



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS GENES *argC* Y *argD* EN LA
CIANOBACTERIA *Anabaena* sp. PCC 7120**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas
por la Licenciada M^a Belén Floriano Pardal

Sevilla, Noviembre de 1993

Director:

Dr. Enrique Flores García
Investigador científico del CSIC

Directora:

Dra. Antonia Herrero Moreno
Colaboradora científica del CSIC

Tutor:

Dr. Agustín Vioque Peña
Profesor Titular de Bioquímica
y Biología Molecular

T D
526

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
I. INTRODUCCIÓN	3
I.A. LAS CIANOBACTERIAS	4
I.B. MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LAS CIANOBACTERIAS	5
I.C. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN <i>Anabaena</i>	7
I.D. BIOSÍNTESIS DE ARGININA	9
II. MATERIALES Y MÉTODOS	13
II.A. ORGANISMOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y PLÁSMIDOS	14
II.A.1. CIANOBACTERIAS	14
II.A.1.1. <i>Estirpes</i>	14
II.A.1.2. <i>Medios y condiciones de cultivo</i>	14
II.A.1.3. <i>Recogida y lavado de células</i>	15
II.A.1.4. <i>Curvas de crecimiento</i>	15
II.A.2. <i>Escherichia coli</i>	16
II.A.2.1. <i>Estirpes</i>	16
II.A.2.2. <i>Medios y condiciones de cultivo</i>	17
II.A.3. PLÁSMIDOS	18
II.B. MÉTODOS ANALÍTICOS	18
II.B.1. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA	18
II.B.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA	19
II.B.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	19
II.B.4. MEDIDAS DE pH	20
II.C. MANIPULACIÓN DE CIANOBACTERIAS	20
II.C.1. MUTAGÉNESIS CON LUZ ULTRAVIOLETA	20
II.C.2. GENOTECA DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	21
II.C.3. TRANSFERENCIA DE DNA A <i>Anabaena</i> : CONJUGACIÓN CON <i>E. coli</i>	22
II.C.3.1. <i>Complementación de las estirpes CS335 y CS336 con la genoteca de Anabaena</i>	22
II.C.3.2. <i>Otras conjugaciones</i>	23
II.C.4. CÓSMIDOS Y SUBCLONES COMPLEMENTANTES	23
II.C.5. AISLAMIENTO DE DNA TOTAL Y PLASMÍDICO	26
II.C.6. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL	26
II.D. MANIPULACIÓN DE <i>E. coli</i>	27
II.D.1. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO	27
II.D.2. TRANSFERENCIA DE DNA A <i>E. coli</i>	28

II.E. MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA	28
II.E.1. MANIPULACIONES ENZIMÁTICAS	28
II.E.2. ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GELES DE AGAROSA	28
II.E.3. EXTRACCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA	29
II.E.4. TRANSFERENCIA DE DNA A FILTROS DE NYLON	30
II.E.5. HIBRIDACIÓN DE DNA CON SONDAS RADIATIVAS	30
II.E.6. SECUENCIACIÓN DE DNA	31
II.E.6.1. <i>Reacciones de delección con la exonucleasa III</i>	31
II.E.6.2. <i>Reacciones de secuenciación</i>	32
II.E.6.3. <i>Análisis de las reacciones de secuenciación</i>	32
II.F. ANÁLISIS DE RNA	33
II.F.1. ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GELES DE AGAROSA	33
II.F.2. TRANSFERENCIA DE RNA A MEMBRANAS DE NYLON	33
II.F.3. TINCIÓN DEL RNA TRANSFERIDO CON AZUL DE METILENO	34
II.F.4. HIBRIDACIÓN DE RNA CON SONDAS RADIATIVAS	34
II.F.5. DETERMINACIÓN DEL INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN	34
II.G. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS	35
III. RESULTADOS	37
III.A. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ESTIRPES MUTANTES DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 AFECTADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE ARGININA	38
II.A.1. MUTAGÉNESIS Y SELECCIÓN DE ESTIRPES AUXÓTROFAS DE ARGININA	38
II.A.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTIRPES CS334, CS335 Y CS336	39
II.A.2.1. <i>Estudio de la tasa de crecimiento</i>	39
II.A.2.2. <i>Estudio del crecimiento en presencia de intermediarios de la ruta de biosíntesis de arginina</i>	40
III.B. COMPLEMENTACIÓN DE CS335 Y CS336 CON UNA GENOTECA DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	42
III.C. SUBCLONACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN AFECTADO EN LA ESTIRPE CS335	45
III.C.1. SUBCLONACIÓN DEL GEN	45
III.C.2. INTENTO DE IDENTIFICACIÓN DEL GEN MEDIANTE COMPLEMENTACIÓN DE AUXÓTROFOS DE ARGININA DE <i>E. coli</i>	48
III.C.3. SECUENCIACIÓN DEL GEN	49
III.C.4. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA ArgD	52
III.C.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>argD</i>	56
III.C.5.1. <i>Identificación del mRNA en presencia y ausencia de arginina</i>	56
III.C.5.2. <i>Determinación del inicio de la transcripción en Anabaena</i>	57

III.D. SUBCLONACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN AFECTADO EN LA ESTIRPE CS336	59
III.D.1. SUBCLONACIÓN DEL GEN	59
III.D.2. LOCALIZACIÓN DEL FRAGMENTO COMPLEMENTANTE EN OTROS CÓSMIDOS AISLADOS DE EXCONJUGANTES PROTÓTROFOS	60
III.D.3. IDENTIFICACIÓN DEL MENOR FRAGMENTO DE DNA CON CAPACIDAD DE COMPLEMENTACIÓN	61
III.D.4. COMPLEMENTACIÓN DE LA ESTIRPE DE <i>E. coli</i> W3679 (<i>argC</i> ⁻)	62
III.D.5. SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>argC</i> DE <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	62
III.D.6. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA ArgC	66
III.D.7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>argC</i>	69
III.D.7.1. <i>Identificación del mRNA en presencia y ausencia de arginina</i>	69
III.D.7.2. <i>Expresión del gen argC de Anabaena en E. coli</i>	70
III.D.7.3. <i>Determinación del inicio de la transcripción en Anabaena</i>	71
III.E. LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA RELATIVA DE LOS GENES <i>argC</i> Y <i>argD</i> EN <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	72
III.F. ESTRUCTURA CROMOSÓMICA DE EXCONJUGANTES DE LA ESTIRPE CS336	74
IV. DISCUSIÓN	78
IV.A. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AUXÓTROFOS DE ARGININA EN <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	79
IV. B. COMPLEMENTACIÓN DE MUTANTES DE CIANOBACTERIAS	80
IV. C. GENES DE LA BIOSÍNTESIS DE ARGININA EN <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	82
IV.C.1. IDENTIFICACIÓN DEL GEN <i>argD</i> Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA ArgD	82
IV.C.2. IDENTIFICACIÓN DEL GEN <i>argC</i> Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA ArgC	84
IV.C.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA	85
IV.C.4. ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES ESTRUCTURALES	86
IV.C.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>argC</i> Y <i>argD</i>	87
IV.D. ESTUDIO DE SECUENCIAS PROMOTORAS	88
V. CONCLUSIONES	92
VI. BIBLIOGRAFÍA	95
VII. AGRADECIMIENTOS	108

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ap	ampicilina
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
Bisacrilamida	N,N',-bis-metilén-acrilamida
Ci	Curio
Cm	cloranfenicol (de "Chloramphenicol")
cpm	cuentas por minuto
dATP	desoxiadenosín-5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidín-5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico (de "Deoxyribonucleic Acid")
DNasa	desoxirribonucleasa
DAPA	diamonipelargonato
E	coeficiente de extinción
E	Einstein (mol de fotones)
EDTA	ácido etilén-diamino-tetraacético
kb	kilobase
kDa	kilodalton
Km	kanamicina
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mRNA	ácido ribonucleico mensajero (de "messenger" RNA)
Nm	neomicina
ORF	fase de lectura abierta (de "Open Reading Frame")
pb	par de bases
PCC	Colección de Cultivos del Instituto Pasteur
p/v	relación peso/volumen
RBS	sitio de unión del ribosoma (de "Ribosome Binding Site")
RNA	ácido ribonucleico (de "Ribonucleic Acid")
RNasa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	duodecil sulfato sódico
Tc	tetraciclina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletiléndiamina
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

UV
v/v

luz ultravioleta
relación volumen/volumen

Bases nitrogenadas

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo
M	Adenina o citosina
W	Adenina o timina

Aminoácidos

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

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al tomo 74 número 76 del libro
correspondiente.

Sevilla, 5 NOV 1933

El Jefe del Negociado de Tesis,

Alvaro Kaffke

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Presentado en

la Universidad desde el día

Sevilla de

EL DIRECTOR DE

de 19

I. INTRODUCCIÓN

I.A. LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son un grupo de organismos procarióticos que se engloban en las eubacterias (Woese, 1987) cuya característica más relevante es la de llevar a cabo un tipo de fotosíntesis similar al de las plantas superiores (fotosíntesis oxigénica) (Stanier y Cohen-Bazire, 1977). A pesar de la similitud de su aparato fotosintético, en cuanto a composición, estructura y función, con el de los cloroplastos de algas y plantas superiores, las cianobacterias poseen pigmentos antena especiales, denominados ficobiliproteínas (Glazer, 1984). Algunas cianobacterias presentan la capacidad de modificar su composición de pigmentos antena según la longitud de onda de la luz incidente, proceso denominado adaptación cromática. El grupo comprende tanto organismos fotoautótrofos estrictos como fotoheterótrofos facultativos (Wolk, 1973), siendo ambos tipos de cianobacterias capaces de utilizar el poder reductor resultante de la fotólisis del agua y el ATP generado por fotofosforilación para la asimilación de compuestos inorgánicos oxidados de carbono, nitrógeno y azufre. Las cianobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la Naturaleza, llevando a cabo una parte importante de la fijación de CO₂ y de N₂ que tiene lugar en diversos ecosistemas.

La clasificación taxonómica más aceptada actualmente divide a las cianobacterias en cinco secciones (Rippka *et al.*, 1979). Las secciones I y II incluyen cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión binaria o gemación (sección I) o por fisión múltiple (sección II). Los géneros más estudiados de cianobacterias unicelulares son *Synechococcus* y *Synechocystis*. En las secciones III, IV y V se agrupan las cianobacterias filamentosas: las no capaces de diferenciar heterocistos en la sección III (por ejemplo, *Oscillatoria* y *Pseudanabaena*) y las formadoras de heterocistos en las secciones IV y V. Las cianobacterias formadoras de heterocistos que crecen formando filamentos lineales (no ramificados) se engloban en la sección IV (por ejemplo, *Anabaena*, *Nostoc* y *Calothrix*) y las que crecen formando verdaderas ramificaciones en la sección V (por ejemplo, *Fischerella*). Sin embargo, sólo la sección II, por un lado, y las secciones IV y V, conjuntamente, parecen ser grupos filogenéticamente coherentes (Giovanonni *et al.*, 1988). Algunas cianobacterias de las secciones III, IV y V son capaces de desarrollar estructuras de resistencia (akinetos) o reproductivas (hormogonios) (Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

La mayoría de las cianobacterias son capaces de utilizar el amonio y el nitrato como fuentes de nitrógeno para su crecimiento. Algunos de estos organismos presentan la capacidad adicional de fijar nitrógeno molecular o dinitrógeno (N_2). Debido a la sensibilidad al oxígeno de la enzima que lleva a cabo este proceso, la nitrogenasa, en muchas cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno los procesos de fotosíntesis oxigénica y de reducción del N_2 ocurren en tipos celulares diferentes. Las células especializadas en la fijación del N_2 , denominadas heterocistos, se diferencian a intervalos regulares a lo largo del filamento en condiciones de deficiencia en nitrógeno (Haselkorn, 1978; Wolk, 1982). Estas células son morfológicamente diferentes a las células vegetativas, presentando una envuelta celular más densa y compleja (Wolk, 1982) que dificulta la difusión del oxígeno a su interior (Murry y Wolk, 1989). Además, presentan un metabolismo modificado al carecer de actividad del fotosistema II, generador de O_2 , y de fijación de CO_2 (Haselkorn, 1978). Entre las células vegetativas y los heterocistos existe un intercambio de metabolitos. Las células vegetativas abastecen a los heterocistos de compuestos reducidos de carbono, y los heterocistos suministran a las células vegetativas aminoácidos producidos tras la fijación del N_2 , ya que no es el amonio como tal el que se transfiere. No se sabe cuáles son los aminoácidos implicados en la transferencia de nitrógeno entre ambos tipos celulares. Si bien se ha sugerido que pueda ser la glutamina (Thomas *et al.*, 1977), no se descartan otros, ya que en el heterocisto se han podido medir actividades enzimáticas de la ruta de biosíntesis de arginina (Gupta y Carr, 1981a) y, además, tiene lugar la acumulación de un copolímero de aspartato y arginina, denominado cianoficina (Simon, 1971) que podría desempeñar una función de reserva dinámica de nitrógeno antes de la transferencia del mismo a las células vegetativas (Carr, 1983).

I.B. MANIPULACIÓN GENÉTICA DE LAS CIANOBACTERIAS

Las cianobacterias son consideradas organismos modelo para el estudio de fenómenos biológicos de gran interés tales como la fotosíntesis oxigénica, la fijación de N_2 o procesos de diferenciación celular. El desarrollo de la genética de estas bacterias es fundamental para el estudio de estos fenómenos a nivel molecular. Los primeros

avances en la genética de las cianobacterias se obtuvieron al aislar colecciones de estirpes mutadas en diferentes procesos metabólicos, utilizando agentes mutagénicos tales como la nitrosoguanidina (Chapman y Meeks, 1987), la luz ultravioleta (Flores y Schmetterer, 1986) o transposones (Tandeau de Marsac *et al.*, 1982; Borthakur y Haselkorn, 1989a; Wolk *et al.*, 1991).

Sin embargo, hasta hace poco tiempo, las colecciones de mutantes eran de una utilidad limitada al encontrarse la metodología de transferencia de material genético a las cianobacterias poco desarrollada. La transferencia por transformación sólo es aplicable a algunas cianobacterias unicelulares. Aunque se ha descrito transformación por electroporación en *Anabaena* sp. M-131 (Thiel y Poo, 1989), éste es un método aún poco empleado. Por otra parte, a pesar de la existencia de cianofagos, aún no se dispone de un sistema de transducción en cianobacterias. El sistema de transferencia de DNA que ha permitido un avance notable de la genética de las cianobacterias filamentosas en los últimos diez años ha sido el desarrollado por Wolk *et al.* (1984), que se basa en la conjugación interespecífica desde *E. coli* a las cianobacterias, siendo funcional en diferentes estirpes de estos organismos (Wolk *et al.*, 1984; Flores y Wolk, 1985). En particular, el estudio a nivel genético de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 ha experimentado un gran avance gracias a este sistema de transferencia, al posibilitar que se lleven a cabo en la misma procedimientos genéticos como la complementación de mutantes (Wolk *et al.*, 1988; Buikema y Haselkorn, 1991a; Floriano *et al.*, 1992), la generación de mutantes mediante recombinación homóloga con fragmentos de DNA previamente manipulados (Cai y Wolk, 1990; Maldener *et al.*, 1991; Muro-Pastor *et al.*, 1992) y la mutagénesis con transposones, sistema que se ha descrito recientemente (Borthakur y Haselkorn, 1989a; Wolk *et al.*, 1991).

La transferencia de material genético entre células de *E. coli* y *Anabaena* sp. se basa en la movilización de plásmidos portadores de un origen de transferencia (*bom* de ColE1, *oriT* de RK2) por plásmidos conjugativos del grupo de incompatibilidad P1 (RP1, RP4 y otros). Los plásmidos movilizables pueden contener orígenes para su replicación en *E. coli* y en la cianobacteria (plásmidos "anfíbios") o bien portar solamente un origen para su replicación en *E. coli*, comportándose como "suicidas" al introducirse en la cianobacteria. El origen de replicación

operativo en *Anabaena* sp. que se utiliza procede del plásmido pDU1, indígena de la cianobacteria *Nostoc* sp. PCC 7524. Gracias a la eliminación en los vectores de dianas para las endonucleasas de restricción de *Anabaena* sp. PCC 7120, *AvaI* y *AvaII* (Wolk *et al.*, 1984), y a la incorporación en un plásmido auxiliar de genes de metilasas correspondientes a estas enzimas o a isoesquizómeros de las mismas (Elhai y Wolk, 1988b), la eficacia del proceso de transferencia de DNA por conjugación a *Anabaena* sp. PCC 7120 se ha mejorado notablemente.

Las estrategias utilizadas para la clonación de genes cianobacterianos han sido muy diversas. El mayor número de genes de cianobacterias se ha clonado por hibridación con sondas heterólogas, como los genes estructurales de la nitrogenasa (*nifHDK*; Rice *et al.*, 1982) o de la glutamina sintetasa (*glnA*; Fisher *et al.*, 1981) y numerosos genes que codifican proteínas del aparato fotosintético (como los de la familia génica *psbA*; Curtis y Haselkorn, 1984). Algunos genes se han clonado por complementación de mutantes de *E. coli* con genotecas de cianobacterias (Porter *et al.*, 1986). Sin embargo, los genes implicados en procesos característicos de las cianobacterias no pueden ser clonados mediante ninguno de estos dos procedimientos. También se han clonado otros genes mediante hibridación con sondas sintéticas (elaboradas a partir de secuencias de aminoácidos conocidas de las correspondientes proteínas), usando los transposones como sondas en aquellos mutantes generados por transposición, mediante hibridación RNA ribosómico/DNA, por rastreo de genotecas de expresión con anticuerpos y por complementación de mutantes de cianobacterias.

Por último, cabe citar entre los avances en la genética de las cianobacterias la construcción de mapas físicos y genéticos de cromosomas cianobacterianos (Herrero y Wolk, 1986; Bancroft *et al.*, 1989; Chen y Widger, 1993; Kuritz *et al.*, 1993).

