos componentes de un mismo sistema. La posibilidad de que las mutaciones de las estirpes CS343 y CS389 (en base a las cuales se definieron ambos sistemas) afectasen a dos proteínas periplásmicas con diferentes especificidades que interaccionaran con un mismo complejo de membrana puede descartarse ya que, si este fuera el caso, las estirpes CSX60 y CSX62, mutadas en la región que determina el complejo de membrana del sistema, serían incapaces de transportar cualquier aminoácido neutro, mientras que el fenotipo real de dichas estirpes es similar al del mutante CS343. Por lo tanto, parece que los sistemas N-I y N-II son independientes, o al menos poseen componentes independientes distintos a la proteína periplásmica.

La naturaleza multicomponente del sistema de transporte de aminoácidos neutros de la estirpe *Synechocystis* sp. PCC 6803 y del sistema N-I de *Anabaena* sp. PCC 7120 está en consonancia con las características cinéticas (K_S baja) y energéticas (transporte concentrativo y activo) deducidas en este trabajo y descritas previamente para el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Labarre *et al.*, 1987). También para el caso del sistema de transporte de aminoácidos básicos de la estirpe PCC 6803 se ha sugerido una estructura de tipo multicomponente en base al análisis de una serie de mutantes espontáneos (Flores y Muro-Pastor, 1990).

4.1.4. Funciones fisiológicas del transporte de aminoácidos en cianobacterias

4.1.4.1. Utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno

En general, las cianobacterias pueden vivir en hábitats oligotróficos, en los que los aminoácidos no son abundantes. Sin embargo, como se describió en la Introducción, algunos aminoácidos como la Arg, la Asn o la Gln pueden ser empleados como fuente de nitrógeno por algunas estirpes de cianobacterias (Neilson y Larsson, 1980; Flores y Herrero, 1994). Ello requiere la existencia de los sistemas de transporte que promuevan la acumulación del aminoácido en el interior celular. Una posible función para algunos de los sistemas de transporte de aminoácidos descritos en este trabajo podría ser, por lo tanto, una función nutricional, en la asimilación de ciertos aminoácidos por parte de algunas estirpes de cianobacterias. De hecho, se ha demostrado el papel de los sistemas de transporte de aminoácidos básicos en la utilización de la Arg como fuente de nitrógeno en *Anabaena* sp. PCC 7120 (Herrero y Flores, 1990) y *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Flores y Muro-Pastor, 1990).

La utilización de un aminoácido como fuente de nitrógeno requiere, además del transporte, que existan las enzimas adecuadas para su metabolización. Entre los aminoácidos que se metabolizan de modo más apreciable en *Anabaena* sp. PCC 7120 se encuentran la Pro, la Gln, la Arg y el Asp (Tabla 7). La Pro parece metabolizarse mediante la prolina oxidasa, enzima que genera Glu, cuya presencia en *Anabaena* sp. PCC 7120 ha

sido descrita (Spence y Stewart, 1986) y para la que se encuentra presente un posible gen en el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Kaneko *et al.*, 1996). La Gln se cataboliza principalmente mediante la glutamato sintasa, como ya se sugirió en la sección de Resultados (apartado 3.1.1; véase también Flores y Herrero, 1994). La Arg se cataboliza con el concurso de la arginasa (E. Flores, resultados no publicados) y, de hecho, en el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 existen ORFs que podrían constituir los genes estructurales que determinan dicha enzima (Kaneko *et al.*, 1996). Finalmente, sin embargo, no se dispone de datos que permitan establecer la identidad de las enzimas implicadas en la metabolización del Asp en *Anabaena* sp. PCC 7120.

Con respecto al catabolismo de la Asn, los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 7) sugieren la existencia de una asparraginasa en la estirpe PCC 7120. Por otra parte, la interconversión metabólica entre Gly y Ser en esta estirpe es también evidente (Tabla 7; véase Codd y Stewart, 1973). Los resultados obtenidos con el resto de los aminoácidos estudiados, que sólo experimentan una conversión limitada en otro(s) metabolito(s), podrían explicarse, por ejemplo, por la actividad reversible de algunas enzimas que catalizan el último paso de las rutas biosintéticas correspondientes (como algunas transaminasas).

Puesto que la mayoría de los aminoácidos incluidos en este trabajo no sufrían una extensa catabolización en el tiempo que duraban los ensayos de transporte efectuados, se puede considerar, en general, que la medida de la radiactividad retenida por las células constituye una buena estimación de la actividad de transporte del aminoácido en cuestión.

4.1.4.2. Retención cíclica de aminoácidos hidrofóbicos

Los mutantes espontáneos afectados en el transporte de aminoácidos neutros de *Anabaena* sp. PCC 7120 y PCC 7937, *Nostoc* sp. PCC 7413 y PCC 7107, *Calothrix* sp. PCC 7601 y *Pseudanabaena* sp. PCC 6903 mostraban una acumulación de los aminoácidos Ala, Val, Phe, Ile y Leu en el medio de cultivo (Fig. 15 y Fig. 17). Esta observación sirve como base para proponer una función general del sistema de transporte de aminoácidos neutros de las cianobacterias en la recuperación de aminoácidos que, debido a su naturaleza hidrofóbica, podrían perderse con facilidad del interior celular mediante difusión. De hecho, en las correspondientes estirpes silvestres se observa una cierta pérdida, aunque muy limitada, de estos aminoácidos (Tablas 16 y 17).

En el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120 este papel de recuperación estaría desempeñado por el sistema N-I, que constituye la principal vía de transporte de los aminoácidos observados en el medio externo (en base a experimentos de competencia [Tabla 6] se asume que los aminoácidos Val e Ile se transportan a través del mismo sistema que la Leu). Consistentemente con esta idea, la estirpe CS327, afectada

simultáneamente en el transporte de aminoácidos básicos y en el sistema N-II, pero no en el sistema N-I, no mostraban una acumulación apreciable de aminoácidos en el medio de cultivo (Tabla 16).

Una hipótesis alternativa para explicar la acumulación de aminoácidos en el medio de cultivo de las estirpes mutantes, sería que los aminoácidos detectados procediesen de lisis celular. Sin embargo, esto no es probable, ya que si este fuera el caso, el aminoácido que se encontraría mayoritariamente en el medio sería el Glu, que es el más abundante en las células, lo que no coincide con lo observado. También puede descartarse la posibilidad de que la liberación de aminoácidos se debiese a la superproducción de los mismos, pues los mutantes de transporte descritos presentan niveles intracelulares de aminoácidos normales (al menos en el caso de los mutantes derivados de las estirpes PCC 7120 [Fig. 6] y PCC 6903 [no mostrado]). Por otra parte, en este trabajo también se han obtenido mutantes derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120 superproductores de algunos aminoácidos neutros (estirpes CS341 y CS342) que, sin embargo, no excretan aminoácidos al medio (no mostrado). Estos mutantes no estaban afectados en su capacidad de transporte de aminoácidos (Tabla 12), lo que podría explicar el hecho de que no se detectase excreción de aminoácidos en los mismos, a pesar de ser estirpes superproductoras. En consonancia con esto, en *Escherichia coli* se ha descrito que la excreción de Pro en estirpes superproductoras requiere un defecto adicional en el sistema de transporte y/o en el catabolismo de este aminoácido (Rancourt *et al.*, 1984).