I.C. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN EN *Anabaena*

Como ya se ha mencionado anteriormente, *Anabaena* es una cianobacteria filamentosa capaz de fijar N₂ en células especializadas denominadas heterocistos. En *Anabaena* existen, en general, proteínas que se sintetizan exclusivamente en los heterocistos, proteínas cuya síntesis tiene lugar sólo en las células vegetativas y proteínas que se

sintetizan en ambos tipos celulares. El proceso de diferenciación de los heterocistos implica la síntesis de los componentes de la envuelta celular, la desaparición de la actividad del fotosistema II y de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (RuBisCo) y la inducción de la enzima encargada de la reducción del N_2 , la nitrogenasa, que se encuentra en estas células (Wolk, 1982). Además, existen proteínas cuya síntesis se restringe a estados concretos de la célula en diferenciación (Fleming y Haselkorn, 1974). Se han clonado los genes que codifican algunas de esas proteínas, lo que ha permitido estudiar su expresión. El mRNA del operón *rbcLS* (codificador de las dos subunidades de la RuBisCo) no se encuentra presente en los heterocistos (Golden *et al.*, 1988), lo cual es coherente con la falta de actividad de la enzima en estas células. Por el contrario, los genes *nifHDK* (genes estructurales de la nitrogenasa) se cotranscriben, tras un proceso de reordenación cromosómica (Golden *et al.*, 1985), exclusivamente en los heterocistos (Elhai y Wolk, 1990). El mecanismo de regulación responsable de esta expresión diferencial de genes se desconoce, aunque frecuentemente se ha considerado la hipótesis de que durante el desarrollo del heterocisto se expresarían nuevos factores σ que permitirían el reconocimiento por la RNA polimerasa de genes de expresión tardía en el proceso de desarrollo y de genes cuya expresión tuviese lugar sólo en el heterocisto maduro (Buikema y Haselkorn, 1993).

La RNA polimerasa se ha purificado a partir de varias cianobacterias, entre las que se encuentra *Anabaena* sp. PCC 7120 (Schneider *et al.*, 1987). La estructura de la RNA polimerasa cianobacteriana es similar a la de las eubacterias, cuya composición de subunidades es $\alpha_2\beta\beta'\sigma$, pero con una subunidad adicional, γ . La subunidad γ cianobacteriana se corresponde con la zona amino-terminal de la subunidad β' de *E. coli*, mientras que la subunidad β' cianobacteriana correspondería a la zona carboxi-terminal de la subunidad β' de *E. coli* (Schneider *et al.*, 1987; Schneider y Haselkorn, 1988a). El gen *sigA*, que codifica el factor σ encontrado en la RNA polimerasa aislada de células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC 7120, se ha clonado y secuenciado (Brahamsha y Haselkorn, 1991), habiéndose podido deducir que codifica una proteína homóloga a los factores σ^{70} de *E. coli* y σ^{43} de *Bacillus subtilis*. Recientemente, se han clonado los genes codificadores de otros dos factores σ de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Brahamsha y Haselkorn, 1992). Sin embargo, éstos son homólogos al

factor σ vegetativo (SigA), pudiéndose predecir que han de reconocer promotores similares a los reconocidos por SigA.

Se ha determinado el inicio de la transcripción de diversos genes cianobacterianos y se han llevado a cabo estudios de iniciación de la transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa purificada y con extractos de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Schneider *et al.*, 1991). Los resultados obtenidos sugieren una preferencia de la RNA polimerasa de *Anabaena* (con el factor σ principal, SigA) por promotores similares al consenso establecido para la RNA polimerasa- σ^{70} de *E. coli* (Schneider *et al.*, 1991). Sin embargo, muchos de los genes de *Anabaena* cuyo inicio de la transcripción ha sido determinado son genes cuya expresión está sometida a algún tipo de regulación, lo que podría explicar que la comparación de sus regiones promotoras no haya permitido el establecimiento definitivo de secuencias consenso. Por ello, es de interés el estudio de las regiones promotoras de genes cianobacterianos que se expresen constitutivamente, como podrían ser los genes de *Anabaena* sp. PCC 7120 que se han caracterizado en esta Tesis.

Recientemente se ha definido la presencia de algunos reguladores de la transcripción en cianobacterias. Uno de los mejor caracterizados es el producto del gen *ntcA*, la proteína NtcA, que se requiere como efector positivo para la expresión de genes sometidos a control por nitrógeno (Vega-Palas *et al.*, 1990, 1992) y que se encuentra presente en todas las cianobacterias ensayadas, incluida *Anabaena* sp. PCC 7120 (Frías *et al.*, 1993). La proteína NtcA es homóloga a los miembros de la familia de reguladores bacterianos de la transcripción a la que pertenecen Crp y Fnr de *E. coli*. En cianobacterias se han detectado además proteínas pertenecientes al grupo de los sistemas reguladores de dos componentes (con una proteína sensora y otra reguladora), implicadas en la respuesta a la limitación de fosfato (SphS y SphR; Aiba *et al.*, 1993), en la adaptación cromática (RcaC; Chiang *et al.*, 1992) y en la diferenciación de los heterocistos (PatA; Liang *et al.*, 1992).

I.D. BIOSÍNTESIS DE ARGININA

En todos los organismos estudiados, tanto eucariotas como procariotas, la biosíntesis de arginina ocurre a partir del glutamato mediante la acción secuencial de siete u ocho enzimas. Los cinco primeros pasos de la ruta implican intermediarios acetilados que dan

lugar a la ornitina; para la conversión de ornitina en arginina son necesarios tres pasos más, el primero de los cuales conlleva la utilización del carbamilo fosfato, compuesto rico en energía, que también participa en la biosíntesis de pirimidinas. Un esquema de la ruta de biosíntesis de arginina, así como su relación con las rutas de biosíntesis de prolina y pirimidinas, se muestra en la Figura 1 junto con los nombres de los genes estructurales de la ruta de biosíntesis de arginina. Cabe destacar que, aunque el uso de intermediarios acetilados asegure la separación de la biosíntesis de arginina y de prolina, en algunas ocasiones se ha observado un intercambio de metabolitos entre ambas rutas (Itikawa *et al.*, 1968; Voellmy y Leisinger, 1975).

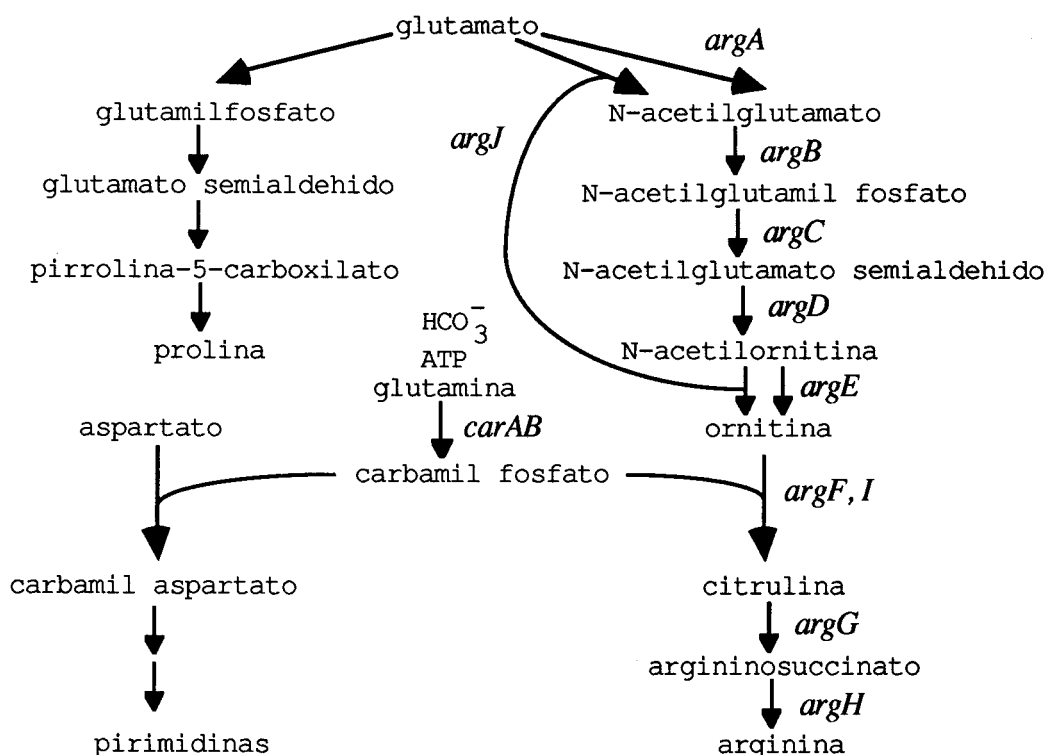


Figura 1.- Ruta de biosíntesis de arginina y su relación con la biosíntesis de prolina y pirimidinas. Los nombres de los genes estructurales, según la terminología usada para *E. coli*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas* sp. y *B. subtilis*, se indican en cursiva.

Según las enzimas implicadas en la acetilación del glutamato y en la formación de ornitina a partir de N-acetilornitina, los organismos estudiados pueden ser divididos en dos grupos. *Enterobacteriaceae* y *Bacillaceae* utilizan la llamada "ruta lineal", en la cual la formación de ornitina resulta de la acción hidrolítica de la acetilornitinasas (EC 3.5.1.16) sobre la N-acetilornitina (Udaka, 1966). El resto de los organismos procariontes estudiados (*Micrococcus glutamicus*,

pseudomonas, cianobacterias, y algunas bacterias fotosintéticas, metanógenas y termófilas), así como diversos eucariotas (*Saccharomyces*, *Neurospora*, algas verdes y plantas), utilizan una versión más económica de la ruta: la "vía cíclica" de biosíntesis de ornitina, por la cual el grupo acetilo se recicla por transacetilación desde la N-acetilornitina al glutamato, reacción llevada a cabo por la ornitina acetiltransferasa (EC 2.3.1.35) (Cunin *et al.*, 1986). Esta diferencia en cuanto a las enzimas utilizadas también implica un distinto control de la ruta: en la vía lineal, la primera enzima, N-acetilglutamato sintetasa (EC 2.3.1.1), es la que se encuentra sometida a inhibición por el producto final, arginina, mientras que en la vía cíclica es la segunda enzima, N-acetilglutamato-5-fosfotransferasa (EC 2.7.2.8), la sometida a este tipo de regulación (Cunin *et al.*, 1986).

En cianobacterias, las rutas de biosíntesis de aminoácidos se han estudiado poco, en comparación con otros microorganismos. Se ha sugerido que en las cianobacterias, en estas rutas, el mecanismo principal de control metabólico se ejerce sobre la actividad enzimática (inhibición por productos de la ruta), más que a través de alteraciones de los niveles de las enzimas (inducción/represión) (Carr, 1973). La biosíntesis de arginina es un ejemplo claro que parece confirmar esta hipótesis, ya que el único punto de regulación de la ruta parece ser la inhibición por arginina de la N-acetilglutamato-5-fosfotransferasa (Hoare y Hoare, 1966) y no parece existir represión de la síntesis de las enzimas por arginina (Hood y Carr, 1971).

El metabolismo de la arginina en las cianobacterias es de notable interés por la presencia en estos organismos de un polímero de aspartato y arginina, denominado cianoficina, que sirve como reserva de nitrógeno, y que es único en la Naturaleza (Simon, 1971). En las cianobacterias fijadoras de N_2 , los gránulos de cianoficina se encuentran tanto en las células vegetativas como en los heterocistos (Lang *et al.*, 1972). Esto sugiere que la biosíntesis de arginina tiene lugar en ambos tipos celulares. De hecho, en cianobacterias fijadoras de N_2 , la actividad de varias de las enzimas de la biosíntesis de arginina es mayor en los heterocistos que en las células vegetativas mientras que la de enzimas degradativas muestra un patrón contrario (Gupta y Carr, 1981a). Esto podría relacionarse con la alta actividad de las enzimas de biosíntesis de cianoficina que también se encuentra en los heterocistos (Gupta y Carr, 1981b).

En esta Tesis se describe el estudio a nivel molecular de dos genes estructurales de la ruta de biosíntesis de arginina en *Anabaena* sp. PCC 7120. Se presenta la clonación de los genes *argC* y *argD* por complementación de mutantes auxótrofos de *Anabaena* sp. PCC 7120, su caracterización por secuenciación y el estudio de su expresión en esta cianobacteria. Asimismo, se ha determinado el inicio de la transcripción de ambos genes en células cultivadas en distintas condiciones. Estos estudios aportan datos sobre la estructura de promotores cianobacterianos constitutivos.

Parte de los resultados descritos en este trabajo se encuentran recogidos en: B. Floriano, A. Herrero y E. Flores, "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 (1992).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.A. ORGANISMOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y PLÁSMIDOS

II.A.1. CIANOBACTERIAS

II.A.1.1. *Estirpes*

La cianobacteria utilizada en este trabajo ha sido *Anabaena* sp. PCC 7120 (ATCC 27893), organismo perteneciente a la sección taxonómica IV según Rippka *et al.* (1979). *Anabaena* sp. PCC 7120 es una cianobacteria filamentosa, capaz de fijar dinitrógeno en condiciones aeróbicas gracias a la diferenciación de células especializadas en tal función, los heterocistos. Esta es una cianobacteria a la que puede transferirse DNA exógeno mediante conjugación con *Escherichia coli* (Wolk *et al.*, 1984).

II.A.1.2. *Medios y condiciones de cultivo*

Anabaena sp. PCC 7120 se cultivaba fotoautotróficamente en condiciones axénicas en el medio de cultivo denominado BG11₀, descrito por Rippka *et al.* (1979), que no contiene fuente de nitrógeno combinado. Cuando se utilizaba como fuente de nitrógeno NaNO₃ (17,6 mM) el medio se denominaba BG11 (Rippka *et al.*, 1979). En algunas ocasiones, los medios BG11₀ y BG11 se suplementaban con NaHCO₃ (12 mM), denominándose en tales casos BG11₀C y BG11C, respectivamente. Otra fuente de nitrógeno utilizada ha sido NH₄Cl (5 mM), en cuyo caso el medio se suplementaba con tampón TES-NaOH (10 mM, pH 7,5) autoclavado separadamente del medio de cultivo y añadido en el momento de la inoculación. El medio de cultivo BG11₀ se preparaba concentrado 100 veces, conteniendo todos sus componentes salvo el K₂HPO₄ y la fuente de nitrógeno que se añadían al medio inmediatamente antes de su esterilización en autoclave.

Para el cultivo en medio líquido se dispensaban 25 ó 50 ml de medio en erlenmeyers de 50 ó 100 ml de capacidad, respectivamente. Éstos se incubaban, tras su inoculación, en una cámara termostatizada a 30°C, sometidos a una agitación continua de 80-90 rpm e iluminados con lámparas fluorescentes que proporcionaban luz blanca con una intensidad de 40-50 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}$. En otras ocasiones, para conseguir un crecimiento más rápido, el medio se dispensaba en frascos de cultivo cilíndricos (150 ml de capacidad) y se les burbujeaba aire estéril.

Para el crecimiento de las cianobacterias en cajas de Petri, el medio se solidificaba añadiendo Bacto-agar (Difco) al 1% (Rippka *et al.*, 1979) autoclavado separadamente del BG110 o BG11. La siembra con agar de cobertera se llevaba a cabo mezclando una suspensión celular (3 ó 4 ml) con un volumen igual de medio con agar, aún no solidificado, mantenido a una temperatura de 50°C. Las cajas sembradas se incubaban a 30°C con iluminación continua (20 $\mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}$) proporcionada por tubos fluorescentes.

Las adiciones al medio de cultivo de otros compuestos (L-arginina a varias concentraciones y/o neomicina [Nm] a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio sólido y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en medio líquido) se realizaban tras la esterilización de los mismos por filtración usando filtros Millex GS (Millipore, 0,22 μm de diámetro de poro) o Acrodisc (Gelman, 0,2 μm de diámetro de poro).

La ausencia de organismos contaminantes en los cultivos se comprobaba mediante examen microscópico y siembra de muestras en medio de cultivo rico (LB, ver apartado II.A.2.2).

II.A.1.3. *Recogida y lavado de células*

La recogida de células se realizaba mediante centrifugación en microcentrífuga Eppendorf (10.000 g, 5 min), centrífuga de mesa Heraeus (2.500 g, 5 min) o centrífuga Sorvall (8.000 g, 5 min), según el volumen del cultivo. En la mayoría de los experimentos la recogida se realizaba a temperatura ambiente, salvo en los de aislamiento de ácidos nucleicos en los que se realizaba a 4°C.

Para transferir células cultivadas en un medio a otro con distinta fuente de nitrógeno, éstas se recogían por centrifugación a temperatura ambiente y se lavaban dos veces con BG110, resuspendiéndose a continuación en el medio deseado.

II.A.1.4. *Curvas de crecimiento*

Con objeto de estimar la tasa de crecimiento de los mutantes auxótrofos de arginina obtenidos en esta Tesis, se realizaron estudios de crecimiento en medios con distintas fuentes de nitrógeno suplementados con concentraciones crecientes de L-arginina. Los cultivos se inoculaban con una concentración celular equivalente a 0,1 μg de clorofila/ml y se tomaban muestras a distintos tiempos de incubación a las que posteriormente se les medía la concentración de

proteína. El tiempo de duplicación (t_d) se calculaba a partir de la pendiente de la línea obtenida al representar el log de la concentración celular (expresada como concentración de proteína, ver aptdo. II.B.2) frente al tiempo de incubación en condiciones de cultivo.