Los mutantes insercionales de los genes *natA* (estirpe CSX28a) y *natB* (estirpe CSX18b) de *Synechocystis* sp. PCC 6803 presentan, además de la incapacidad de transportar dichos aminoácidos, el mismo fenotipo de acumulación extracelular de aminoácidos que los mutantes espontáneos derivados de otras cianobacterias (Fig. 20), lo que constituye una prueba adicional de la participación de los sistemas de transporte de aminoácidos neutros en la recuperación de aminoácidos hidrofóbicos. El mutante espontáneo AZA1 de la estirpe PCC 6803 muestra una liberación de aminoácidos similar a la de los mutantes CSX28a y CSX18b.

Se ha descrito que los aminoácidos hidrofóbicos atraviesan las bicapas lipídicas con más facilidad que los aminoácidos polares o con carga. Los valores de permeabilidad de la membrana para aminoácidos hidrofóbicos pueden ser hasta 30-100 veces superiores que para los aminoácidos polares (Chakrabarti y Deamer, 1992; Naoi *et al.*, 1977). Por otra parte, existen referencias que demuestran que la liberación de aminoácidos al medio extracelular por las cianobacterias es un fenómeno conocido desde hace más de cuarenta años (Fogg, 1952; Stewart, 1963; Watanabe, 1951).

La posibilidad de que ciertos sistemas de transporte de bacterias puedan desempeñar una función fisiológica en la recuperación de metabolitos perdidos mediante

difusión a través de las membranas se ha sugerido en diversas ocasiones (Ames, 1986; Krämer, 1994; Kleiner, 1993). La alta eficiencia de los sistemas de transporte multicomponente, caracterizados como ya se indicó por sus bajos valores de K_s , los hace idóneos para realizar esta función (Ames, 1986), que se ha denominado "retención cíclica" (Kleiner, 1993). Concretamente en el caso de los aminoácidos, cuya biosíntesis resulta costosa desde el punto de vista energético, la retención cíclica puede representar una importante ventaja evolutiva (Ames, 1986). Recientemente se ha propuesto que en *Synechocystis* sp. PCC 6803 la función del sistema multicomponente de transporte de glucosilglicerol, un metabolito osmoprotector, consiste en la recuperación de dicho compuesto, ya que el mutante del gen *ggtA*, que determina el componente conservado del sistema, acumula glucosilglicerol en el medio de cultivo (Hagemann *et al.*, 1997). Esta misma hipótesis también se sugirió como explicación del fenotipo del mutante AZA1 de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Labarre *et al.*, 1987). Finalmente, también en la cianobacteria *Gloeothoece* sp., algunos sistemas de transporte de aminoácidos podrían estar implicados en la recuperación de ciertos aminoácidos (Gly, Ser, Ala y Gln) que se liberan al medio cuando este organismo fija nitrógeno en el período de oscuridad, que serían reasimilados en el período de luz en cultivos sometidos a ciclos luz/oscuridad (Flynn y Gallon, 1990).

4.1.4.3. Papel en el crecimiento diazotrófico de *Anabaena* sp. PCC 7120

Algunos mutantes de transporte de aminoácidos derivados de *Anabaena* sp. PCC 7120 muestran un defecto en el crecimiento a expensas de nitrógeno atmosférico. La observación al microscopio de las suspensiones celulares correspondientes, tras 48 h de incubación en medio sin nitrógeno combinado, indicaba que los mutantes presentan una frecuencia de heterocistos menor que la estirpe silvestre. En consonancia con ello, estos mutantes mostraban niveles bajos de actividad nitrogenasa (Tabla 15). Los mutantes más afectados en el transporte de aminoácidos, las estirpes CS326 y CS349, no crecían en absoluto en ausencia de nitrógeno combinado (Fig. 9B y Fig. 10).

Los mutantes CSX60 y CSX62 de *Anabaena* sp. PCC 7120, portadores de una lesión genética definida en la región *nat*, también resultaron estar claramente afectados en la capacidad de crecimiento diazotrófico (Fig. 29B y Fig. 30), confirmándose de este modo que existe una relación entre los procesos de transporte de aminoácidos y la capacidad de crecimiento a expensas del nitrógeno atmosférico.

Las estirpes CS326, CS349, CS343, CSX60 y CSX62 mostraban una notable fragmentación de sus filamentos cuando se incubaban en medio sin nitrógeno combinado (Fig. 11). En *Anabaena* sp. PCC 7120 se han descrito algunos mutantes que no son capaces de crecer a expensas de nitrógeno atmosférico y presentan un fenotipo de

fragmentación similar, aunque se desconoce cuáles son los genes afectados en cada caso (Buikema y Haselkorn, 1991b; Ernst *et al.*, 1992; Kallas *et al.*, 1985). También existen mutantes de cianobacterias que se fragmentan cuando se someten a otras carencias nutricionales, como la falta de sulfato en el medio (Bauer *et al.*, 1995). Se ha sugerido que al menos algunos tipos de fragmentación podrían estar programados genéticamente como respuesta a la existencia de unas condiciones ambientales adversas, de modo que la fragmentación, al generar filamentos cortos, podría favorecer la dispersión de las células con objeto de encontrar ambientes más adecuados para el crecimiento (Bauer *et al.*, 1995). La fragmentación de los filamentos observada en los mutantes CS326, CS349, CS343, CSX60 y CSX62 en ausencia de nitrógeno combinado podría ser una respuesta de este tipo, disparada como consecuencia de la carencia de nitrógeno a que se someten dichos mutantes.

El defecto en el crecimiento diazotrófico de los mutantes de transporte podría explicarse *a priori* como una consecuencia de la pérdida de aminoácidos que experimentan estos mutantes, fenómeno que ocurre tanto en medio con nitrato como en medio sin nitrógeno combinado (Tabla 16). En este último caso las células podrían tener mayor dificultad para afrontar la doble situación de estrés de nitrógeno que supone la falta de una fuente de nitrógeno combinado, por un lado, y la notable pérdida de aminoácidos a la que están sometidas, por otro. Sin embargo, el comportamiento del mutante CS389 no es consistente con esta hipótesis, ya que esta estirpe es capaz de crecer a expensas del nitrógeno atmosférico y desarrollar heterocistos (Tabla 15) a pesar de mostrar una acumulación de aminoácidos en el medio externo similar a la de otros mutantes afectados en el crecimiento diazotrófico (Tabla 16). En cualquier caso, el fenotipo del mutante CS389 resulta en cierto modo inesperado, ya que parece estar menos afectado en el crecimiento diazotrófico que su parental CS343, pudiendo haber experimentado esta estirpe alguna mutación compensatoria.

Por otra parte, la alteración en el crecimiento diazotrófico de algunos de los mutantes aislados en este trabajo podría explicarse si ciertos sistemas de transporte de aminoácidos tuvieran una participación en la transferencia intercelular de metabolitos que se ha postulado que tiene lugar durante el desarrollo de los heterocistos (Haselkorn, 1978; Wolk, 1989, 1991) y/o en la transferencia que ha de tener lugar durante el crecimiento a expensas de dinitrógeno (Wolk *et al.*, 1994). Como se comentó en la Introducción, se ha sugerido que el patrón de diferenciación de heterocistos en el filamento podría estar dirigido o determinado por la existencia de un gradiente de concentración de aminoácidos a lo largo del mismo, que podría establecerse mediante la activación de ciertos sistemas de transporte, aunque no hay ninguna prueba de ello. Sí parece cierto, sin embargo, que hay un intercambio de metabolitos entre los heterocistos y las células vegetativas, que permite cubrir la necesidad de esqueletos carbonados que

tienen los heterocistos y la necesidad de nitrógeno fijado (en forma de aminoácidos) que tienen las células vegetativas. Concretamente, se ha propuesto que aminoácidos como la Ala, además de algún azúcar, podrían transferirse desde las células vegetativas hasta los heterocistos (Jüttner, 1983) y que la Gln podría hacerlo en el sentido contrario (Thomas *et al.*, 1977).

Un mecanismo para esta transferencia, que proponemos como hipótesis de trabajo bajo la denominación de "modelo periplásmico de transferencia intercelular de nitrógeno", podría consistir en la liberación por parte de los heterocistos o de las células vegetativas de ciertos aminoácidos al espacio periplásmico, donde podrían difundir, libremente o unidos a proteínas periplásmicas, antes de ser transportados al interior de las células adyacentes. Esta hipótesis, que exige la continuidad del espacio periplásmico que de hecho parece existir a lo largo del filamento, explicaría por qué se necesitan algunos sistemas de transporte de aminoácidos para la inducción y/o el mantenimiento del crecimiento diazotrófico en *Anabaena* sp. PCC 7120.

Aunque en la literatura no se ha discutido con claridad este aspecto, resulta evidente que el o los aminoácidos transferidos desde los heterocistos hasta las células vegetativas han de ser metabolizados eficazmente por éstas para poder servir como fuente de nitrógeno. Los resultados referentes al catabolismo de aminoácidos discutidos más arriba (véase Tabla 7) sugieren que los aminoácidos que podrían representar vehículos de nitrógeno eficaces en *Anabaena* sp. PCC 7120, al ser metabolizados notablemente, son cuatro: la Pro, la Gln, la Arg y el Asp. La comparación de los fenotipos de transporte de aminoácidos y de crecimiento diazotrófico de los mutantes de la estirpe PCC 7120 aislados en este trabajo es compatible con la hipótesis de que estos cuatro aminoácidos o alguno(s) de ellos estén implicados en la transferencia intercelular de nitrógeno. Así, los mutantes de la región genómica *natCA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 muestran una capacidad reducida de crecimiento diazotrófico y, de los aminoácidos citados, no son capaces de transportar la Pro, estando también afectados en el transporte de Gln. Por otra parte, todos los mutantes de transporte de aminoácidos analizados que muestran alguna capacidad de crecimiento a expensas del nitrógeno atmosférico exhiben también una actividad apreciable de transporte de Gln, lo que sugiere que el transporte de Gln podría mantener por sí mismo una cierta capacidad de crecimiento diazotrófico. Finalmente, los mutantes de transporte de aminoácidos que no muestran ningún crecimiento a expensas de dinitrógeno exhiben una actividad prácticamente nula de transporte de aminoácidos neutros y básicos, lo que incluye a los aminoácidos Pro, Gln y Arg. La transferencia intercelular de nitrógeno podría involucrar, por lo tanto, varios sistemas de transporte de aminoácidos en *Anabaena* sp. PCC 7120.

El hecho de que los mutantes de transporte de aminoácidos obtenidos en este trabajo a partir de otras estirpes de cianobacterias pertenecientes a la Sección IV no

mostrarán alteración alguna en la capacidad de crecimiento a expensas de nitrógeno atmosférico podría sugerir que el papel de los sistemas de transporte de aminoácidos en el crecimiento diazotrófico, sea cual sea el mecanismo molecular del mismo, no sea general para cianobacterias formadoras de heterocistos. Alternativamente, podría no haber una equivalencia exacta entre los sistemas de transporte que realizan dicha función en las distintas estirpes, existiendo la posibilidad de que, por ejemplo, *Anabaena* sp. PCC 7937 y *Nostoc* sp. PCC 7107 posean sistemas de transporte de aminoácidos no identificados en este trabajo que tengan una función en el crecimiento diazotrófico. Por otra parte, es de destacar el hecho de que, en el caso de *Nostoc* sp. PCC 7413, los dos mutantes aislados (CS441 y CS456) mantienen una notable actividad de transporte de Arg, de más de 30 nmol·min⁻¹·mg⁻¹ Chl (para una concentración de sustrato de 10 µM).

4.2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE UREA Y AMONIO EN *Synechocystis* sp. PCC 6803

4.2.1. Transporte de urea

En este trabajo se ha identificado un gen que determina un componente conservado del sistema de transporte de urea de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Los mutantes CSX29a y CSX29b, generados mediante inserción de una casete de resistencia al antibiótico Km en la ORF *sll0374*, muestran una baja actividad de transporte de urea, que supone un 1-2% del valor presentado por la estirpe silvestre PCC 6803. Denominamos a la ORF *sll0374* *urtA* (de "urea transport"). El producto hipotético del gen *urtA* muestra homología con el componente conservado de los sistemas de transporte tipo ABC, siendo con la proteína BraG de *Pseudomonas aeruginosa* con la que presenta un porcentaje de aminoácidos idénticos más elevado (42%). La naturaleza del gen *urtA* indica que el sistema de transporte de urea de *Synechocystis* sp. PCC 6803 es de tipo multicomponente. Como ocurre en el caso de los genes *natA* y *natB* de *Synechocystis* sp. PCC 6803, no existen genes adyacentes a *urtA* que tengan capacidad para determinar otras proteínas de transporte, por lo que al menos permanecen sin identificar otros dos genes del sistema: el correspondiente al componente integral de membrana y el de la proteína periplásmica de unión de sustrato.