II.A.2. *Escherichia coli*

II.A.2.1. *Estirpes*

Las estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo, así como sus genotipos, se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Resistencia a antibióticos	Genotipo	Referencias
HB101	Sm ^r	$\Delta(gtp-proA)62 leuB6 thi-1$ $lacY1 hsdS_{B20} recA rpsL20$ (Sm ^r) $ara-14 galK2 xyl-5$ $mtl-1 supE44 mcrBB$	Ausubel <i>et al.</i> , 1992
DH5 α	Nx ^r	$endA1 hsdR17 (\tau_k^-, m_k^+)$ $supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nx^r)$ $relA1 \Delta(lacZYA-argF)U169$ (m80lacZ Δ M15)	Ausubel <i>et al.</i> , 1992
RR1	Sm ^r	Derivado $recA^+$ de HB101	Ausubel <i>et al.</i> , 1992

Mutantes auxótrofos de arginina:

W3421	F ⁻ $argA21 \lambda^- \lambda^S$	<i>E. coli</i> Genetics Stock Center (Yale University)
N166	Hfr(H) $argI67 \Delta(proB-argF-lac)$ $\lambda^- \lambda^S$	
UQ27	F ⁻ $argG75 pro5127 \lambda^- \lambda^S$	
NK 5992	F ⁻ $argA81::Tn10 \lambda^- \lambda^S$	
3080MA4	Hfr(H) $argB62 \lambda^- \lambda^S$	
JEF8	Hfr(P4X) $carB8 thr-31 metB1 \lambda^- \lambda^S$	
AT753	F ⁻ $argH1 ilv1 metB1 \lambda^- \lambda^S$	
AB1157	F ⁻ $argE3 thr-1 leuB6 \Delta(gtp-proA)62$ $hisG4 \lambda^- \lambda^S$	
W3679	F ⁻ $argC24 \lambda^- \lambda^S$	
MI178	Hfr(P4X) $carA178 thr31 metB1 \lambda^+ \lambda^r$	
FP178	Hfr(P4X) $carA178 thr31 metB1 \lambda^- \lambda^S$	
MN42	Hfr $metB \Delta(ppc-argECBH) \lambda^- \lambda^S$	



II.A.2.2. Medios y condiciones de cultivo

Los medios que se usaban para el cultivo de *E. coli* se resumen a continuación. En todos los casos, las células se cultivaban a 37°C, con una agitación continua de 200 rpm, hasta alcanzar la concentración de células deseada según el experimento a realizar. El medio en el que se cultivaban las células de *E. coli* normalmente era LB (Luria-Bertani), cuya composición se recoge en Sambrook *et al.* (1989). Para el aislamiento de DNA plasmídico para secuenciación, *E. coli* se cultivaba en medio SB compuesto por Bacto-triptona (12 g/l), extracto de levadura (24 g/l), tampón fosfato potásico 0,9 M (pH 7,3) (100 ml/l) y glicerol (4 ml/l). Tanto el tampón fosfato como el glicerol se añadían al medio tras su esterilización en autoclave.

El medio empleado para el cultivo de la colección de auxótrofos de arginina de *E. coli* fue el medio mínimo M9 preparado según Sambrook *et al.* (1989), usando glucosa como fuente de carbono y energía. Los aminoácidos y otros requerimientos de los mutantes se deducen de los datos recogidos en la Tabla 1, mientras que la concentración a la que se añadían al medio de cultivo y el método de esterilización de tales sustancias se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Suplementos nutricionales para los auxótrofos de *E. coli*.

Nutriente	Concentración en el medio de cultivo (mM)	Esterilización
Adenina	0,5	Autoclave
Arginina	0,6	Autoclave
Guanina en HCl 1N	0,3	Autoclave
Histidina	0,1	Autoclave
Isoleucina	0,3	Autoclave
Leucina	0,3	Autoclave
Metionina	0,3	Autoclave
Prolina	2,0	Autoclave
Tiamina	0,05	Filtración
Treonina	0,3	Autoclave
Uracilo	0,1	Autoclave
Valina	0,3	Autoclave

Para la obtención de células de *E. coli* competentes para transformación (ver aptdo. II.D.2), las mismas se cultivaban en medio Ψ compuesto por: Bacto-triptona (20 g/l), extracto de levadura (5 g/l), $MgCl_2$ (4 g/l) y KCl (0,75 g/l).

Para el cultivo en cajas de Petri, los medios anteriores se solidificaban añadiendo 15 g/l de Bacto-agar. En el caso del medio mínimo M9, el agar se autoclavaba separadamente del resto de los componentes.

Los antibióticos se añadían a las siguientes concentraciones, tras su esterilización por filtración: ampicilina (Ap), 50-100 μ g/ml; cloranfenicol (Cm), 25 μ g/ml; kanamicina (Km), 50 μ g/ml y tetraciclina (Tc), 15 μ g/ml.

II.A.3. PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados en este trabajo como vectores de clonación se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Vectores de clonación.

Vector	Marcadores	Referencias
pBR322	Ap ^r Tc ^r	Bolivar <i>et al.</i> (1977)
pBluescript SK	Ap ^r	Short <i>et al.</i> (1988)
pDUCA7	Km ^r /Nm ^r	Buikema y Haselkorn (1991a)
pRL19B	Km ^r /Nm ^r	Elhai y Wolk (1988a)
pRL178	Km ^r /Nm ^r	Elhai y Wolk (1998a)
pRL479	Ap ^r Cm ^r	Elhai y Wolk (no publicado)
pRL538	Ap ^r	Elhai y Wolk (no publicado)
pUC18/19	Ap ^r	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)

II.B. MÉTODOS ANALÍTICOS

II.B.1. DETERMINACIÓN DE CLOROFILA

El contenido en clorofila *a* de los cultivos se estimaba espectrofotométricamente, tras su extracción con metanol, a partir de las células contenidas en 1 ml del cultivo (MacKinney, 1941). Las

células se recogían por centrifugación y se resuspendían en 1 ml de metanol, agitándose vigorosamente durante 1 min. Si el cultivo presentaba una alta concentración de células, se analizaba un volumen de 0,1 ml que se mezclaba directamente con 0,9 ml de metanol. La mezcla se centrifugaba a temperatura ambiente durante 5 min a 10.000 g y la absorbancia del sobrenadante se medía a 665 nm, utilizando un coeficiente de extinción $E=74,46 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Todas las medidas espectrofotométricas realizadas en este trabajo se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Hitachi, modelo U-1100. El número de células de *Anabaena* que contienen 1 μg de clorofila (aproximadamente $3,3 \cdot 10^6$ células) contienen aproximadamente 30 μg de proteína.

II.B.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de proteína a partir de células enteras se realizaba según el método descrito por Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones aportadas por Markwell *et al.* (1978). A 0,2 ml de muestra de suspensión celular se le añadían 0,05 ml de NaOH 0,5 N y 0,75 ml de una disolución de Na_2CO_3 al 2%, NaOH al 0,4%, tartrato sódico-potásico al 0,16%, SDS al 1% y CuSO_4 al 0,04%, agitándose a continuación e incubándose durante 15 min a 30°C. Posteriormente se añadían 75 μl de reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck) diluído dos veces, se agitaba y se incubaba durante 30 min a la misma temperatura. La cantidad de proteína de la muestra se calculaba comparando la absorbancia a 750 nm (tras el tratamiento anterior) con una curva patrón preparada con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

II.B.3. CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La cantidad de DNA o RNA obtenida en una extracción se estimaba visualizando muestras de las preparaciones en geles de agarosa con bromuro de etidio; para el RNA los geles debían ser de un porcentaje no inferior al 1% de agarosa. La cuantificación aproximada se llevaba a cabo comparando la fluorescencia de las bandas teñidas con bromuro de etidio con la fluorescencia de cantidades conocidas de fragmentos de restricción del DNA del fago λ , utilizado como patrón, al iluminar el gel con luz UV de 302 nm de longitud de onda (proporcionada por un transiluminador LKB modelo 2011 Macro Vue). Cuando se disponía de preparaciones puras, la cuantificación se

realizaba en base a la absorbancia de los ácidos nucleicos a 260 nm como se describe en Sambrook *et al.* (1989). Para el DNA se empleaba un coeficiente de extinción $E=0,020 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y para el RNA, $E=0,025 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

II.B.4. MEDIDAS DE pH

Las medidas de pH de los tampones y disoluciones utilizados se llevaban a cabo con un pH-metro Crison, modelo micropH 2001.

II.C. MANIPULACIÓN DE CIANOBACTERIAS

II.C.1. MUTAGÉNESIS CON LUZ ULTRAVIOLETA

La mutagénesis con luz UV se realizó como se describe en Flores y Schmetterer (1986) y Wolk *et al.* (1988). Las células de *Anabaena* sp. PCC 7120 se cultivaron en medio líquido BG11C, se recogieron por centrifugación a temperatura ambiente y se resuspendieron en 10 ml del mismo medio a una concentración de clorofila de 1 $\mu\text{g/ml}$. Esta suspensión celular se depositó en una caja de Petri de cristal de 90 mm de diámetro abierta y se irradió durante 5 min, en una habitación oscura, con una lámpara germicida GTE Sylvania G8T5 que proporcionaba luz UV de 254 nm. Dicha lámpara se precalentaba durante 15 min y se situaba a 25 cm de la superficie de la suspensión celular. Tras la irradiación, se tomaron 8 alícuotas de 1 ml, que se transfirieron a tubos con 0,1 ml de L-arginina 1 mM y se incubaron a 30°C durante 48 h bajo luz amarilla (en el interior de una caja de metacrilato forrada con celofán amarillo), con objeto de evitar la acción del sistema de reparación de DNA por fotorreactivación presente en cianobacterias (Tang y Asato, 1978). Para estimar la supervivencia, se sembraron diluciones de la suspensión celular en cajas de BG11C antes de la irradiación y después de la incubación en luz amarilla.

Con el contenido de cada tubo se inoculó un elenmeyer con 25 ml de medio BG11C suplementado con L-arginina 0,1 mM que se incubó, en condiciones normales de cultivo, durante aproximadamente 5-6 generaciones (unos 10 días). Con objeto de obtener filamentos homogéneos y con los posibles cromosomas mutados segregados, se procedió a la sonicación de cada cultivo durante 1 min en un baño

sonicador. Con este tratamiento se obtuvieron suspensiones de filamentos de 3-4 células, que se recogieron y se lavaron con BG11C. Dichas suspensiones se utilizaron para inocular ocho erlenmeyers con 25 ml de BG11C (sin arginina). Tras dos días de incubación en condiciones normales de crecimiento, se añadió a cada cultivo penicilina G sódica a una concentración final de 200 µg/ml. El proceso de enriquecimiento en mutantes de la población de cianobacterias con penicilina G se repitió una vez más. Los cultivos se mantuvieron en condiciones normales de cultivo hasta que se observó una lisis aparentemente total de los mismos (2-3 días). La recogida de las células supervivientes de cada cultivo se realizó por centrifugación y las células y restos celulares recogidos se lavaron varias veces con medio BG11C. Se sembraron entonces muestras diluídas de las suspensiones de células supervivientes en medio sólido BG11C suplementado con L-arginina 1 mM y a 50 colonias de cada una de las ocho líneas (400 en total) se les comprobó el fenotipo mediante siembra en cajas de BG11C suplementadas o no con L-arginina.

II.C.2. GENOTECA DE *Anabaena* sp. PCC 7120

La genoteca utilizada, por cortesía de W. J. Buikema y R. Haselkorn, para la complementación de los mutantes que se presentan en este trabajo, se había construido a partir de DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120, utilizando como vector el cósmido pDUCA7 (Buikema y Haselkorn, 1991a). Un mapa de restricción de pDUCA7 se presenta en la Figura 2.

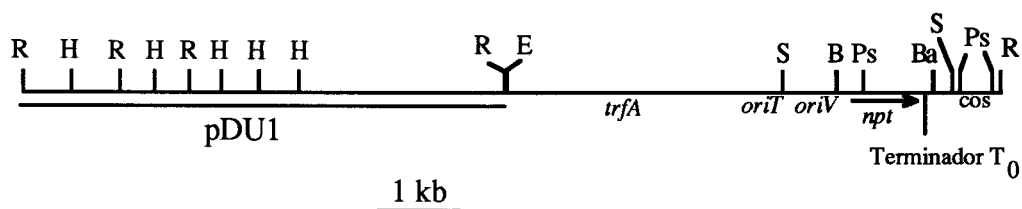


Figura 2.- Mapa de restricción del vector pDUCA7 (Buikema y Haselkorn, 1991a). B, *Bgl*II; Ba, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; Ps, *Pst*I; R, *Eco*RV; S, *Sal*I.

El vector pDUCA7 incluye al plásmido cianobacteriano pDU1, el cual aporta un origen de replicación activo en *Anabaena* (Wolk *et al.*, 1984). Por otra parte, es portador del origen de replicación (*oriV*) del plásmido RK2, el cual le permite su replicación en *E. coli*, donde se

mantiene con bajo número de copias. pDUCA7 es, por tanto, un vector anfíbio. Este vector contiene el gen *npt* que confiere resistencia a Nm y Km, lo que permite la selección del plásmido en las estirpes de *E. coli* y *Anabaena* portadoras del mismo. Entre el gen *npt* y el sitio de restricción *Bam*HI se localiza un terminador de la transcripción (T_0) procedente del fago T7, lo que impide la expresión del DNA clonado en el sitio de restricción *Bam*HI a partir de promotores del vector. La presencia de la secuencia *cos* del fago λ permite la utilización de este vector como un cósmido. La transferencia de pDUCA7 a *Anabaena* mediante conjugación con *E. coli* es posible gracias a la presencia en el mismo del origen de transferencia *oriT* y de un gen codificador de una proteína necesaria para la movilización del plásmido (*trfA*).

La genoteca se había generado insertando en el sitio único *Bam*HI de pDUCA7 fragmentos resultantes de una restricción parcial del DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 con la enzima *Sau*3AI. Los cósmidos obtenidos se empaquetaron y se transfirieron a la estirpe de *E. coli* HB101 que contenía el plásmido pRL528 (portador de los genes de las metilasas *Ava*I y *Eco*4711, la cual protege contra la restricción por *Ava*II), estableciéndose una genoteca de aproximadamente 20.000 clones que se mantenía de forma no individualizada (Buikema y Haselkorn, 1991a).

II.C.3. TRANSFERENCIA DE DNA A *Anabaena*: CONJUGACIÓN CON *E. coli*

II.C.3.1. Complementación de las estirpes CS335 y CS336 con la genoteca de *Anabaena* sp. PCC 7120

La complementación de las estirpes CS335 y CS336 con una genoteca de *Anabaena* sp. PCC 7120 se realizó transfiriendo la misma a los mutantes mediante conjugación tripartita como se describe en Buikema y Haselkorn (1991a). La mezcla de la estirpe de *E. coli* portadora del plásmido conjugativo (HB101 portadora de RP1), la alícuota de la genoteca de *Anabaena* (ver aptdo. II.C.2) y cada una de las estirpes mutantes se extendieron sobre filtros de nitrocelulosa (HATF 085 50; Millipore) en cajas de medio Kratz y Myers (Floriano *et al.*, 1992) suplementadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,5 mM) como fuente de nitrógeno, medio LB (5%) y L-arginina (1 mM), las cuales se incubaron 48 h en condiciones de baja intensidad de luz. Tras este periodo, los filtros se transfirieron a cajas de BG11 y Nm (30 mg/ml), incubándose

en condiciones normales de cultivo hasta la aparición de colonias. Se obtuvieron aproximadamente 20 exconjugantes de la estirpe CS335 y 40 de la estirpe CS336. Un número de estos exconjugantes se liberaron de las células de *E. coli* contaminantes mediante siembra de muestras diluídas de una suspensión celular de los mismos en medio selectivo utilizando agar de cobertera (ver aptdo. II.A.1.2.).

II.C.3.2. Otras conjugaciones

Las otras conjugaciones realizadas en este trabajo se llevaron a cabo según los procedimientos siguientes:

a) Los cultivos en fase exponencial de las estirpes CS335 y CS336 se lavaban y se resuspendían en 0,8 ml medio BG11 a una concentración de 8-10 μ g de clorofila/ml. Estas suspensiones se extendían sobre cajas de medio BG11 suplementado con medio LB (5%) y L-arginina (0,5 mM). Los cultivos de la estirpe de *E. coli* HB101 portadora de los plásmidos pRL443 (plásmido conjugativo derivado de RP4 que ha perdido la capacidad de conferir resistencia a Km) y pRL528 y de *E. coli* RR1 portadora del plásmido complementante se lavaban con LB, se mezclaban y se incubaban a 37°C durante aproximadamente 4 h para permitir la transferencia de los plásmidos conjugativo y auxiliar a la estirpe RR1. Tras este tiempo, se disponían 4 μ l de la mezcla de *E. coli* sobre las células de *Anabaena*. El procedimiento seguido con los filtros era el mismo que el que se detalla en el apartado anterior.

b) En las conjugaciones biparentales, las células de *Anabaena* se mezclaban con suspensiones de la estirpe de *E. coli* portadora del plásmido conjugativo pRL443, el plásmido auxiliar pRL528 y el plásmido complementante antes de ser depositadas sobre el filtro de nitrocelulosa en cajas de medio permisivo.

Algunos protocolos detallados del proceso de conjugación entre cianobacterias y *E. coli* pueden encontrarse en Thiel y Wolk (1987).

II.C.4. CÓSMIDOS Y SUBCLONES COMPLEMENTANTES

Los cósmidos recuperados de exconjugantes protótrofos que se utilizaron para la subclonación de los genes fueron los siguientes:

pCSB335-2: Fragmento de aproximadamente 30 kb procedente de una restricción parcial *Sau3AI* del DNA de *Anabaena* sp. PCC 7120, clonado en el sitio *BamHI* del vector pDUCA7 y capaz de complementar la mutación de la estirpe CS335.

pCSB336-18: Fragmento de aproximadamente 30 kb procedente de una restricción parcial *Sau3AI* del DNA de *Anabaena* sp. PCC 7120, clonado en el sitio *BamHI* del vector pDUCA7 y capaz de complementar la mutación de la estirpe CS336.

pCSB336-24: Fragmento de aproximadamente 30 kb, diferente al presente en pCSB336-18, procedente de una restricción parcial *Sau3AI* del DNA de *Anabaena* sp. PCC 7120, clonado en el sitio *BamHI* del vector pDUCA7 y capaz de complementar la mutación de la estirpe CS336.

Los plásmidos construidos en este trabajo se resumen a continuación, detallándose la forma en que se obtuvieron:

Derivados del cósmido pCSB335-2:

pCSB5.1: Fragmento *Sau3AI* de aproximadamente 6,5 kb, procedente de una restricción parcial del cósmido, clonado en el sitio *BamHI* del vector de selección positiva pRL178.

pCSB5.2: Fragmento *Sall* de aproximadamente 5 kb procedente de pCSB5.1 clonado en el sitio *Sall* del mismo vector (pRL178). Uno de los sitios *Sall* del fragmento pertenece a pRL178.

pCSB5.3: Fragmento *Sall-EcoRV* de aproximadamente 2,1 kb procedente de pCSB5.2 clonado en pBR322 digerido con las mismas enzimas.

pCSB5.4: Fragmento *EcoRV* de 0,9 kb procedente de pCSB5.2 clonado en el sitio *EcoRV* del vector de selección positiva pRL538.

pCSB5.5: Fragmento *EcoRV* de aprox. 1,8 kb procedente de pCSB5.2 clonado en pRL538.

pCSB5.6: Fragmento *HindIII* de aproximadamente 3,4 kb, procedente de pCSB5.2, clonado en pRL479 para su transferencia mediante conjugación a la estirpe de *Anabaena* CS335. Se denominó **pCSB5.6.b** a la construcción con el mismo fragmento clonado en pUC19 para su secuenciación.

pCSB5.7: Fragmento *Hind*III de aproximadamente 4,7 kb procedente del cósmido pCSB335-2 clonado en el sitio *Hind*III de pBluescript SK.

Derivados de los cósmidos pCSB336-18 y pCSB336-24:

pCSB6.a: Fragmento *Sau*3AI de aproximadamente 9,8 kb, procedente de una digestión parcial del cósmido pCS336-24, clonado en pRL178.

pCSB6.b: Fragmento *Hind*III de aproximadamente 3,2 kb procedente de pCSB6.a clonado en el mismo vector. El fragmento lleva un segmento perteneciente al vector del cósmido pDUCA7.

pCSB6.1: Fragmento *Hind*III-*Sal*I de aproximadamente 2,1 kb procedente de pCSB6.b clonado en pBR322. El sitio *Sal*I pertenece al remanente del vector pDUCA7 presente en el inserto de pCSB6.b.

pCSB6.2: Fragmento *Hind*III de aproximadamente 2,6 kb, procedente del cósmido pCSB336-18, clonado en pUC19 para la secuenciación de la región 5' del gen *argC*.

pCSB6.3: Fragmento *Hind*III de aproximadamente 2,6 kb procedente del cósmido pCSB336-18 clonado en pRL178.

pCSB6.4: Fragmento *Cla*I de 1,6 kb procedente de pCSB6.3 clonado en pRL538.

pCSB6.5: Inserto del plásmido pCSB6.4 (fragmento *Cla*I, 1,6 kb) flanqueado por los sitios *Eco*RI pertenecientes al vector pRL538 y clonado en pRL178.

pCSB6.7: Inserto del plásmido pCSB6.4 (fragmento *Cla*I, 1,6 kb) flanqueado por sitios *Eco*RI pertenecientes al vector pRL538 y clonado en el sitio *Eco*RI de pUC18. Esta construcción se obtuvo en las dos orientaciones posibles del inserto (pCSB6.7A y pCSB6.7B) ya que se usaría para la secuenciación del fragmento.

pCSB6.8: Fragmento *Cla*I-*Pvu*II de 1,3 kb procedente de pCSB6.1 clonado en los sitios *Cla*I-*Pvu*II del vector pBR322.

pCSB6.10: Fragmento *Cla*I-*Dra*I de 0,8 kb procedente de pCSB6.4 clonado en los sitios *Cla*I-*Pvu*II del vector pBR322.

pCSB6.11: Inserto del plásmido pCSB6.5, flanqueado por los sitios *Bam*HI pertenecientes al vector pRL178, clonado en el sitio *Bam*HI de pDUCA7. La orientación del inserto se seleccionó de manera que el terminador de la transcripción T₀ del fago T7, presente en pDUCA7, se encontrase en el extremo 5' del gen *argC* para impedir la transcripción del mismo a partir de secuencias promotoras del vector.

II.C.5. AISLAMIENTO DE DNA TOTAL Y PLASMÍDICO

El procedimiento empleado para el aislamiento de DNA total de *Anabaena* se describe en Cai y Wolk (1990). El método se basa en la rotura de las células con una mezcla de perlas de vidrio (212-300 μm de diámetro, Sigma) (150 μl), SDS 10% (20 μl) y 400 μl de fenol:cloroformo (1:1). Una vez añadida esta mezcla a una cantidad de células equivalente a 100-200 μg de clorofila, resuspendidas en 400 μl de Tris 10 mM/EDTA 0,1 mM (pH 7,5), se realizaban cuatro ciclos de 1 min de agitación vigorosa separados por 1 min de enfriamiento en hielo. Tras una primera centrifugación para desechar los restos celulares y sucesivas extracciones con fenol y cloroformo, el DNA extraído se precipitaba con etanol. Mediante este procedimiento se obtenían entre 25 y 50 μg de DNA de suspensiones de *Anabaena* con aproximadamente 120 μg de clorofila.

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *Anabaena* se empleó el método descrito por Schmetterer y Wolk (1988). Las células de *Anabaena* se resuspendían en 5 ml de una disolución de Tris 50 mM/EDTA 0,1 M (pH 8,0), sacarosa al 25% (p/v) y lisozima (1 mg/ml). Tras una incubación de 25 min en hielo, los esferoplastos obtenidos se trataban con 1,6 ml de una disolución de los detergentes Brij58 al 1% (p/v) y deoxicolato sódico al 0,4% (p/v) en Tris 50 mM/EDTA 62,5 mM (pH 8,0). La lisis se llevaba a cabo a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas y los restos celulares se descartaban tras una centrifugación. Después de un tratamiento con RNasa A y posteriores extracciones con fenol y cloroformo, el DNA se precipitaba con etanol.

II.C.6. AISLAMIENTO DE RNA TOTAL

El aislamiento de RNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120 se realizaba a partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento (conteniendo aproximadamente 3 μg clorofila/ml). Las células de cultivos de 150 ml burbujeados con aire se recogían por centrifugación a 4°C, tras enfriamiento rápido del cultivo, procediéndose entonces exactamente según el método de Golden *et al.* (1987). Las células se resuspendían en 5 ml de TE 50/100 (Tris 50 mM, EDTA 100 mM; pH 8) y, tras la adición de 1 ml de cloroformo, se incubaban 5 min en hielo y se centrifugaban a 8.000 g durante 10 min a 4°C. La fase acuosa y la

capa de cloroformo se eliminaban y el sedimento de células se resuspendía en 5 ml de una mezcla de Tris 45 mM, EDTA 90 mM, Tritón X-100 al 0,45% (v/v), sarcosil al 0,45% (p/v), SDS al 36% y el complejo vanadil-ribonucleósido (inhibidor de RNasas, New England Biolabs) 12 mM. Se añadían perlas de vidrio (425-600 micras, Sigma) (5 ml) y un volumen (5 ml) de fenol:cloroformo (1:1). La mezcla se sometía a tres ciclos de agitación vigorosa (3 min) y enfriamiento en hielo y se centrifugaba para someter la fase acuosa a dos extracciones con fenol:cloroformo (1:1) y dos con cloroformo. Los ácidos nucleicos obtenidos se precipitaban con etanol y el RNA se purificaba mediante centrifugación en un gradiente de cloruro de cesio (CsCl) o por precipitación con cloruro de litio durante 24 h a 4°C. Para el gradiente de cloruro de cesio, las muestras de ácidos nucleicos obtenidas se resuspendían en 9 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8) a los que se añadían 4,5 g de CsCl. En un tubo de ultracentrífuga se disponían 3,75 ml de CsCl 5,7 M, preparado en TE, sobre los que se depositaba suavemente la disolución de los ácidos nucleicos con CsCl. Tras centrifugar en un rotor Beckman tipo SW 28.1 a 25.000 rpm durante 16 h a 20°C, el precipitado conteniendo el RNA se resuspendía en TE y se volvía a precipitar con etanol. Las preparaciones se limpiaban de posibles remanentes de DNA con DNasa I (Boehringer). La cuantificación del RNA obtenido se realizaba mediante medidas espectrofotométricas a 260 nm de longitud de onda (ver aptdo. II.B.3) y por visualización en geles del 1% de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

II.D. MANIPULACIÓN DE *E. coli*

II.D.1. AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO

El método más utilizado en este trabajo para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*, tanto a pequeña escala (a partir de 3 ml de un cultivo que había crecido durante 12 horas) como a gran escala (a partir de 500 ml de cultivo), ha sido el de la lisis alcalina. El procedimiento detallado se recoge en Sambrook *et al.* (1989).

El DNA plasmídico para los experimentos de secuenciación se obtuvo utilizando un "kit" suministrado por Pharmacia ("Miniprep Kit Plus"), según las instrucciones del fabricante.

Los plásmidos procedentes de aislamientos realizados a gran escala se sometían a distintos procesos de limpieza como gradientes de cloruro de cesio o precipitaciones con polietilenglicol (Ausubel *et al.*, 1992).

II.D.2. TRANSFERENCIA DE DNA A *E. coli*

La transferencia de DNA plasmídico a *E. coli* se realizaba mediante transformación de células en estado competente. La obtención de células de las estirpes de *E. coli* DH5 α y HB101 con una alta frecuencia de transformación se llevaba a cabo mediante el procedimiento descrito por Hanahan (1983). Para el resto de las estirpes utilizadas (RR1 y la colección de auxótrofos de arginina) se empleó un tratamiento con CaCl₂ como se detalla en Ausubel *et al.* (1992). Todas las células tratadas se conservaban a -80°C hasta su utilización.

En el caso de los ensayos de complementación de la colección de auxótrofos de arginina, tras la transformación se seleccionaba primero en LB el marcador del vector del plásmido ensayado y, posteriormente, en medio mínimo M9, se comprobaba la prototrofia o auxotrofia de las colonias transformantes.

II.E. MANIPULACIÓN Y ANALISIS DE DNA

II.E.1. MANIPULACIONES ENZIMÁTICAS

Las distintas manipulaciones enzimáticas a las que ha sido sometido el DNA en el presente trabajo, tales como restricciones, desfosforilaciones, ligaciones y relleno de extremos cohesivos, se han llevado a cabo como se describen en Sambrook *et al.* (1989).

II.E.2. ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GELES DE AGAROSA

El análisis de DNA en geles de agarosa se llevaba a cabo según Sambrook *et al.* (1989), disolviendo distintas cantidades de agarosa, según la concentración deseada, en tampón TBE (Tris-base, 89 mM; ácido bórico, 89 mM; y EDTA 2 mM; pH 8). Previamente a la gelificación se añadía bromuro de etidio a una concentración aproximada de 1

µg/ml. Para su aplicación en el gel, las muestras se suplementaban con un tampón compuesto por dos colorantes (azul de bromofenol y xilencianol) y glicerol al 30% (Sambrook *et al.*, 1989). La electroforesis se llevaba a cabo en aparatos marca Pharmacia, modelo GNA-100 (minigeles) o modelo GNA-200 (maxigeles), a 70-100 V. Cuando se utilizaba agarosa de bajo punto de fusión, la gelificación y la electroforesis se llevaban a cabo a 4°C. Para la visualización del DNA, el gel se iluminaba con luz UV de 302 nm de longitud de onda mediante un transiluminador LKB modelo 2011 Macro Vue.

Como patrones para la determinación del tamaño de los fragmentos de DNA sometidos a electroforesis, se incluían muestras de fragmentos de tamaño conocido, normalmente DNA del fago λ digerido con las enzimas *HindIII* o *ClaI*.

II.E.3. EXTRACCIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DE GELES DE AGAROSA

La extracción de fragmentos de DNA de los geles de agarosa se realizaba mediante tres tipos de procedimientos:

a) Extracción a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión. En este caso, se cortaba la porción del gel que contenía la banda de DNA a extraer, se añadían cinco volúmenes de Tris 20 mM/EDTA 1mM (pH 8) y se calentaba a 65°C con objeto de fundir la matriz de agarosa. Tras varias extracciones con fenol:cloroformo (1:1), la fase acuosa conteniendo el DNA se precipitaba con etanol.

b) Extracción utilizando el "kit" Geneclean™ (BIO 101 Inc., USA). Este procedimiento se basa en la unión del DNA a una matriz de silicato una vez separada la porción del gel portadora del fragmento de DNA de interés y fundida la agarosa en presencia de una alta concentración de NaI. El DNA se recupera tras lavar la matriz de silicato con tampón TE.

c) Extracción del DNA por congelación/descongelación de la porción del gel portadora del fragmento. Es el método más sencillo ya que no precisa la utilización de ningún producto especial. La porción del gel cortada se introducía en una jeringa de pequeñas dimensiones (1 ml) y se mantenía a -20°C al menos dos horas, tras las cuales se sometía a una descongelación rápida al mismo tiempo que se presionaba con el émbolo de la jeringa. El líquido resultante, que contenía el DNA, se recogía en un tubo de microcentrífuga y se sometía a extracción con fenol:cloroformo. El DNA se concentraba precipitando con etanol.

II.E.4. TRANSFERENCIA DE DNA A FILTROS DE NYLON

La transferencia de DNA a filtros de nylon, tras su electroforesis en geles de agarosa, se realizaba esencialmente según las instrucciones del fabricante de cada membrana utilizada (Zeta-Probe, Bio-Rad; Hybond-N⁺, Amersham o Gene-Screen Plus, DuPont). Generalmente, tras un tratamiento con HCl 0,2 N para favorecer la transferencia de fragmentos de gran tamaño de DNA, ésta se realizaba por capilaridad con NaOH 0,4 M durante 16-24 horas. La fijación del DNA a cada tipo de membrana se realizaba según las instrucciones del correspondiente fabricante.

II.E.5. HIBRIDACIÓN DE DNA CON SONDAS RADIATIVAS

La hibridación del DNA fijado a un filtro de nylon con sondas radiactivas se llevaba a cabo según el método recomendado por los fabricantes de la membrana utilizada en cada caso. Un protocolo detallado y aplicable a cualquier tipo de membrana de nylon puede encontrarse en Ausubel *et al.* (1992). Previamente a la hibridación con la sonda marcada, la membrana se prehibridaba durante 3-5 horas con una disolución que contenía agentes bloqueantes (disolución de Denhardt, SDS y SSC o SSPE) y un exceso de DNA de esperma de arenque para evitar la unión inespecífica de la sonda radiactiva al filtro y al DNA fijado a la membrana. Tanto la prehibridación como la hibridación (que se comenzaba al añadir la sonda radiactiva desnaturalizada por incubación a 100°C durante 10 min) se realizaban a la misma temperatura, 65°C, ya que todas las hibridaciones llevadas a cabo en este trabajo se realizaron con sondas homólogas. Tras unas 16 horas de hibridación, se realizaban, generalmente, dos lavados a temperatura ambiente con SSPE 2x (NaCl 0,36 M, fosfato sódico 20 mM y EDTA 2 mM, pH 7,7) y SDS 0,1%; un lavado con SSPE 1x y SDS 0,1% a 65°C y, si la radiactividad emitida por el filtro era elevada, se realizaba un último lavado con SSPE 0,1x y SDS al 0,1 % a 65°C. La autorradiografía de la hibridación se obtenía al exponer una película de radiografía Valca XP-44 al filtro, intensificándose las señales con pantallas "Lightning Plus" (DuPont).

Para el marcaje de las sondas con ³²P se hacía uso indistintamente de dos "kits" diferentes suministrados por Boehringer, "Nick translation kit" y "Random Primed DNA labeling kit", siguiendo

en ambos casos las instrucciones del fabricante. El nucleótido marcado utilizado era 5' [α - 32 P]dCTP (3.000 mCi/ μ mol) en todas las reacciones de marcaje. Los nucleótidos no incorporados se eliminaban mediante filtración a través de columnas de Sephadex G-50.

II.E.6. SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación de los dos genes caracterizados en este trabajo se llevó a cabo según el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), que se basa en la terminación de la síntesis de cadenas de DNA con didesoxinucleótidos de cada una de las cuatro bases. Para la lectura de las dos cadenas (codificante y complementaria) de cada gen se utilizaron fragmentos de aproximadamente 200-300 pb, obtenidos mediante deleciones en serie de los fragmentos mayores de DNA.

II.E.6.1. Reacciones de deleción con la exonucleasa III

Los insertos de los plásmidos pCSB5.6.b (*argD*) y pCSB6.7A y pCSB6.7B (*argC*) se delecionaron mediante digestión controlada de los mismos con la exonucleasa III de *E. coli*, suministrada por Pharmacia en el "Double-stranded nested deletion kit", utilizada según las instrucciones del fabricante. Para que la digestión sea unidireccional hay que digerir el plásmido a deleccionar con una enzima de restricción que genere extremos 3' protuberantes (sobre los que la exonucleasa es incapaz de actuar) y otra que genere el extremo sustrato de la exonucleasa III (que puede ser romo o 5' protuberante). Debido a que el DNA usado en estos experimentos debe ser de gran pureza, los plásmidos se purificaron, tras su aislamiento, mediante precipitación con polietilenglicol. En el caso de pCSB5.6.b, la digestión que generó el extremo 3' protuberante protegido fue *KpnI* y la que proporcionó el extremo 5' para la digestión por la exonucleasa fue *SalI*. Para deleccionar pCSB6.7A y pCSB6.7.B se utilizaron *SphI* (extremo 3' protegido) y *XbaI* (extremo 5' sustrato). Los plásmidos deleccionados se trataban con la nucleasa S1 (suministrada por Boehringer) para la obtención de extremos romos que se ligaban con la ligasa del fago T4 (Boehringer). Los productos de estas ligaciones se recuperaban transformando *E. coli* DH5 α .