Los resultados obtenidos en experimentos de hibridación sugieren que existen secuencias homólogas al gen *urtA* en otras estirpes de cianobacterias (Fig. 31) y, por tanto, que dichas estirpes podrían poseer sistemas de transporte de urea similares al de *Synechocystis* sp. PCC 6803. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que fragmentos de DNA correspondientes al componente conservado de otros sistemas de transporte distintos al de la urea podrían hibridar con la sonda utilizada, como por ejemplo en el caso de la hibridación que se observa con el DNA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (Fig. 31), ya que esta estirpe no muestra actividad apreciable de transporte de urea (A.

Valladares, resultados no publicados).

Hasta donde nosotros sabemos, *urtA* es el primer gen de transporte de urea identificado en un organismo procariótico. Anteriormente se había identificado el gen *DUR3* que determina una proteína hidrofóbica requerida para el transporte activo de urea en *Saccharomyces cerevisiae* (ElBerry *et al.*, 1993).

4.2.2. Transporte de amonio

En el genomio de *Synechocystis* sp. PCC 6803 existen tres ORFs, denominadas *sll0108*, *sll1017* y *sll0537*, cuyos productos hipotéticos muestran homología con las permeasas de amonio AMT1 de *Arabidopsis thaliana* (Ninneman *et al.*, 1994) y MEP1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Marini *et al.*, 1994). Las proteínas AMT1 y MEP1 fueron las primeras permeasas de amonio identificadas y, aunque se han encontrado genes que determinan proteínas homólogas a AMT1 y MEP1 en otros organismos, sólo en el caso de *Corynebacterium glutamicum* se ha inactivado el gen correspondiente, confirmándose su papel en el transporte de amonio/metilamonio (Siewe *et al.*, 1996). Dado que las disoluciones acuosas de amonio contienen también amoníaco (pK_a 9,25), que difunde a través de las membranas biológicas y es rápidamente incorporado a Glu mediante la acción de la glutamina sintetasa, formándose Gln, el transporte de amonio ha representado siempre un fenómeno biológico difícil de estudiar (Kleiner, 1993). Esta complicación del estudio del transporte de amonio es más acusada, lógicamente, en el caso de organismos que viven en medios alcalinos.

En las cianobacterias también se ha demostrado que el amoníaco puede difundir a través de la membrana plasmática (Ritchie y Gibson, 1987; Boussiba, 1989).

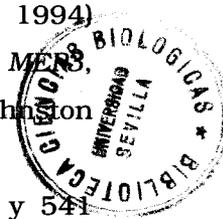
Por otra parte, puesto que el transporte de metilamonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803 se inhibe por la presencia de amonio (Fig. 33) y dicha estirpe es incapaz de crecer utilizando metilamonio como fuente de nitrógeno, lo que indica una baja capacidad de metabolización de este compuesto, se consideró que el metilamonio marcado con ^{14}C representaba un buen análogo para estudiar los sistemas de transporte de amonio de esta cianobacteria, como ya se había establecido para otras estirpes de cianobacterias (Boussiba *et al.*, 1984; Rai *et al.*, 1984) y, anteriormente, para otros organismos (Hackett *et al.*, 1970; Stevenson y Silver, 1977). También en la estirpe PCC 6803, como en el caso de *Synechococcus* sp. PCC 7942 y *Anabaena variabilis* (Boussiba *et al.*, 1984; Rai *et al.*, 1984), una fracción importante del metilamonio transportado se convertía en γ -metilglutamina mediante la acción de la glutamina sintetasa (Tabla 25). El transporte de metilamonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803 es de tipo concentrativo, alcanzándose una relación de metilamonio intracelular/extracelular correspondiente a un valor de gradiente electroquímico del metilamonio equivalente, pero de signo contrario, al potencial eléctrico de la membrana (que en bacterias, en condiciones fisiológicas, es de

alrededor de -100 mV). Estos resultados son consistentes con la propuesta de Boussiba *et al.* (1984) de que el transporte de metilamonio sea dependiente del potencial eléctrico de la membrana.

La inactivación de las ORFs *sll0108*, *sll1017* y *sll0537* mediante inserción de casetes de resistencia a antibióticos puso de manifiesto que la ORF *sll0108* es la responsable de la mayor parte del transporte de metilamonio que se observa al utilizar una concentración de sustrato de 1 μM (un 96% aproximadamente, independientemente del régimen de nitrógeno de las células). Sin embargo, se pudo comprobar que los mutantes dobles de las ORFs *sll0108* y *sll1017* (estirpe CSX201) y *sll0108* y *sll0537* (estirpe CSX200) muestran menor actividad de transporte de metilamonio que el mutante simple de la ORF *sll0108* (estirpe CSX47a) (Fig. 36), confirmándose de este modo que las tres ORFs, *sll0108*, *sll1017* y *sll0537*, están involucradas en el transporte de metilamonio. Hemos denominado a estos genes *amt1* (ORF *sll0108*), *amt2* (ORF *sll1017*) y *amt3* (ORF *sll0537*). La existencia de más de un gen para permeasas de amonio/metilamonio en un mismo organismo también se ha descrito en *Saccharomyces cerevisiae* (Dubois y Grenson, 1979), donde la permeasa MEP2 (André, 1995) representa un sistema de alta afinidad y baja capacidad, mientras que la permeasa MEP1 (Marini *et al.*, 1994) corresponde a un sistema con menor afinidad y mayor capacidad. Un tercer gen, MEP3, homólogo a los anteriores, se ha identificado recientemente en este organismo (Johnson *et al.*, número de acceso EMBL, U40829).

Los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* determinarían proteínas de 507, 442 y 541 aminoácidos, respectivamente, mostrando los perfiles hidrofóbicos característicos de las permeasas de tipo monocomponente. Los datos fisiológicos de que se dispone sobre el transporte de amonio/metilamonio en cianobacterias (Boussiba *et al.*, 1984) son compatibles con que la(s) permeasa(s) correspondiente(s) tengan una estructura de este tipo.

El análisis de los niveles de RNAm de los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* demostró que la expresión de los tres genes está controlada por el régimen de nutrición nitrogenada a que se someten las células, expresándose todos ellos preferentemente en condiciones de deficiencia de nitrógeno (Fig.37). Estos resultados son consistentes con los valores de la actividad de transporte de metilamonio determinada en la estirpe PCC 6803 (Tabla 28). Por otra parte, los experimentos realizados para comparar la expresión de los tres genes bajo el mismo régimen de nitrógeno (Fig. 38) mostraron que, en deficiencia de nitrógeno, el gen *amt1* se expresa 9 veces más que *amt2* y 54 veces más que *amt3*. En condiciones de cultivo con nitrato o con amonio sólo se detecta expresión del gen *amt1*. Estos resultados corroboran el papel del gen *amt1* como responsable de la mayor parte del transporte de metilamonio en *Synechocystis* sp. PCC 6803.



La determinación del sitio de inicio de la transcripción del gen *amt1* permite proponer una región promotora para éste, que consiste en una caja -10 con la secuencia TTGAAT y, 20 nucleótidos por delante de la misma, una secuencia GTAN₃TAC (Fig. 39A) que representa un perfecto sitio de unión de la proteína reguladora NtcA (Luque *et al.*, 1994). De hecho, los ensayos de retardo en gel realizados utilizando la proteína NtcA de *Anabaena* sp. PCC 7120 mostraron que el fragmento de DNA que contiene la región indicada constituye un sustrato para la unión de NtcA (Fig. 40). Estos resultados, junto con el patrón de expresión encontrado, permiten sugerir que el gen *amt1* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 está regulado por la proteína NtcA. Un segundo posible sitio de unión de NtcA se encuentra inmediatamente delante del supuesto codón de iniciación del gen (Fig. 39A), pero, al menos en las condiciones empleadas, la proteína NtcA no mostró capacidad para unirse a esta región (Fig. 40). La función de este segundo sitio consenso NtcA se desconoce, caso de tener alguna.

La represión por amonio es una característica común de los sistemas de transporte de amonio, que, en el caso de las enterobacterias, se realiza mediante el sistema Ntr (revisado por Merrick y Edwards, 1995). En cianobacterias, sin embargo, el control por nitrógeno se lleva a cabo mediante la proteína NtcA, que pertenece a la familia Crp de reguladores transcripcionales procarióticos (Vega-Palas *et al.*, 1992). La proteína NtcA activa la expresión de los genes reprimibles por amonio cuando las células se incuban en ausencia de este nutriente (Vega-Palas *et al.*, 1992; Luque *et al.*, 1994). Se ha descrito que el sistema de transporte de amonio/metilamonio de *Synechococcus* sp. PCC 7942 se reprime cuando las células se cultivan en medio con amonio (Boussiba y Gibson, 1987) y requiere la existencia de un gen *ntcA* intacto para su expresión (Vega-Palas *et al.*, 1992). Por lo tanto, los resultados obtenidos a nivel molecular en este trabajo concuerdan con los datos fisiológicos y genéticos previamente descritos para *Synechococcus* sp. PCC 7942.

Los datos obtenidos en experimentos de hibridación realizados en condiciones permisivas sugieren que el gen cuantitativamente más importante para el transporte de amonio/metilamonio, *amt1*, es también el más conservado y el que se encuentra más ampliamente distribuido entre las cianobacterias (Fig. 41).

5. CONCLUSIONES

1. Las cianobacterias son capaces de transportar un amplio rango de aminoácidos mediante un bajo número de sistemas de transporte que muestran, en general, baja especificidad de sustrato. Todas las estirpes estudiadas poseen, al menos, un sistema de transporte de aminoácidos neutros.
2. El sistema de transporte de aminoácidos neutros de *Synechocystis* sp. PCC 6803 y uno de los presentes en *Anabaena* sp. PCC 7120 son de tipo multicomponente, habiéndose identificado los genes *natA* y *natB* de la estirpe PCC 6803, correspondientes al componente conservado y a la proteína de unión de sustrato, y los genes *natA* y *natC* de la estirpe PCC 7120, correspondiente éste último a la proteína integral de membrana.
3. El transporte de aminoácidos neutros tiene en cianobacterias un papel fisiológico en la recuperación de aminoácidos hidrofóbicos que se pierden del interior celular mediante difusión.
4. En *Anabaena* sp. PCC 7120 algunos de los sistemas de transporte de aminoácidos juegan un papel en el crecimiento diazotrófico de la estirpe. En base a esta observación, se propone un modelo periplásmico para la transferencia intercelular de nitrógeno en esta cianobacteria.
5. El gen *urtA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 determina el componente conservado de un sistema tipo ABC para el transporte de urea.
6. Los genes *amt1*, *amt2* y *amt3* de *Synechocystis* sp. PCC 6803 determinan permeasas tipo monocomponente para el transporte de amonio/metilamonio, siendo *amt1* el responsable de la mayor parte de la actividad de transporte observada en dicha estirpe.
7. La expresión de *amt1*, *amt2* y *amt3* está controlada por el régimen de nutrición nitrogenada, siendo mayor en condiciones de deficiencia de nitrógeno. El gen *amt1*, que presenta un promotor regulable por NtcA, se expresa a un nivel mayor que *amt2* o *amt3* en cualquiera de las condiciones de disponibilidad de nitrógeno estudiadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Adams MD, Wagner LM, Graddis TJ, Landick R, Antonucci TK, Gibson AL y Oxender DL (1990) Nucleotide sequence and genetic characterization reveal six essential genes for the LIV-I and LS transport systems of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**:11436-11443

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **213**:403-410

Ames GF-L (1986) Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:397-425

Ames GF-L, Mimura CS y Shyamala V (1990) Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: traffic ATPases. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**:429-446

André B (1995) An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**:1575-1611

Antonucci TK y Oxender DL (1986) The molecular biology of amino acid transport in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **28**:145-180

Barnell WO, Liu J, Hesman TL, O'Neill MC y Conway T (1992) The *Zymomonas mobilis* *glf*, *zwf*, *edd*, and *glk* genes form an operon: localization of the promoter and identification of a conserved sequence in the regulatory region. *J. Bacteriol.* **174**:2816-2823

Bauer CC, Buikema WJ, Black K y Haselkorn R (1995) A short-filament mutant of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 that fragments in nitrogen-deficient medium. *J. Bacteriol.* **177**:1520-1526

Beale SI (1994) Biosynthesis of cyanobacterial tetrapyrrole pigments: hemes, chlorophylls, and phycobilins. En DA Bryant, ed, *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 519-558

Bell AW, Buckel SD, Groarke JM, Hope JN, Kingsley DH y Hermodson MA (1986) The nucleotide sequences of the *rbsD*, *rbsA*, and *rbsC* genes of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* **261**:7652-7658

Bishop L, Agbayani RJ, Ambudkar SV, Maloney PC y Ames GF (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6953-6957

Black TA y Wolk CP (1994) Analysis of a Het⁻ mutation in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 implicates a secondary metabolite in the regulation of heterocyst spacing. *J. Bacteriol.* **176**:2282-2292