II.E.6.2. Reacciones de secuenciación

Tras el análisis de los plásmidos obtenidos mediante digestión con la exonucleasa III y la elección de aquellos que se someterían a secuenciación, se procedía al aislamiento de los mismos usando el método recomendado por Pharmacia ("Miniprep kit plus"). Los plásmidos aislados se desnaturalizaban con NaOH 0,4 N, y el DNA desnaturalizado se filtraba a través de columnas de Sephacryl S-400 o de Sepharosa G-50 con objeto de transferirlo a un tampón adecuado para la hibridación con los cebadores suministrados por Pharmacia ("T7 Sequencing kit"). Las cadenas de DNA sintetizadas por la polimerasa del fago T7 a partir de los cebadores unidos a los plásmidos desnaturalizados se marcaban radiactivamente con $5'[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ (1.212 mCi/ μmol). La reacción de secuenciación se terminaba mediante la adición a las muestras de un tampón con formamida y dos colorantes, suministrado en el "kit" empleado.

En el caso del gen *argD*, la secuenciación de la cadena codificante se completó mediante el uso, como cebador, de un oligonucleótido sintético de 17 residuos (5'GTAAGAAATTCTGCGAT3') localizado a 399 nucleótidos del extremo 3' del gen.

II.E.6.3. Análisis de las reacciones de secuenciación

Los productos de las reacciones de secuenciación se analizaban mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6% y urea al 18% utilizando TBE 1x como tampón y empleándose un aparato Hoefer, modelo SE 1500 "Pocker-face". La electroforesis se desarrollaba a una potencia constante de 130 W y a una temperatura de 55-65°C. Posteriormente, el gel se transfería directamente a papel Whatman 3MM y se secaba al vacío durante 1 hora a 80°C en un secador Hoefer modelo SE 1160. Aunque en los protocolos consultados se aconseja fijar los geles durante 15 min en una disolución de ácido acético 10% y metanol 10% en agua antes de su secado, se comprobó que no se alteraba ni la resolución ni la calidad de los geles si se obviaba este paso, facilitándose además la transferencia de los mismos al papel Whatman.

Una vez secos, se obtenía una autorradiografía de los geles mediante exposición a los mismos de una película Valca XP-44 a temperatura ambiente durante 16-24 horas.

II.F. ANÁLISIS DEL RNA

II.F.1. ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GELES DE AGAROSA

Para el análisis mediante hibridación con sondas radiactivas, el RNA se sometía a electroforesis horizontal en geles de agarosa, utilizando como tampón MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM (pH 7) y EDTA 1 mM (MOPS 1x; Ausubel *et al.*, 1992). La agarosa (a una concentración del 1,2%) se disolvía en el mismo tampón y, una vez enfriada a 60°C, se le añadía, en una campana de extracción, formaldehído al 1,11%. A estos geles no se les añadía bromuro de etidio, ya que interfiere y dificulta la posterior transferencia del RNA al filtro de nylon. La electroforesis se llevaba a cabo a 5 V/cm durante aproximadamente tres horas (100 V; geles de 20 cm de largo).

Las muestras de RNA a analizar se sometían a un tratamiento de desnaturalización (en un volumen máximo de 50 μ l) previo a la electroforesis, calentándolas a 65°C durante 10 min tras añadirles 25 μ l de formamida, 8,75 μ l de formaldehído al 37% y 5 μ l de MOPS 10x (Ausubel *et al.*, 1992). Como patrones de tamaño se utilizaban RNAs de tamaños conocidos ("RNA molecular weight markers II", Boehringer), que se desnaturalizaban de la misma manera que el resto de las muestras y se sometían a electroforesis en una calle del gel que, antes de la transferencia al filtro, se cortaba y se teñía con bromuro de etidio para la visualización de las bandas.

II.F.2. TRANSFERENCIA DE RNA A MEMBRANAS DE NYLON

La transferencia a membranas de nylon de las muestras de RNA sometidas a electroforesis se realizaba según las instrucciones del fabricante de la membrana. En este trabajo se utilizaron membranas Hybond-N⁺ (Amershan) y Gene Screen Plus (Dupont). Tras la electroforesis, el gel se lavaba varias veces con agua para eliminar el formaldehído, ya que éste puede interferir en la posterior transferencia del RNA al filtro. Ésta se realizaba en tampón SSPE 10x durante 15-20 horas (para la membrana Gene Screen Plus), o en NaOH 50 mM durante 3-4 horas (para la membrana Hybond-N⁺) a temperatura ambiente en ambos casos. Para la fijación del RNA a la membrana Gene Screen Plus, ésta se incubaba a 80°C durante 2 h, tratamiento que también servía para evaporar el posible remanente de

formaldehído. Al realizar la transferencia alcalina con las membranas Hybond-N⁺ no era necesario ningún tratamiento posterior para la fijación del RNA.

II.F.3. TINCIÓN DEL RNA TRANSFERIDO CON AZUL DE METILENO

Una vez fijado al filtro, el RNA se teñía con una disolución de azul de metileno al 0,02% (p/v) y acetato sódico 0,5 M (pH 5,2) hasta la visualización de las bandas mayoritarias (RNA ribosómico). Con esta tinción se pretendía comprobar la eficacia de la transferencia y la cantidad de RNA de cada muestra. El filtro se desteñía, tras fotografiarlo, con una disolución de SSPE 0,2x y SDS al 1% hasta que desaparecían todas las bandas.

II.F.4. HIBRIDACIÓN DE RNA CON SONDAS RADIATIVAS

La hibridación se realizaba según el protocolo recomendado por el fabricante de la membrana, a 65°C durante toda la noche, después de aproximadamente dos horas de prehibridación. Las sondas se marcaban con el "Random primed DNA labeling kit" (Boehringer) y se añadían tras su desnaturalización (ver aptdo. II.E.5). El número y la fuerza de los lavados del filtro se decidían según la cantidad de radiactividad emitida por el mismo, que se estimaba con un contador Geiger. La autorradiografía del filtro se obtenía mediante exposición de una película Valca XP-44 al mismo, utilizándose pantallas intensificadoras "Lightning Plus" (DuPont), a -80°C.

II.F.5. DETERMINACIÓN DEL INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN

La determinación del inicio de la transcripción de los genes caracterizados en este trabajo se realizó utilizando el método de elongación a partir de un cebador ("Primer extension"), según Ausubel *et al.* (1992). La reacción de síntesis de DNA dependiente de RNA se llevó a cabo con la transcriptasa inversa AMV (de "Avian Myeloblastosis Virus") suministrada por Boehringer. Los cebadores de 20 nucleótidos que se utilizaron fueron los siguientes:

<i>argC</i>	5' (54) TCTGTAAGCCTGTAGTTCCC	3'
<i>argD</i>	5' (29) GGCTTGCTCAATGAGAGTTT	3'

Entre paréntesis se señala la posición del primer nucleótido del cebador con respecto al primer nucleótido de cada gen. Estos cebadores se marcaban radiactivamente en su extremo 5' con [γ - ^{32}P]dATP (5.000 mCi/ μmol), utilizando la enzima polinucleótido kinasa (Boehringer). Se utilizaban aproximadamente 100 ng de cebador marcado, con aproximadamente 100.000 cpm, por reacción y se hibridaba a 50°C durante tres horas con 50-100 μg de RNA total aislado de células de *Anabaena* cultivadas con distintas fuentes de nitrógeno. La reacción de elongación se llevaba a cabo a 42°C ó 46°C durante 1 hora y los productos resultantes se analizaban en geles de poliacrilamida-urea, junto con los productos de la reacción de secuenciación obtenida con DNA de la zona 5' del gen usando el mismo cebador. La electroforesis y posterior tratamiento del gel eran idénticos a los descritos para la secuenciación de los genes.

II.G. TRATAMIENTO INFORMÁTICO DE SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS

La edición de secuencias de DNA, RNA y proteínas se llevó a cabo con el programa DNA Strider, versión 1.1 para Apple Macintosh. Este mismo programa se utilizó para deducir las ORFs en cada una de las fases de lectura de los fragmentos secuenciados y el peso molecular de las proteínas codificadas por estas ORFs. También se utilizó para deducir los mapas de restricción de los fragmentos de DNA secuenciados.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes secuenciados con las secuencias de nucleótidos contenidas en el "EMBL Data Bank" se realizó utilizando el programa TFASTA, que traduce dichas secuencias de nucleótidos en secuencias de aminoácidos, y con las secuencias de proteínas contenidas en el "Swiss Protein Data Bank" utilizando el programa FASTA (Pearson y Lipman, 1998). Las proteínas homólogas encontradas se alineaban utilizando el programa PILEUP. Aplicando el programa MOTIFS se pusieron de manifiesto en las proteínas ArgC y ArgD dominios funcionales importantes de las mismas. Las posibles estructuras secundarias en el extremo 3' de los mRNA de los genes *argC* y *argD* se analizaron con el programa FOLD que proporcionaba, además, sus energías libres de formación. Estos diferentes programas

de análisis de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos están contenidos en el paquete informático del "Genetics Computer Group" (GCG) de la Universidad de Wisconsin (Devereux *et al.*, 1984), que se encuentra depositado en el Centro de Informática Científica de Andalucía (CICA), Sevilla.

III. RESULTADOS

III.A. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ESTIRPES MUTANTES DE *Anabaena* sp. PCC 7120 AFECTADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE ARGININA

III.A.1. MUTAGÉNESIS Y SELECCIÓN DE ESTIRPES AUXÓTROFAS DE ARGININA

El método de mutagénesis empleado para la obtención de auxótrofos de arginina de *Anabaena* sp. PCC 7120 fue la irradiación con luz ultravioleta. Todas las manipulaciones posteriores se realizaron de forma independiente con ocho alícuotas de la suspensión celular irradiada con objeto de facilitar la recuperación de mutantes independientes según se detalla en Materiales y Métodos. Las células irradiadas se incubaron en luz amarilla en medio de cultivo conteniendo L-arginina 1 mM. La supervivencia, tras el proceso de mutagénesis, se estimó mediante siembra en cajas de muestras tomadas de la suspensión celular antes de la irradiación y después de la incubación en luz amarilla. La supervivencia obtenida fue del 0,16% de las unidades formadoras de colonias.

Las células supervivientes se cultivaron en medio BG11C suplementado con L-arginina para permitir la expresión y segregación de las mutaciones y los cultivos resultantes se sometieron a un tratamiento con ultrasonidos para fragmentar los filamentos. Las suspensiones con los filamentos fragmentados se incubaron en medio BG11C suplementado con penicilina G hasta que los cultivos parecían lisados. Finalmente, las células supervivientes de este proceso se sembraron en cajas conteniendo BG11C sólido y L-arginina 1 mM. Se comprobó el fenotipo en medio BG11C \pm arginina 1 mM a 50 colonias procedentes de cada línea de cultivo (un total de 400).

Se obtuvieron dos estirpes mutantes aisladas de forma independiente, denominadas CS335 y CS336, que eran incapaces de crecer sin arginina añadida al medio. Una tercera estirpe, CS334, presentaba un crecimiento anormal en medios sin arginina (crecimiento lento y células de color verdoso), aunque no llegaba a presentar un requerimiento estricto de arginina.

III.A.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTIRPES CS334, CS335 Y CS336

III.A.2.1. Estudio de la tasa de crecimiento

Se estudió el crecimiento de las estirpes mutantes en medio líquido BG11C suplementado con distintas concentraciones de L-arginina, estableciéndose que el requerimiento de arginina se satisfacía con una concentración de 10 μM en el medio (se usaron concentraciones de 0, 10, 100 y 1000 μM). A esta concentración de L-arginina, la tasa de crecimiento de la estirpe CS334 ($\mu=0,61 \text{ d}^{-1}$) era prácticamente igual a la de la estirpe silvestre ($\mu=0,64 \text{ d}^{-1}$), y no aumentaba significativamente al aumentar la concentración de arginina en el medio. En medios suplementados con L-arginina, la estirpe CS335 mostró una tasa de crecimiento menor que la del silvestre ($\mu=0,45-0,50 \text{ d}^{-1}$) y similar a la de la estirpe CS336 ($\mu=0,40-0,50 \text{ d}^{-1}$) (Fig. 3).

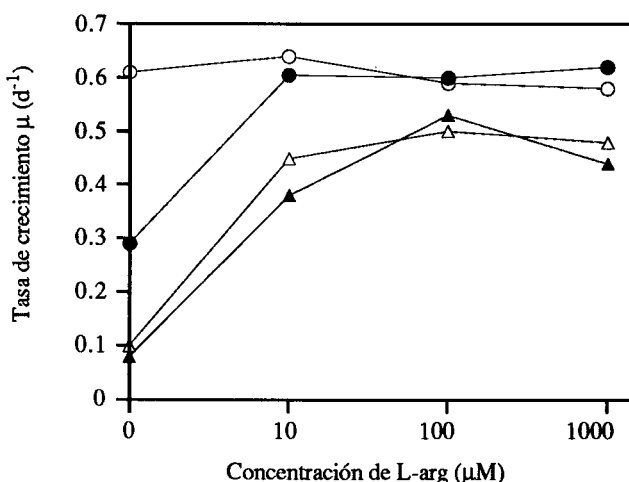


Figura 3.- Tasa de crecimiento (μ) de *Anabaena* 7120 (○) y de las estirpes CS334 (●), CS335 (▲) y CS336 (△) en medio líquido BG11C suplementado con 0, 10, 100 ó 1000 μM de arginina.

Asimismo, se estudió el comportamiento de la estirpe PCC 7120 y los auxótrofos CS335 y CS336 en medio BG11₀ (carente de fuente de nitrógeno) suplementado con distintas concentraciones de L-arginina, observándose que en presencia de este aminoácido los mutantes mostraban tasas de crecimiento similares a las de la estirpe silvestre ($\mu=0,2-0,3 \text{ d}^{-1}$).

III.A.2.2. Estudio del crecimiento de los mutantes en presencia de intermediarios de la ruta de biosíntesis de arginina

Como se ha mencionado en la Introducción, la conversión del L-glutamato en L-arginina tiene lugar mediante una ruta metabólica que, para su estudio, puede ser dividida en dos partes: biosíntesis de ornitina a partir de L-glutamato y conversión de ornitina en arginina (Fig. 4).

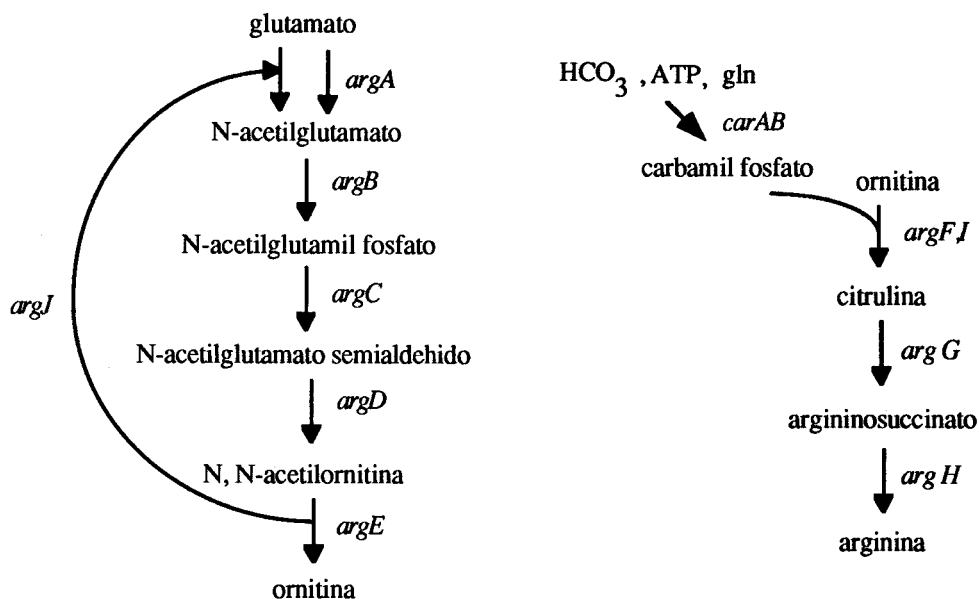


Figura 4.- Ruta de biosíntesis de ornitina y arginina en microorganismos, animales y plantas.

Con objeto de establecer en qué paso enzimático estaban afectados los mutantes obtenidos, se realizó un estudio del crecimiento de los mismos en medio sólido BG11C suplementado con diferentes intermediarios de la ruta a las concentraciones de 10, 100 y 1000 μM . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. Los dos únicos compuestos no ensayados fueron el N-acetilglutamil fosfato y el N-acetilglutamato-5-semialdehído, que no se encuentran disponibles comercialmente. Las estirpes CS335 y CS336 crecían sólo en presencia de ornitina, citrulina o arginina, estando afectadas por lo tanto en la biosíntesis de ornitina. El crecimiento de la estirpe CS334 era estimulado sólo por L-citrulina o L-arginina y, por otra parte, se inhibía fuertemente en presencia de ornitina (ver Discusión). Esta estirpe no se utilizó en los posteriores estudios presentados en esta Tesis.

Tabla 4.- Crecimiento de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de las estirpes CS334, CS335 y CS336 en presencia de intermediarios de la ruta de biosíntesis de arginina. El número de cruces indica el nivel de crecimiento observado; "n.c.": no se observaba crecimiento.

Intermediario añadido	Concentración (μM)	Estirpes			
		7120	CS334	CS335	CS336
		++++	++	n.c.	n.c.
L-glutamato	10 ¹	++++	++	n.c.	n.c.
	10 ²	++++	++	n.c.	n.c.
	10 ³	++++	++	n.c.	n.c.
N-acetilglutamato	10 ¹	++++	++	n.c.	n.c.
	10 ²	++++	++	n.c.	n.c.
	10 ³	++++	++	n.c.	n.c.
N-acetilornitina	10 ¹	++++	++	n.c.	n.c.
	10 ²	++++	++	n.c.	n.c.
	10 ³	++++	++	n.c.	n.c.
L-ornitina	10 ¹	++++	++	++	++
	10 ²	++++	+	++++	++++
	10 ³	++++	n.c.	++++	++++
L-citrulina	10 ¹	++++	++	+	+
	10 ²	++++	++++	++++	++++
	10 ³	++++	++++	++++	++++
argininosuccinato	10 ¹	++++	++	n.c.	n.c.
	10 ²	++++	++	+	+
	10 ³	++++	+	+	+++
L-arginina	10 ¹	++++	++	++	++
	10 ²	++++	++++	++++	++++
	10 ³	++++	++++	++++	++++

III.B. COMPLEMENTACIÓN DE LAS ESTIRPES MUTANTES CS335 Y CS336 CON UNA GENOTECA DE *Anabaena* sp. PCC 7120

La complementación de las estirpes CS335 y CS336 se realizó transfiriendo en masa una genoteca de la estirpe silvestre (establecida en el cósmido pDUCA7, portador de orígenes de replicación tanto para la cianobacteria como para *E. coli*; Buikema y Haselkorn, 1991a) mediante conjugación tripartita con *E. coli*, según se detalla en Materiales y Métodos (ver aptdo. II.C.3.1), seleccionándose clones resistentes al antibiótico neomicina (marcador del cósmido) que no requiriesen arginina para su crecimiento. De esta manera se aislaron 20 exconjugantes de la estirpe CS335 y 40 de la estirpe CS336. Algunos de estos exconjugantes se liberaron de las células de *E. coli* contaminantes sembrándolos repetidamente en medio selectivo. Se aisló DNA plasmídico de dos exconjugantes de la estirpe CS335 y de cinco de la estirpe CS336. Con estas preparaciones de DNA se procedió a la transformación de *E. coli* RR1, seleccionando la resistencia a Km codificada por el vector, para la amplificación de los cósmidos aislados.

Al realizar un estudio de restricción de los diferentes cósmidos obtenidos, pudo comprobarse que los cósmidos procedentes de dos exconjugantes distintos de la estirpe CS335, pCSB335-2 y pCSB335-11, presentaban muchos fragmentos idénticos en tamaño. En la figura 5 se muestra el resultado de digerir estos cósmidos con la enzima *EcoRV*. En otras restricciones con diferentes enzimas se obtenían también bandas similares a partir de ambos cósmidos. En cuanto a los cósmidos aislados de los exconjugantes de la estirpe CS336, también pudo comprobarse que producían un elevado número de fragmentos comunes, si bien dichos cósmidos no eran idénticos entre sí (Fig. 5). En la figura 6 se muestra un mapa de restricción de algunos de los cósmidos obtenidos. El hecho de que los insertos de cósmidos aislados de diferentes exconjugantes de la estirpe CS336 producían fragmentos solapantes era indicativo de la presencia en los mismos de la versión silvestre del gen alterado en el mutante al cual habían complementado.

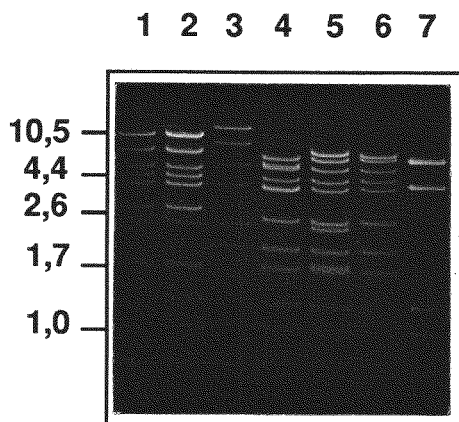


Figura 5.- Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos resultantes de la digestión con *EcoRV* de los cósmidos aislados de los exconjugantes de los mutantes CS335 y CS336. Carril 1, pCSB335-2; carril 2, pCSB335-11; carril 3, pCSB336-17; carril 4, pCSB336-18; carril 5, pCSB336-23; carril 6, pCSB336-24; carril 7, vector pDUCA7. Se indica la posición ocupada por los marcadores utilizados, así como su tamaño en kb.

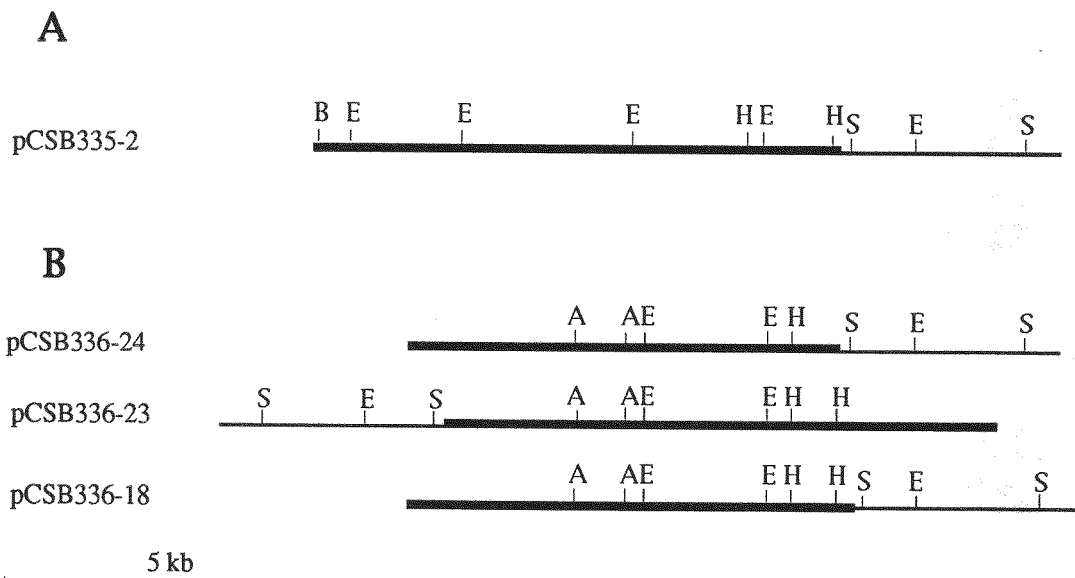


Figura 6.- Mapa de restricción de los cósmidos pCSB335-2 (A) y pCSB336-24, pCSB336-23 y pCSB336-18 (B). Con trazo grueso se señala el DNA perteneciente a *Anabaena*. Sólo se muestran los sitios *HindIII* que definen a los fragmentos que contienen a cada gen. A, *ApaI*; B, *BglIII*; E, *EcoRI*; H, *HindIII*; S, *SalI*.

Con objeto de comprobar si los cósmidos aislados mantenían su capacidad de complementación, se llevaron a cabo conjugaciones de las estirpes cianobacterianas mutantes con las estirpes de *E. coli* conteniendo los diferentes cósmidos. El resultado de dichas conjugaciones se muestra en la figura 7.

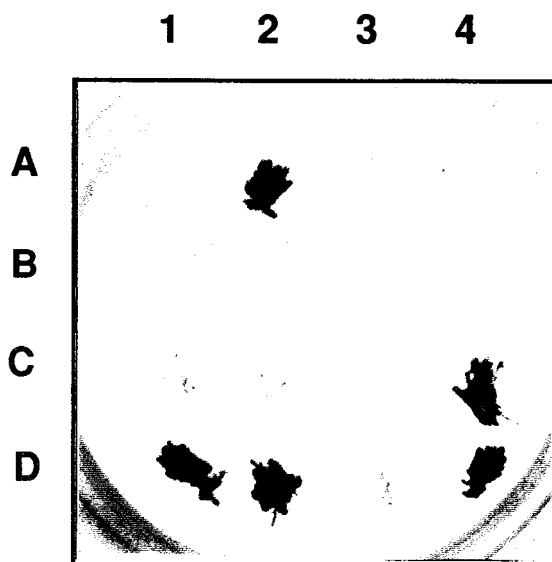


Figura 7.- Conjugación de las estirpes CS335 y CS336 con *E. coli* conteniendo el plásmido conjugativo pRL443, el metilador pRL528 y el cósmido indicado en cada caso (ver Materiales y Métodos, aptdo. II.C.3.2). La conjugación con la estirpe CS335 se muestra en la zona superior (A1-A4 y B1-B4) y con la estirpe CS336 en la inferior (C1-C4 y D1-D4). La distribución de los cósmidos fue la siguiente: A1 y C1, vector pDUCA7; A2 y C2, pCSB335-2; A3 y C3, pCSB335-11; A4 y C4, pCSB336-17; B1 y D1, pCSB336-18; B2 y D2, pCSB336-20; B3 y D3, pCSB336-23; y B4 y D4, pCSB336-24.

Todos los cósmidos obtenidos, a excepción de pCSB335-11 y pCSB336-23, mantenían su capacidad de complementación al reintroducirlos en el correspondiente auxótrofo. Los cósmidos no complementantes podrían haber sufrido recombinación homóloga recíproca con los cromosomas mutados después de la transferencia original y haber adquirido la versión alterada de los correspondientes genes. Asimismo, la figura 7 muestra que ninguno de los cósmidos aislados de la estirpe CS335 era capaz de complementar a la estirpe CS336 y viceversa.

III.C. SUBCLONACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN AFECTADO EN LA ESTIRPE CS335

III.C.1. SUBCLONACIÓN DEL GEN

La subclonación del fragmento del cósmido pCSB335-2 capaz de complementar a la estirpe CS335 se llevó a cabo mediante una restricción parcial con *Sau3AI* del mismo, ligando los fragmentos obtenidos al plásmido de selección positiva pRL178 previamente digerido con la enzima *Bam*HI. Tras la transformación de la estirpe *E. coli* RR1, se obtuvieron aproximadamente 900 colonias resistentes a Km (marcador del vector). De estas colonias resistentes a Km, 275 se conjugaron con la estirpe CS335, encontrándose que sólo tres de ellas poseían un fragmento capaz de conferir prototrofia al mutante. En la figura 8 se presenta el mapa de restricción del inserto del plásmido de menor tamaño que era capaz de complementar al mutante CS335 (denominado pCSB5.1).

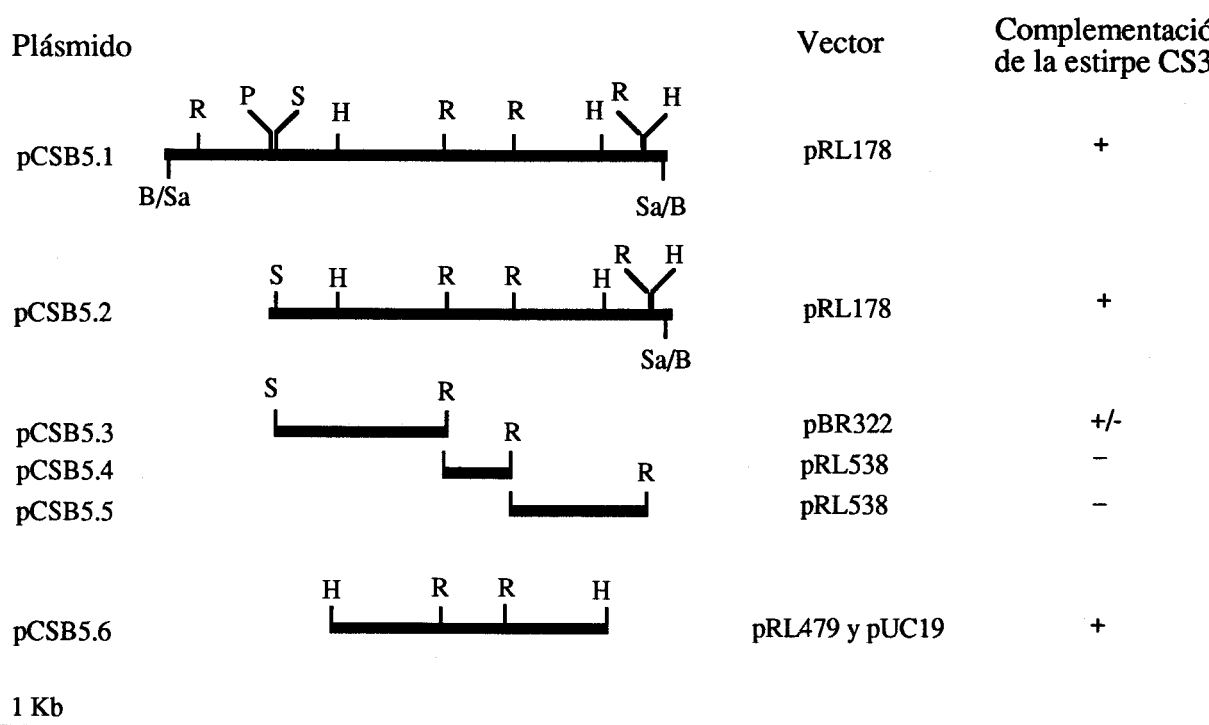


Figura 8.- Mapas de restricción de los insertos de los plásmidos pCSB5.1, pCSB5.2, pCSB5.3, pCSB5.4, pCSB5.5 y pCSB5.6. En figura se indica el vector utilizado en la construcción de cada plásmido pCSB. La capacidad de complementación se ensayó transfiriendo a la estirpe CS335 los distintos subclones mediante conjugación con *E. coli*. Los símbolos + ó - indican la capacidad o no de complementar a la estirpe mutante CS335; +/- indica muy baja frecuencia de complementación. H, *Hind*III; P, *Pst*I; R, *Eco*RV; S, *Sal*I; Sa/B, *Sau*3AI/*Bam*HI.

En la figura 8 también se muestra el mapa de restricción de los subclones pCSB5.2 (derivado de pCSB5.1 usando el mismo vector, pRL178), pCSB5.3, pCSB5.4, pCSB5.5 y pCSB5.6 (derivados de pCSB5.2 usando el vector que se indica en cada caso), así como su capacidad de complementar o no a la estirpe mutante CS335.

Al comparar el tamaño del fragmento *Hind*III del clon pCSB5.6 (3,4 kb) con los fragmentos resultantes de una restricción del cósmido pCSB335-2 con la misma enzima, se observó que no existía dicho fragmento *Hind*III en el cósmido. Esto indicó que el inserto de pCSB5.1 se había generado mediante una reordenación de fragmentos *Sau*3AI no contiguos en el cósmido.

Para identificar el fragmento del cósmido pCSB335-2 que portaba el gen silvestre, se realizó una hibridación de dicho cósmido digerido con *Hind*III, *Eco*RI, *Eco*RV, *Eco*RI-*Bgl*II o *Eco*RI-*Sall*, usando como sonda el fragmento *Eco*RV de 0,9 kb de la construcción pCSB5.4 (véase Fig. 8), dado que se había comprobado por secuenciación parcial, como se detalla más adelante, que este fragmento poseía parte de un gen de la biosíntesis de arginina. Como se observa en la figura 9, el fragmento *Hind*III del cósmido que hibridaba con la sonda usada tenía un tamaño de 4,7 kb, aproximadamente. El resto de las hibridaciones realizadas sirvieron para localizar el fragmento *Hind*III complementante en un extremo del cósmido pCSB335-2, tal y como se muestra en la figura 9.

La clonación del fragmento *Hind*III del cósmido que contenía al gen silvestre se realizó extrayendo la banda correspondiente de un gel de agarosa y ligándola al plásmido pBluescript SK, obteniéndose la construcción denominada pCSB5.7. Un mapa de restricción de este fragmento se muestra en la figura 10.

Para comprobar que en el cósmido pCSB335-2 el gen silvestre estaba contenido en los mismos fragmentos de restricción que en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120, se realizó una hibridación de DNA total de *Anabaena* digerido con las enzimas *Hind*III o *Eco*RV utilizando como sonda el fragmento *Hind*III de 4,7 kb obtenido del cósmido. En la figura 11 se observa que las bandas de hibridación corresponden a los tamaños esperados si el fragmento *Hind*III de 4,7 kb del cósmido estuviera íntegro en el cromosoma (banda *Hind*III de 4,7 kb, bandas *Eco*RV de 0,9 y 1,7 kb internas en el fragmento *Hind*III, y dos bandas *Eco*RV adyacentes a éstas y extendiéndose más allá de los sitios *Hind*III en el cromosoma de *Anabaena*). Además, puede observarse la presencia de bandas de hibridación de menor intensidad

adicionales (de 2,6 kb en la restricción *Hind*III y de 4,7 kb en la restricción *Eco*RV) que podrían corresponderse con un gen homólogo al contenido en el fragmento *Hind*III de 4,7 kb utilizado como sonda.

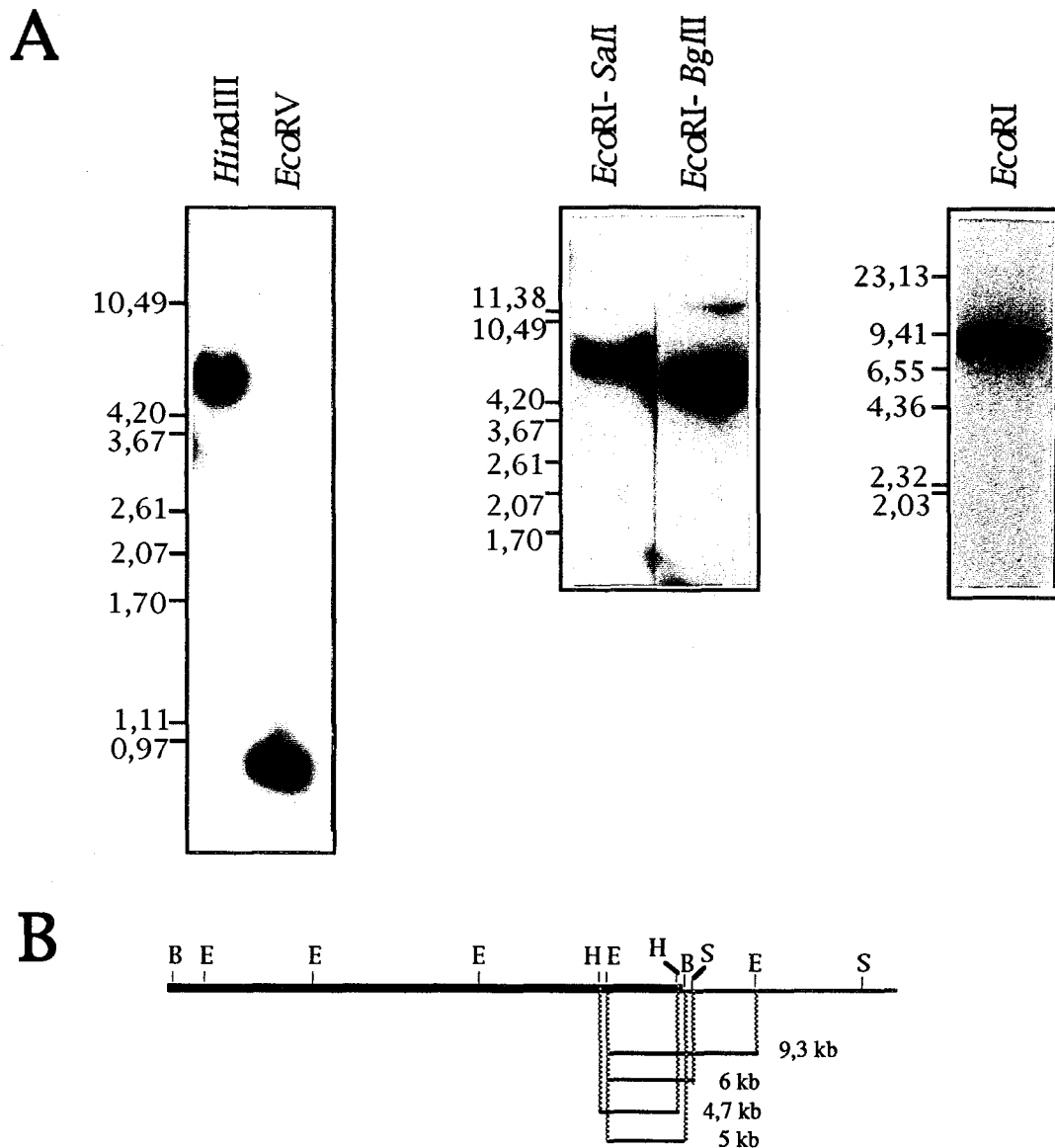


Figura 9.- A. Hibridaciones del cósmido pCSB335-2, digerido con las enzimas señaladas, usando como sonda el fragmento *Eco*RV de 0,9 kb de pCSB5.4. Se indica la posición ocupada por los marcadores utilizados, así como su tamaño en kb. B. Localización del fragmento del cósmido homólogo a la sonda utilizada según los tamaños de los fragmentos que hibridaban en cada restricción. B, *Bgl*II; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; y S, *Sal*I.