Boos W y Lucht JM (1996) Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters. En FC Neidherdt, R Curtis, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter y HE Umbarger, eds, *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1175-1209

Boussiba S (1989) Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* **30**:303-308

Boussiba S y Gibson J (1987) Regulation of methylammonium/ammonium transport in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (PCC 7942). *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:289-293

Boussiba S, Dilling W y Gibson J (1984) Methylammonium transport in *Anacystis nidulans* R-2. *J. Bacteriol.* **160**:204-210

- Boyer HW y Roulland-Dussoix D** (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472
- Buick R** (1992) The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient archaean lakes. *Science* **255**:74-77
- Buikema WJ y Haselkorn R** (1991a) Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes Dev.* **5**:321-330
- Buikema WJ y Haselkorn R** (1991b) Isolation and complementation of nitrogen fixation mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **173**:1879-1885
- Cai Y y Wolk CP** (1990) Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. *J. Bacteriol.* **172**:3138-3145
- Chakrabarti AC y Deamer DW** (1992) Permeability of lipid bilayers to amino acids and phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* **1111**:171-177
- Chapman JS y Meeks JC** (1983) Glutamine and glutamate transport by *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* **156**:122-129
- Chauvat F, de Vries L, Van der Ende A y Van Arkel GA** (1986) A host-vector system for gene cloning in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* **204**:185-191
- Chiang GG, Schaefer MR y Grossman AR** (1992) Transformation of the filamentous cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* by conjugation or electroporation. *Plant Physiol. Biochem.* **30**:315-325
- Codd GA y Stewart WDP** (1973) Pathways of glycollate metabolism in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.* **94**:11-28
- Devereux J, Haerberli P y Smithies O** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**:387-395
- di Guan C, Li P, Riggs PD e Inouye H** (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67**:21-30
- Dubois E y Grenson M** (1979) Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Mol. Gen. Genet.* **175**:67-76
- ElBerry HM, Majumdar ML, Cunningham TS, Sumrada RA y Cooper TG** (1993) Regulation of the urea active transporter gene (*DUR3*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **175**:4688-4698
- Elhai J y Wolk CP** (1988a) A versatile class of positive-selection vectors based on the nonviability of palindrome-containing plasmids that allows cloning into long polylinkers. *Gene* **68**:119-138
- Elhai J y Wolk CP** (1988b) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**:747-755
- Elhai J y Wolk CP** (1990) Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J.* **9**:3379-3388
- Elhai J, Cai Y y Wolk CP** (1994) Conduction of pEC22, a plasmid coding for MR.*EcoT*221, mediated by a resident Tn3-like transposon, Tn5396. *J. Bacteriol.* **176**:5059-5067

- Ernst A, Black T, Cai Y, Panoff J-M, Tiwari DN y Wolk CP** (1992) Synthesis of nitrogenase in mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 affected in heterocyst development or metabolism. *J. Bacteriol.* **174**:6025-6032
- Farfán MJ, Martín-Rendón E y Calderón IL** (1996) Effect of gene amplification on threonine production by yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:667-674
- Fath MJ y Kolter R** (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**:995-1017
- Fay P** (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* **56**:340-373
- Fellay R, Perret X, Viprey V, Broughton WJ y Brenner S** (1995) Organization of host-inducible transcripts on the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* **16**:657-667
- Fernández-Piñas F, Leganés F y Wolk CP** (1994) A third genetic locus required for the formation of heterocysts in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **176**:5277-5283
- Flores E y Herrero A** (1994) Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. En DA Bryant, ed, The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 487-517
- Flores E y Muro-Pastor AM** (1990) Mutational and kinetic analysis of basic amino acid transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* **154**:521-527
- Flores E y Muro-Pastor MI** (1988) Uptake of glutamine and glutamate by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**:127-130
- Flores E y Wolk CP** (1985) Identification of facultatively heterotrophic, N₂-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. *J. Bacteriol.* **162**:1339-1341
- Floriano B, Herrero A y Flores E** (1992) Isolation of arginine auxotrophs, cloning by mutant complementation, and sequence analysis of the *argC* gene from the cyanobacterium *Anabaena* species PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **6**:2085-2094
- Flynn KJ y Gallon JR** (1990) Changes in intracellular and extracellular α -amino acids in *Gloeothece* during N₂-fixation and following addition of ammonium. *Arch. Microbiol.* **153**:574-579
- Fogg GE** (1952) The production of extracellular nitrogenous substances by a blue-green alga. *Proc. R. Soc. Ser. B* **139**:372-397
- Frías JE, Mérida A, Herrero A, Martín-Nieto J y Flores E** (1993) General distribution of the nitrogen control gene *ntcA* in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **175**:5710-5713
- Frías JE, Flores E y Herrero A** (1994) Requirement of the regulatory protein NtcA for the expression of nitrogen assimilation and heterocyst development genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **14**:823-832
- Fujita Y, Takahashi Y, Chuganji M y Matsubara H** (1992) The *nifH*-like (*frxC*) gene is involved in the biosynthesis of chlorophyll in the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant Cell Physiol.* **33**:81-92
- Furlong CE** (1987) Osmotic shock-sensitive transport systems. En FC Neidherdt, JL Ingraham, KB Low, B Magasanik, M Schaechter y HE Umbarger, eds, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 768-796

- García-Domínguez M y Florencio FJ** Nitrogen availability and electron transport control the expression of *glnB* gene (encoding P_{II} protein) in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.*, en prensa
- Giddings TH y Staehelin LA** (1981) Observation of microplasmodesmata in both heterocyst-forming and non-heterocyst forming filamentous cyanobacteria by freeze-fracture electron microscopy. *Arch. Microbiol.* **129**:295-298
- Gilson E, Alloing G, Schmidt T, Claverys JP, Dudler R y Hofnung M** (1988) Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *EMBO J.* **7**:3971-3974
- Giovannoni SJ, Turner S, Olsen GJ, Barns S, Lane DJ y Pace NR** (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**:3584-3592
- Hackette SL, Skye GE, Burton C y Segel IH** (1970) Characterization of an ammonium transport system in filamentous fungi with methylammonium-¹⁴C as the substrate. *J. Biol. Chem.* **245**:4241- 4250
- Hagemann M, Richter S y Mikkat S** (1997) The *ggtA* gene encodes a subunit of the transport system for the osmoprotective compound glucosylglycerol in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **179**:714-720
- Hanahan D** (1983) Studies for transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580
- Hancock REW y Carey AM** (1980) Protein D1-A glucose inducible, pore forming protein from the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **8**:105-109
- Haselkorn R** (1978) Heterocysts. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**:319-344
- Healey FP** (1977) Ammonium and urea uptake by some freshwater algae. *Can. J. Bot.* **55**:61-69
- Heilig JS, Lech K y Brent R** (1994) Large-scale preparation of plasmid DNA. *En FA Ausubel, R Brent, RE Kingston, DD Moore, JG Seidman, JA Smith y K Struhl, eds, Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, pp 1.7.1-1.7.15*
- Heller KB, Lin ECC y Wilson TH** (1980) Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **144**:274-278
- Henderson PJF** (1993) The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:708-721
- Herdman M, Janvier M, Waterbury JB, Rippka R, Stanier RY y Mandel M** (1979) Deoxyribonucleic acid base composition of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**:63-71
- Herrero A y Flores E** (1990) Transport of basic amino acids by the dinitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **265**:3931-3935
- Higgins CF** (1992) ABC transporters: from microorganism to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* **8**:67-113
- Higgins CF, Hyde SC, Mimmack MM, Gileadi U, Gill DR y Gallagher MP** (1990) Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**:571-592
- Hogg RW, Voelker C y Von Carlowitz I** (1991) Nucleotide sequence and analysis of the *mgl* operon of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **229**:453-459