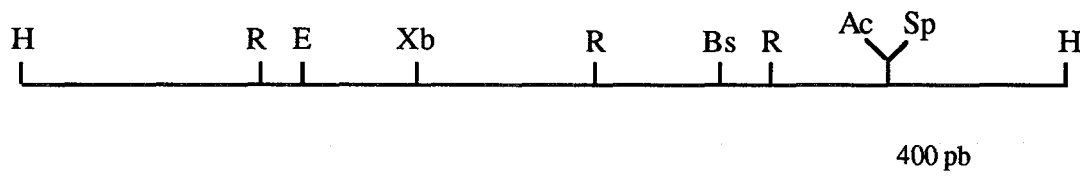


Figura 10.- Mapa de restricción del inserto del plásmido pCSB5.7. Ac, *Acc*I; Bs, *Bst*XI; H, *Hind*III; E, *Eco*RI; R, *Eco*RV; Sp, *Spe*I y Xb, *Xba*I.

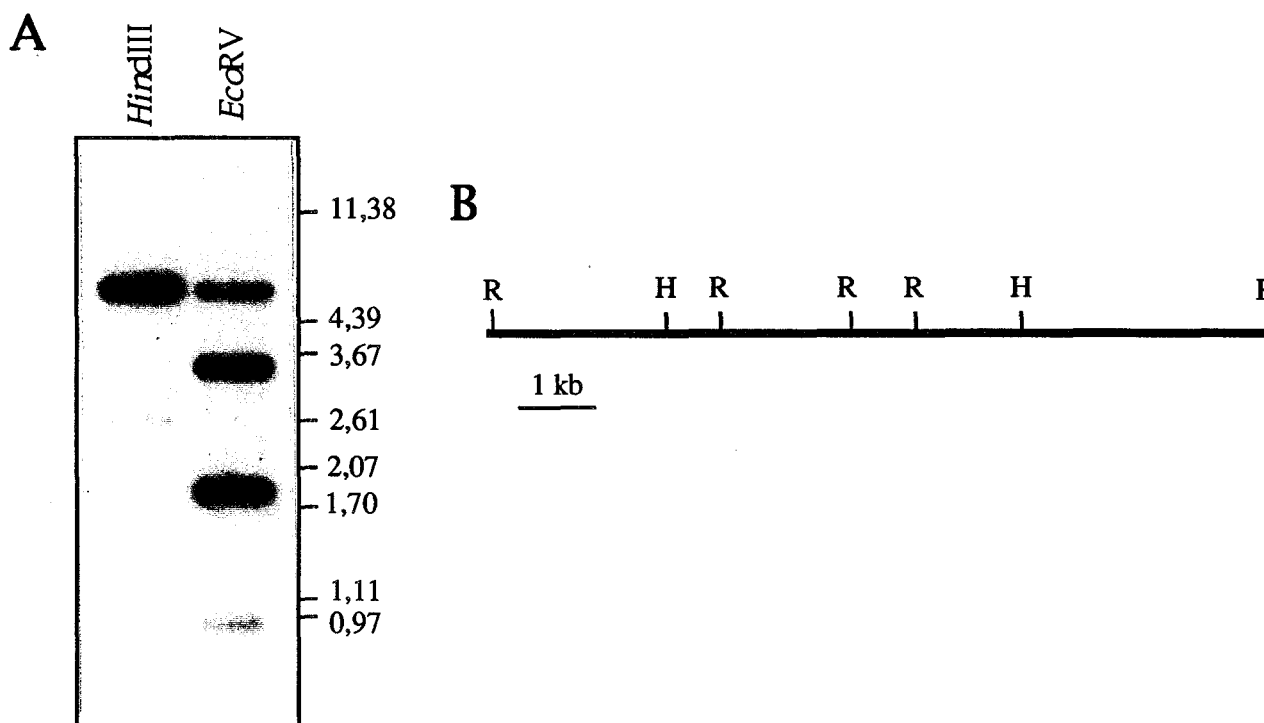


Figura 11.- A. Hibridación de DNA genómico de *Anabaena* sp. PCC 7120, digerido con las enzimas de restricción *Hind*III o *Eco*RV, utilizando como sonda el fragmento *Hind*III de 4,7 kb. Se indica la posición ocupada por los marcadores utilizados, así como su tamaño en kb. B. Mapa de restricción del fragmento de DNA cromosómico que contendría al gen silvestre. H, *Hind*III; R, *Eco*RV.

III.C.2. INTENTO DE IDENTIFICACIÓN DEL GEN MEDIANTE COMPLEMENTACIÓN DE AUXÓTROFOS DE ARGININA DE *E. coli*

Se intentó identificar el gen afectado en el mutante CS335 mediante complementación, con el DNA clonado de la estirpe silvestre de *Anabaena*, de una serie de mutantes de *E. coli* afectados en los distintos genes de la ruta de biosíntesis de arginina (ver Estirpes de *E. coli* en Materiales y Métodos). No se empleó el mutante de *E. coli* afectado en el gen *argD* ya que éste era un auxótrofo rezumante. Los ensayos de complementación se realizaron transformando cada mutante de *E. coli* con el cósmido pCSB335-2 y con algunos subclones derivados del mismo, y ensayando la capacidad de crecimiento de los transformantes en medio sin arginina (ver Materiales y Métodos, aptdo. II.D.2). Ninguna de la estirpes ensayadas mostró un fenotipo protótrofo tras la transformación.

III.C.3. SECUENCIACIÓN DEL GEN

El fragmento *Hind*III de 3,4 kb del plásmido pCSB5.6 (ver Fig. 8) se clonó en el vector pUC19 con objeto de realizar las deleciones necesarias (según se detalla en Materiales y Métodos) para determinar el menor fragmento complementante y secuenciar el mismo. Los fragmentos obtenidos en una dirección se muestran en la figura 12.

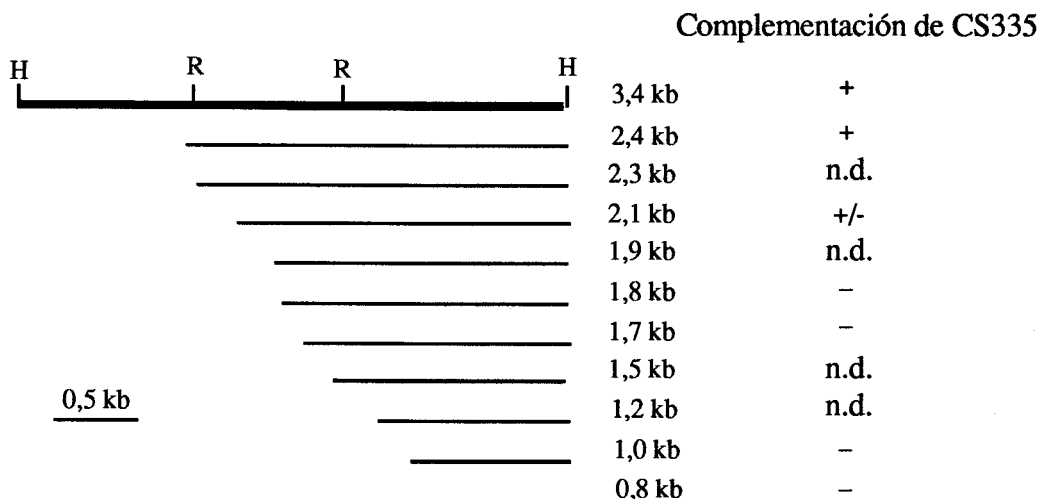


Figura 12.- Fragmentos obtenidos mediante digestión del fragmento *Hind*III de 3,4 kb (de pCSB5.6) con la exonucleasa III. Los fragmentos obtenidos (cuyo tamaño se muestra) se transfirieron al vector pRL19B para su envío por conjugación a la estirpe CS335. +, fragmento capaz de conferir prototrofia; -, fragmento incapaz de complementar al mutante; +/-, baja frecuencia de complementación; n.d., no determinada la capacidad de complementación con el fragmento indicado. H, *Hind*III; R, *EcoRV*.

Para determinar la capacidad de complementación de los fragmentos obtenidos, un número de ellos (especificadas en la Fig. 12) se transfirieron al plásmido pRL19B portador de la secuencia *bom* y, por lo tanto, transferible a *Anabaena* mediante conjugación con *E. coli*. En la figura 12 se muestra que el fragmento de 2,1 kb era capaz de complementar la mutación de la estirpe CS335 con baja frecuencia. Los fragmentos de menor tamaño no complementaron al mutante. Estos datos indicaban que al menos una parte del gen se encontraba en el fragmento clonado de 2,1 kb, y que la versión silvestre de la secuencia mutada en la estirpe CS335 estaba contenida en dicho fragmento.

Se procedió a la secuenciación de una de las cadenas del DNA silvestre utilizando los fragmentos obtenidos mediante deleción.

Sometiendo la secuencia obtenida al programa de análisis de secuencias DNA Strider versión 1.1, se encontró una ORF de 1.284 nucleótidos. La secuenciación de la cadena complementaria se realizó utilizando el fragmento *Hind*III de 4,7 kb procedente del cósmido (el inserto de pCSB5.7). La secuencia obtenida permitió comprobar que el gen se encontraba íntegro también en el fragmento *Hind*III de 3,4 kb. (La reordenación que había tenido lugar en la construcción pCSB5.1 no había afectado por lo tanto al gen, debiendo localizarse en algún lugar a la izquierda del sitio *Eco*RV señalado con un asterisco en la figura 13.) En la figura 13 se muestra la localización de la ORF presente en el fragmento secuenciado que corresponde al gen clonado. También se indican en la figura los fragmentos solapantes secuenciados en cada cadena.

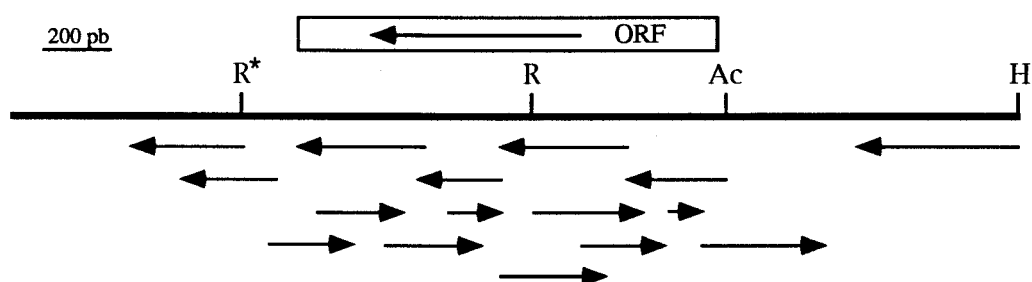


Figura 13.- Estrategia de secuenciación del fragmento de DNA silvestre portador del gen afectado en la estirpe CS335. La cadena no codificante se secuenció a partir del fragmento *Hind*III de 4,7 kb procedente del cósmido y la cadena codificante a partir del fragmento *Hind*III de 3,4 kb del plásmido pCSB5.6. Ac, *Acc*I; H, *Hind*III; R, *Eco*RV.

En la figura 14 se muestran la secuencia de nucleótidos del fragmento secuenciado y la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada en la mayor ORF encontrada. La no existencia de codones ATG en el posible extremo 5' del gen y el análisis comparativo de la proteína codificada (ver siguiente apartado) nos sugirió que el inicio de la traducción del mRNA de este gen se localizaría en un codón GUG. Otro dato que apoya que éste sea el codón de iniciación de la traducción es la existencia de una posible secuencia de unión al ribosoma (Shine y Dalgarno, 1974) 7 nucleótidos antes de dicho codón. Esta secuencia, 5'AGGAGG3', es complementaria del extremo 3' del RNA ribosómico 16S de *Anabaena* sp. PCC 7120, cuya secuencia es: 5' GGAUCACCCUCCUUU 3' (Ligon *et al.*, 1991).

1 TTCTGTAACCTGTTGACAAATGTAGCCAAGATTGACTACACCCAACAAAATTAAGGCAATAGTAAATAAGC
72 GTCCACGACTACCAAGAGGGTTGGTTTTCGCCATATCTACGGTAGCTAAGGTAATTAAGTGTATGTAAGCTG
143 CATCTTCCCATGACCAACCCCTCAAACAAAGCGATACCACAAAGTACCGAGAAATTAATACACCACCGAGAGC
+1 en BG11₀
214 GATCGCCCCGGCCATTAACCTCTTTTTGGATGCGTGGTATTCTGTTCAGAGTTGAATACAAAATTATTT
-35 -10 +1 en BG11 y BG11₀
285 TCCACTATT**TCGCAC**AGGTTTGAGGATATATA**ATGTTA**AGCTCAAGAGAAAGTAAGAAACACAATAAATA
354 AAAATTTATTTTTAAGAAACTCTAGGAACTAGTAAGTATACAAATCAAAAATCCGCAGGAGGAGCGT
425 TA GTG AGC CTA CAA ACT CTC ATT GAG CAA GCC ACG AAC CCC CCA GAG TCA GGT
1 met ser leu gln thr leu ile glu gln ala thr asn pro pro glu ser gly
478 TCT GCT GCA TCT AGC CCC TTT AGT ACA GAT AGC TTT GAC GCA TCT GTT ATG TCC
18 ser ala ala ser ser pro phe ser thr asp ser phe asp ala ser val met ser
532 ACA TAC GGA CGC TTT CCC CTC GCT TTA GAA CGG GGT GCA GGT TGC CGA GTA TGG
36 thr tyr gly arg phe pro leu ala leu glu arg gly ala gly cys arg val trp
586 GAT ACC CAG GGC AAA GAA TAC CTA GAC TTT GTG GCG GGG ATT GCC ACT TGT ACA
54 asp thr gln gly lys glu tyr leu asp phe val ala gly ile ala thr cys thr
640 CTG GGA CAC GCC CAC CCA GCT ATG GTA GAA GCG GTG ACA CGC CAA ATC CAA AAG
72 leu gly his ala his pro ala met val glu ala val thr arg gln ile gln lys
694 CTG CAC CAT GTA TCT AAT TTG TAC TAC ATT CCC GAA CAA GGT GAA TTA GCC CAA
90 leu his his val ser asn leu tyr tyr ile pro glu gln gly glu leu ala gln
748 TGG ATT ATT CAA CAC TCC TGC GCT GAT CGG GTA TTT TTC TGT AAT TCT GGC GCT
108 trp ile ile gln his ser cys ala asp arg val phe phe cys asn ser gly ala
802 GAA GCC AAC GAA GCC GCT ATT AAA CTG GCT CGT AAA TAT GCC CAT ACA GTT TTA
126 glu ala asn glu ala ala ile lys leu ala arg lys tyr ala his thr val leu
856 GAC ATA GAA AAG CCT ATT ATT CTC ACC GCC AAT GCC AGT TTC CAC GGA CGG ACA
144 asp ile glu lys pro ile ile leu thr ala asn ala ser phe his gly arg thr
910 TTG GCA ACT ATT ACC GCT ACT GGG CAA GCA AAG TAT CAA AAA TAT TTT GAC CCC
162 leu ala thr ile thr ala thr gly gln ala lys tyr gln lys tyr phe asp pro
964 CTA GTA CCC GGA TTT CAC TAT GTA AAT TAC AAC GAT ATC AGT GCG GTA GAA GCA
180 leu val pro gly phe his tyr val asn tyr asn asp ile ser ala val glu ala
1018 GCT ATT AGC GAG TTA GAC GAG GGA GAT TAC CGA GTA GCG GCA ATT CTC ATC GAA
198 ala ile ser glu leu asp glu gly asp tyr arg val ala ala ile leu ile glu
1072 CCA TTA CAA GGG GAA GGC GGT GTT CGT CCT GGT GAT GTG GAA TAC TTC CAA AAG
216 pro leu gln gly glu gly gly val arg pro gly asp val glu tyr phe gln lys
1126 CTG CGG CAA ATT TGT GAT GAC ACC GGC ATT TTG TTG ATG TTC GAT GAA GTG CAG
234 leu arg gln ile cys asp asp thr gly ile leu leu met phe asp glu val gln
1180 GTC GGG ATG GGA CGC AGT GGT AAA TTG TGG GGT TAT GAA TAC CTG GGT GTA GAA
252 val gly met gly arg ser gly lys leu trp gly tyr glu tyr leu gly val glu
1234 CCA GAC ATT TTC ACC AGC GCC AAA GGT TTG GGT GGT GGT ATC CCC ATT GGG GCG
270 pro asp ile phe thr ser ala lys gly leu gly gly gly ile pro ile gly ala
1288 ATG ATG AGT AAG AAA TTC TGC GAT GTC TTC CAA CCA GGA GAA CAC GCC AGC ACC
288 met met ser lys lys phe cys asp val phe gln pro gly glu his ala ser thr
1342 TTT GGT GGT AAT CCC TTT GCT TGT GGT GTA GCG TTG GCT GTG TGT CAG ACC TTG
306 phe gly gly asn pro phe ala cys gly val ala leu ala val cys gln thr leu
1396 GAA AGG GAG AAT ATT TTG CAG AAT GTG CAA GAT AGA GGG GAA CAG TTA AGG AGT
324 glu arg glu asn ile leu gln asn val gln asp arg gly glu gln leu arg ser
1450 GGC TTA AGA GCG ATC GCT GCT AAA TAT CCC CAT CAT CTA ACT GAA GTT CGC GGC
342 gly leu arg ala ile ala ala lys tyr pro his his leu thr glu val arg gly
1504 TGG GGT TTA ATT AAC GGT CTG GAA TTA GCC GCA GAT ATT CCA TTA ACT GCT GCT
360 trp gly leu ile asn gly leu glu leu ala ala asp ile pro leu thr ala ala
1558 GAT GTC GTC AAG GCT GCT ATC AAC GAG GGC TTA TTG TTA GTA CCA GCC GGG CCA
378 asp val val lys ala ala ile asn glu gly leu leu val pro ala gly pro
1612 AAA GGT CGT CCG CTT TGT ACC ACC ATT AAT TGT CAC AGA GGC AGA AAT CAA CAC
396 lys val val arg phe val pro pro leu ile val thr glu ala glu ile asn thr
1666 CGC CTT AAA ATT ACT GGA AAA AGC ATT AGC AAC TGT GAC AGC GTA AATCATAGACT
414 ala leu lys leu glu lys ala leu ala thr val thr ala OCH
1722 GCTGGCAAAAATAGCG**AAAATAATCACCGCCGATACACACCAATGAACCGCTGATAAATGTCTGTGTTTCATC**
1793 **TACTGAAATCGGGCGCTTATTTTTATCAAAAATCTTCACTACTTGAGCTAGATGCAATTTTGAAATAGAA**
1864 CATAATTGCCAATAAAGATATACTTTGCTCAGTATCTGATTATGCTCTAATAATCCCGATACGATA
1935 CCATCTTGACTCTTTACGCTCTGTATCTAAAGGTAGAAAATAAAGGTTAACTTAAAGTTGGGCAACCTGA
2006 GGAAGTTCTATCTGCTCAAGAGTAACCTGCCAATTTATATGCACTACAACCTGAGGTCAAATGACGCAATC
2077 TTGCAATCGAGTCAACGTTTGGGAAGAAGCCGTAACCGAAGCTAATACATACATAAGCAAGGAAAATTTT
2148 CAGAATATCTCGATTTAGTAACAGAAAATTTACAATTAGCTAGAGCAATTCAGACCGAGCTAAAGAAGGT
2219 CATACTTGAACGATATTGGTTTAGCATATCTTGGGGTGT