- Holland D y Wolk CP** (1990) Identification and characterization of *hetA*, a gene that acts early in the process of morphological differentiation of heterocysts. *J. Bacteriol.* **172**:3131-3137
- Hoshino T y Kose K** (1989) Cloning and nucleotide sequence of *braC*, the structural gene for the leucine-, isoleucine-, and valine-binding protein of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **171**:6300-6306
- Hoshino T y Kose K** (1990a) Cloning, nucleotide sequences, and identification of products of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO *bra* genes, which encode the high-affinity branched-chain amino acid transport system. *J. Bacteriol.* **172**:5531-5539
- Hoshino T y Kose K** (1990b) Genetic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO high-affinity branched-chain amino acid transport system by use of plasmids carrying the *bra* genes. *J. Bacteriol.* **172**:5540-5543
- Hoshino T, Kose-Terai K y Sato K** (1992) Solubilization and reconstitution of the *Pseudomonas aeruginosa* high affinity branched-chain amino acid transport system. *J. Biol. Chem.* **267**:21313-21318
- Ihlenfeldt MJA y Gibson J** (1975) CO₂ fixation and its regulation in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). *Arch. Microbiol.* **102**:13-21
- Jüttner F** (1983) ¹⁴C-labeled metabolites in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena cylindrica* filaments and their presumptive function as transport vehicles of organic carbon and nitrogen. *J. Bacteriol.* **155**:628-633
- Kallas T, Coursin T y Rippka R** (1985) Different organization of *nif* genes in nonheterocystous and heterocystous cyanobacteria. *Plant Mol. Biol.* **5**:321-329
- Kallas T, Spiller S y Malkin R** (1988) Primary structure of cotranscribed genes encoding the Rieske Fe-S and cytochrome f proteins of the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7906. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5794-5798
- Kaneko T, Tanaka A, Sato S, Kotani H, Sazuka T, Miyajima N, Sugiura M y Tabata S** (1995) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 65% to 92% of the genome. *DNA Res.* **2**:153-166
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirose M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M y Tabata S** (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**:109-136
- Khudyakov I y Wolk CP** (1994) A transposon insertion in *hetC*, a gene encoding a protein similar to bacterial ABC protein exporters, prevents heterocyst differentiation in *Anabaena* PCC 7120. *Int. Symp. Phototrophic Prokaryotes, 8th*, Urbino, Italia, Abstr. 55B
- Kleiner D** (1993) NH₄⁺ transport systems. En EP Bakker, ed, Alkali cation transport systems in prokaryotes. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 379-396
- Krämer R** (1994) Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**:75-94
- Kuan J y Saier MH, Jr.** (1993) The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional and evolutionary relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**:209-233

- Kyte J y Doolittle RF** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132
- Labarre J, Thuriaux P y Chauvat F** (1987) Genetic analysis of amino acid transport in the facultatively heterotrophic cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain 6803. *J. Bacteriol.* **169**:4668-4673
- Labarre J, Chauvat F y Thuriaux P** (1989) Insertional mutagenesis by random cloning of antibiotic resistance genes into the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **171**:3449-3457
- Lee-Kaden J y Simonis W** (1982) Amino acid uptake and energy coupling dependent on photosynthesis in *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **151**:229-236
- Leganés F, Fernández-Piñas F y Wolk CP** (1994) Two mutations that block heterocyst differentiation have different effects on akinete differentiation in *Nostoc ellipsosporum*. *Mol. Microbiol.* **12**:679-684
- Li Z-C y Bush DR** (1990) Δ pH-dependent amino acid transport into plasma membrane vesicles isolated from sugar beet leaves. *Plant Physiol.* **94**:268-277
- Liang J, Scappino L y Haselkorn R** (1992) The *pataA* gene product, which contains a region similar to CheY of *Escherichia coli*, controls heterocyst pattern formation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5655-5659
- Ligon PJB, Meyer KG, Martin JA y Curtis SE** (1991) Nucleotide sequence of a 16S rRNA gene from *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Nucleic Acids Res.* **19**:4553
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275
- Luque I, Flores E y Herrero A** (1994) Molecular mechanism for the operation of nitrogen control in cyanobacteria. *EMBO J.* **13**:2862-2869
- Mackinney G** (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**:315-322
- Maldener I, Ernst A, Fernández-Piñas F y Wolk CP** (1994) Characterization of *devA*, a gene required for the maturation of proheterocysts in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **176**:7543-7549
- Maloney PC y Wilson TH** (1996) Ion-coupled transport and transporters. En FC Neidherdt, R Curtis, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter y HE Umbarger, eds, *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1130-1148
- Marger MD y Saier MH, Jr.** (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**:13-20
- Marini A-M, Vissers S, Urrestarazu A y André B** (1994) Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **13**:3456-3463
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL y Tolbert NE** (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**:206-210
- Marsh JL, Erfle M y Wykes EJ** (1984) The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* **32**:481-485

- Martínez-Force E y Benítez T** (1991) Separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids of the internal pool of yeast by reverse-phase liquid chromatography. *Biotechnol. Tech.* **5**:209-214
- Mazel D, Houmard J, Castets AM y Tandeau de Marsac N** (1990) Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *J. Bacteriol.* **172**:2755-2761
- Merrick MJ y Edwards RA** (1995) Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**:604-622
- Miller AG y Espie GS** (1994) Photosynthetic metabolism of cyanate by the cyanobacterium *Synechococcus* UTEX 625. *Arch. Microbiol.* **162**:151-157
- Mimmack ML, Gallagher MP, Pearce SR, Hyde SC, Booth IR y Higgins CF** (1989) Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: stoichiometry of ATP hydrolysis during transport in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:8257-8261
- Mimura CS, Holbrook SR y Ames GF-L** (1991) Structural model of the nucleotide-binding conserved component of periplasmic permeases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:84-88
- Mourez M, Hofnung M y Dassa E** (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J.* **16**:3066-3077
- Mulligan ME y Haselkorn R** (1989) Nitrogen fixation (*nif*) genes of the cyanobacterium *Anabaena* species strain PCC 7120. The *nifB-fdxN-nifS-nifU* operon. *J. Biol. Chem.* **264**:19200-19207
- Murray NE, Brammar WJ y Murray K** (1977) Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* **150**:53-56
- Naoi M, Naoi M, Shimizu T, Malviya AN y Yagi K** (1977) Permeability of amino acids into liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **471**:305-310
- Neilson AH y Larsson T** (1980) The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. *Physiol. Plant.* **48**:542-553
- Nichols JM y Adams DG** (1982) Akinetes. En NG Carr y BA Whitton, eds, *The biology of cyanobacteria*. Oxford, Blackwell, pp 387-412
- Nikaido H** (1993) Transport across the bacterial outer membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:581-589
- Nikaido H y Saier MH, Jr.** (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science* **258**:936-942
- Ninnemann O, Jauniaux JC y Frommer WB** (1994) Identification of a high affinity NH_4^+ transporter from plants. *EMBO J.* **13**:3464-3471
- Parsot C y Mazel D** (1987) Cloning and nucleotide sequence of the *thrB* gene from the cyanobacterium *Calothrix* PCC 7601. *Mol. Microbiol.* **1**:45-52
- Pearson WR y Lipman DJ** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448
- Postma PW, Lengeler JW y Jacobson GR** (1996) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems. En FC Neidherdt, R Curtis, JL Ingraham, ECC Lin, KB Low, B Magasanik, WS Reznikoff, M Riley, M Schaechter y HE Umberger, eds, *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp 1149-1174

- Quiocho FA y Ledvina PS** (1996) Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20**:17-25
- Raboy B y Padan E** (1978) Active transport of glucose and α -methyl-glucoside in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *J. Biol. Chem.* **253**:3287-3291
- Rai AN, Rowell P y Stewart WDP** (1984) Evidence for an ammonium transport system in free-living and symbiotic cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* **137**:241-246
- Rancourt DE, Stephenson JT, Vickell GA y Wood JM** (1984) Proline excretion by *Escherichia coli* K12. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:74-80
- Reizer J, Reizer A y Saier MH, Jr.** (1994) A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim. Biophys. Acta* **1197**:133-166
- Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M y Stanier RY** (1979) Genetic assignments, strain stories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**:1-61
- Ritchie RJ y Gibson J** (1987) Permeability of ammonia, methylamine and ethylamine in the cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (*Anacystis nidulans*) PCC 7942. *J. Membr. Biol.* **95**:131-142
- Sakamoto T, Wada H, Nishida I, Ohta H y Murata N** (1995) Sequence analysis of a DNA fragment from *Synechocystis* PCC6803 containing genes homologous to *cysE* (serine acetyltransferase) and *pgi* (glucose-6-phosphate isomerase). *Plant Mol. Biol.* **29**:187
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sanger F, Nicklen S y Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467
- Sauer N y Tanner W** (1985) Selection and characterization of *Chlorella* mutants deficient in amino acid transport. Further evidence for three independent systems. *Plant Physiol.* **79**:760-764
- Saurin W, Köster W y Dassa E** (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **12**:993-1004
- Scripture JB, Voelker C, Miller S, O'Donnell RT, Polgar L, Rade J, Horazdovsky BF y Hogg RW** (1987) High-affinity L-arabinose transport operon. Nucleotide sequence and analysis of gene products. *J. Mol. Biol.* **197**:37-46
- Shapiro BM y Stadtman ER** (1970) Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods Enzymol.* **17**:910-922
- Shine J y Dalgarno L** (1974) The 3' sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**:1342-1346
- Siewe RM, Weil B, Burkovski A, Eikmanns BJ, Eikmanns M y Krämer R** (1996) Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **271**:5398-5403
- Simon RD** (1971) Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: a reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**:265-267

- Spence DW y Stewart WDP** (1986) Proline inhibits N₂-fixation in *Anabaena* 7120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**:940-946
- Stanier RY y Cohen-Bazire G** (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**:225-274
- Stevenson R y Silver S** (1977) Methylammonium uptake by *Escherichia coli*: evidence for a bacterial NH₄⁺ transport system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**:1133-1139
- Stewart WDP** (1963) Liberation of extracellular nitrogen by two nitrogen-fixing blue-green algae. *Nature* **200**:1020-1021
- Stewart WDP, Fitzgerald GP y Burris RH** (1967) *In situ* studies on nitrogen fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**:2071-2078
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ y Dubendorff JW** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**:60-89
- Tam R y Saier MH, Jr.** (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**:320-346
- Tandeau de Marsac N** (1994) Differentiation of hormogonia and relationships with other biological processes. En DA Bryant, ed, The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 825-842
- Tanner W y Caspari T** (1996) Membrane transport carriers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:595-626
- Thiel T** (1988) Transport of leucine in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.* **149**:466-470
- Thiel T** (1994) Genetic analysis of cyanobacteria. En DA Bryant, ed, The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 581-611
- Thiel T y Poo H** (1989) Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bacteriol.* **171**:5743-5746
- Thiel T, Lyons EM, Erker JC y Ernst A** (1995) A second nitrogenase in vegetative cells of a heterocyst-forming cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:9358-9362
- Thomas J, Meeks JC, Wolk CP, Shaffer PW, Austin SM y Chien W-S** (1977) Formation of glutamine from [¹³N]ammonia, [¹³N]dinitrogen, and [¹³N]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* **129**:1545-1555
- Trias J y Nikaido H** (1990) Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J. Biol. Chem.* **265**:15680-15684
- Tsinoremas NF, Castets AM, Harrison MA, Allen JF y Tandeau de Marsac N** (1991) Photosynthetic electron transport controls nitrogen assimilation in cyanobacteria by means of posttranslational modification of the *glnB* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4565-4569
- Valladares A, Herrero A y Flores E** (1995) The assimilation of urea by cyanobacteria. *European Workshop Mol. Biol. Cyanobacteria, 3rd*, Sevilla, España, p 71
- Vega-Palás MA, Madueño F, Herrero A y Flores E** (1990) Identification and cloning of a regulatory gene for nitrogen assimilation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* **172**:643-647



501038710

FBI E TD / 379

1038710