Figura 14.- Secuencia de nucleótidos de la versión silvestre del gen de *Anabaena* sp. PCC 7120 mutado en la estirpe CS335 y secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el mismo. En negrita se señalan las posibles secuencias promotoras -35 y -10, así como los nucleótidos +1 de la transcripción en diferentes medios de cultivo (BG11 o BG11₀). Se muestran subrayadas la posible secuencia de unión al ribosoma y los nucleótidos implicados en una posible estructura secundaria del extremo 3' del mRNA.

Delante del gen se señalan las secuencias promotoras del mismo (ver aptdos. III.C.6 y IV.D). Detrás de la ORF existe una serie de nucleótidos capaces de formar una estructura secundaria en el mRNA, con una energía libre de formación de -26,3 kcal/mol, cuyo extremo 3' presenta una serie de residuos de T (U en el RNA). Dicha estructura, que podría actuar como un terminador de la transcripción independiente de Rho, se muestra en la figura 15.

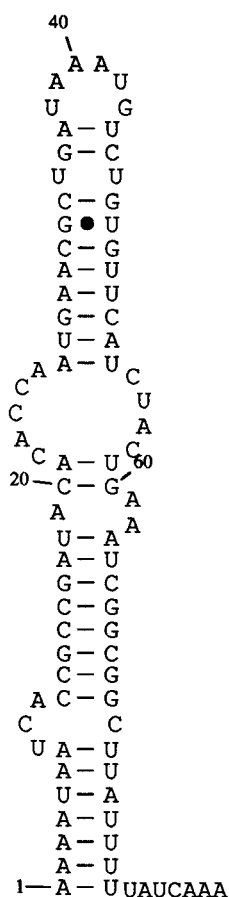


Figura 15.- Estructura de la región 3' del mRNA del gen secuenciado con posible función de terminación de la transcripción.

III.C.4. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA ArgD

La proteína resultante de traducir la ORF presente en el fragmento secuenciado está compuesta por 427 aminoácidos y tendría un peso molecular de 46.110. Para intentar identificar dicha proteína, y con ello el gen afectado en el mutante CS335, se comparó su secuencia con las secuencias de aminoácidos encontradas en los bancos de datos disponibles. Según este análisis, el producto del gen secuenciado es homólogo a las N-acetilornitina aminotransferasas (ACOAT, E.C. 2.6.1.11) de *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, enzimas codificadas por

los genes *argD* y *ARG8* (Heimberg *et al.*, 1990), respectivamente, y responsables de la conversión del N-acetilglutamato-5-semialdehído en N-acetilornitina, cuarto paso de la ruta de biosíntesis de arginina. En la Tabla 5 se recogen éstas y otras proteínas que, según el programa utilizado, son las que presentan una mayor similitud con la proteína cianobacteriana.

Tabla 5.- Proteínas con mayor semejanza a la acetilornitina aminotransferasa (ACOAT) de *Anabaena* sp. PCC 7120 según el programa TFASTA. Se indica el porcentaje de residuos idénticos que se encuentran en los solapamientos del número de aminoácidos indicado. Abreviaturas: OAT, ornitina aminotransferasa; ABA, 4-aminobutirato aminotransferasa; GSA, glutamato 1-semialdehído 2,1-aminomutasa; DAPA, DAPA aminotransferasa y DGD, 2,2-dimetilglicina descarboxilasa.

PROTEINA	PROCEDENCIA	% IDENTIDADES	SOLAPAMIENTOS
ACOAT	<i>E. coli</i>	39,3	407 aa
	Levaduras	40,3	404 aa
OAT	Hombre	33,9	428 aa
	Rata	32,9	428 aa
	Levaduras	32,7	397 aa
ABA	<i>E. coli</i>	34,8	397 aa
	Mitocondria	27,7	235 aa
	Levaduras	24,8	258 aa
	<i>Aspergillus</i>	31,3	217 aa
GSA	<i>Salmonella</i>	27,7	310 aa
	<i>E. coli</i>	27,0	331 aa
	<i>Synechococcus</i>	26,7	330 aa
	<i>Hordeum vulgare</i>	25,8	330 aa
DAPA	<i>E. coli</i>	26,8	407 aa
	<i>Bacillus</i>	28,3	152 aa
DGD	<i>Pseudomonas</i>	29,1	412 aa

Las aminotransferasas son enzimas dependientes de piridoxal fosfato, el cual se une covalentemente a un residuo de lisina (K) de la proteína. El análisis de la ACOAT de *Anabaena* con el programa MOTIFS (que compara fragmentos de la secuencia de una proteína con las secuencias consenso de dominios polipeptídicos de función conocida) mostró que ésta pertenece, junto a las proteínas recogidas en la Tabla 5, a una de las familias de enzimas dependientes de piridoxal fosfato (Bairoch A., 1992). La secuencia de aminoácidos consenso del sitio de unión del piridoxal fosfato en este grupo de enzimas es la siguiente:

[LIVMFYW](2)-X(1)-D-E-[LIVMA]-X(2)-[GP]-[LIVMFYWA]-X(0,1)-[AR]-X(1)-[AG]-X(12,14)-D-[LIVMFYW]-X(3)-[SAG]-K-X(3)-[STAGN]-[GA]

(Entre corchetes se muestran los residuos que se pueden encontrar en esa posición y, entre paréntesis, el número de ellos; una X indica cualquier aminoácido y la K es el residuo de lisina donde se une covalentemente el piridoxal fosfato.)

En la figura 16 se muestra el alineamiento de la ACOAT cianobacteriana con la enzima más parecida de cada uno de los subgrupos recogidos en la Tabla 5. Cabe destacar en este alineamiento que la secuencia del sitio de unión del piridoxal fosfato en la ACOAT de *Anabaena* se ajusta a la secuencia consenso de unión del mismo. Los residuos idénticos en todas las proteínas se destacan con asteriscos (*) y aquellos presentes en, por lo menos, cuatro de las proteínas se muestran en negrita, de manera que se observa la existencia de otras zonas con gran conservación de secuencia.

ACOAT_Anabaena		MSLQT	LIEQATNPPE	SGSAASSPFS	TDSFD..ASV	MSTY.G...RFP.L	ALERGAGCRV	(52)
ACOAT_Levadura			MFKRYL....	..SSTSSRRF	TSILEEKAFQ	VTTY.S...RPEDL	CITRGKNAKL	(44)
OAT_Hombre	MFSKLAHLQR	FAVLRSRGVHS	SVASATSVAT	KKTVOGPPTS	DDIFEREYKY	GAHN.Y...HPLPV	ALERKGGIYL	(70)
ABA_Escherichia				MNSN	KELMQRRSQA	IPRGV...QIHPF	PADRAENCRV	(35)
DGD_Pseudomonas				SLNDD	ATFWRNARQH	LVRVYGG...TFPEM	IIRAKGSFV	(41)
AMA_Bacillus				MKQVL	TELQEKDLQH	VWHPCS...Q	MRDYEAFPPF	VTKKGGVWL	(42)
GSA_Salmonella				MSKS	ENLYSAAREL	IPGGVNSPVR	AFTGVGGTFL	FIEKADGAYL	(44)
* * ** *									
ACOAT_Anabaena	WDT.QGKEYL	DFVAGIATCT	LGHANPAMVE	AVTRQIQKHL	HVS.NLYYIP	EQGELAQWII	Q.....HS	CADRFFCNS	(123)
ACOAT_Levadura	YDDVNGKEYI	DFTAGIAVTA	LGHANPKVAE	ILHHQANKLV	HSS.NLYFTK	ECLDLSEKIV	EKTKQFGQGH	DASRVFLCNS	(123)
OAT_Hombre	WD.VEGRKYF	DFLSSYSAVN	QGHCHPKIVN	ALKSQVDKLT	LTS.RAFYNN	VLGEYEEYIT	KLF.....	NYHKVLPMT	(141)
ABA_Escherichia	WD.VEGREYL	DFAGGIAVLN	TGHLHPKVVA	AVEAQLKLS	HTCFQVLAYE	PYLELCEIMN	QKV...PGD	FAKKTLLVTT	(110)
DGD_Pseudomonas	YD.ADGRAIL	DFTSGEMSAV	LGHCHPEIVS	VIGEYAGKLD	HL.FSGIVSR	PVVDLATRLA	NIT....PPG	L.DRALLST	(114)
DAPA_Bacillus	YDEQNQR.YL	DAVSSWVNL	FGHANPRISQ	ALSEQAFTLE	HTIFANFSHE	PAIKLAQKLV	ALT.....PQ	SLQKVFADN	(116)
GSA_Salmonella	YD.VDGMAYI	DYVGSWGPV	LGHNHPAIRN	AVIEAARE..GLSFG	APTEMEVKMA	ELVTNLVPT.	.MDMVRMVNS	(114)
* * * * *									
ACOAT_Anabaena	GAEANEAAIK	LARKYAHTVL	DIE..KPIIL	TANASFHGRT	LATITATGQA	KYQKYFDPVL	PGFHY.....VN	(188)
ACOAT_Levadura	GTEANEAAIK	FAKKHG.IMK	NPS..KQGV	AFENSFHGRT	MGALSVTWNS	KYRTPPGDLV	PHVSF.....LN	(187)
OAT_Hombre	GVEAGETACK	LARKWGYTVK	GIQKYKAKIV	FAAGNFWGRT	LSALSSSTD	TSYDGFPPFM	PGFDI.....IP	(208)
ABA_Escherichia	GSEAVENAVK	IAR.....	.AATKRSGTI	AFSGAYHGRT	HYTLALTGKV	NPYSAGMGLM	PGHVYRALYP	C..PLHGISE	(180)
DGD_Pseudomonas	GAESENAAIR	MAK.....	.LVTGKYEIV	GFAQSWHGMT	GAAASATYSA	GRKGVGPAAV	GSFAIPAPFT	YRPFERNGA	(186)
DAPA_Bacillus	GSSAIEVALK	MS..FOYHMQ	TGKTQKRFEL	ALTDAYHGRT	LGALSVEGVD	LYNEVYQPLL	LDTVRAQGGD	CFRCPFKHP	(194)
GSA_Salmonella	GTEATMSAIR	LARGF.....	...TGRDKI	KFEGCYHGHA	DCLLVKAGSG	AL.....TL	GQNSPGVPA	DFAKHTLTCT	(180)
** * * *									
ACOAT_Anabaena	YNDISAVEAA	ISELDEGD.Y	RVAAILIEP.	LQEGGGVVRPG	DVEYFQKLRQ	ICDDTGILLM	FDEVQVGMGR	SGKLWGYEYL	(266)
ACOAT_Levadura	LNDEMTKLQS	YIETKDE..	.IAGLIVEP.	IQEGGGVFPV	EVEKLTGLKK	ICQDNDVIVI	HDEIQCGLR	SGKLWAHAYL	(262)
OAT_Hombre	YNDLPALEA	LQDPN....	.VAAFMVEP.	IQEGAGVVVP	DPGYLMGVRE	LCTRHOVLFI	ADEIQTGLAR	TGRWLAVDY.	(280)
ABA_Escherichia	DDAIASIHRI	FK..NDAAPE	DIAAIVIEP.	VQEGGGFYAS	SPAQMQLRA	LCEDEHGMILI	ADEVQSGAGR	TGTLFAME..	(255)
DGD_Pseudomonas	YDYLAELDYA	FLLIDRQSSG	NIAAFIAP.	ILSSGGIIEI	PDGYMAALKR	KCEARGMLLI	LDEAQTGVGR	TGTLFACQ..	(263)
DAPA_Bacillus	DSCHAQCISF	VEDQLRMHHK	EITAVIIEPL	IQAAAAGMKMY	PAIYLRRLRE	LCTQYDVHLI	ADEIIVGFR	TGTLFACE..	(272)
GSA_Salmonella	YNDLTSVRAA	FEQY....PQ	EIASIIEVP.	VAGNMNCVPP	LPEFLPCLRA	LCDEFGALLI	IDEVMTGF.R	VA..IAGAO	(252)
** * * *									
ACOAT_Anabaena	GVE..PDIFT	SAKGLGGGI.	PIGA.MMSKK	FCDVFQPG..	...EH..AST	FGGNPFAC.G	VALAVQCOTLE	RENILQNVQD	(334)
ACOAT_Levadura	PSEAHEDIPT	SAKALNGF.	PIAATIVNEK	VNNALRVG..	...DH..GTT	YGGNPLAC.S	VSNYVLDTIA	DEAFKQVSK	(333)
OAT_Hombre	.ENVRPDIIVL	LKALSGLGLY	PVSAVLCCDD	IMLTIKPG..	...EH..GST	YGGNPLGC.R	VAIAALEVLE	EENLAENADK	(351)
ABA_Escherichia	QMGVAPDLTT	FAKSIAGGF.	PLAGVTGRAE	VMDAVAPG..	...G..LGST	YAGNPIACVA	.ALEVLKVFPE	QENLLQKAND	(326)
DGD_Pseudomonas	RDGVFPDILT	LSKTLGAGL.	PLAAIVTSA	IEERAHEL..	...GYLFYTT	HVSDRCPPAG	VGLRVLDDVQ	RDGLVARANV	(327)
DAPA_Bacillus	QANISPEFMC	LSKGLTGGYL	PLSVVMTTND	VYQAFYDDYA	TMKAFLLSHS	YTGNLAC.R	VALEVLAIPE	EEQYIDVQD	(351)
GSA_Salmonella	YYGVVFDLTC	LCKLIGGGM.	PVCAFGRRD	VMDALAPT..	...GPVYQAGT	LSGNPIA.MA	AGFACINEVA	QPGIHETLDE	(326)
* * *									
ACOAT_Anabaena	RGEQLRSGLR	AIAAKYPHHL	TEVRGNGLIN	GLELAADIPL	T.....	AADVKAAIN	EGL....LLV	PAGPKVVRV	(401)
ACOAT_Levadura	KSDILQKRLR	EIQAKYPNQI	KTIRGKGLM.	...LQAEFVE	P.....	PTEVIKKARE	LGL....LI	TAGKSTVRV	(396)
OAT_Hombre	LGIILRNELM	KLP...SDVV	TAVRGKGLN	AIVIRETKDW	D.....	AWKVCRLRD	NGL....LAK	PTHGDIIRFA	(415)
ABA_Escherichia	LGQKLDGLL	AIAEKHPE.I	GDVRCGLGAMI	AIELPEDGDH	NKP...DAKL	TAEIVARAR	KGLIL..LSC	GPYYNVLRI	(400)
DGD_Pseudomonas	MGRILRRGLL	DLMERFDC.I	GDVRCGRLL	GVEIVKDRRT	KEP...ADGL	GAKITRECMN	LGLSMNVQL	PGMGVFRFA	(413)
DAPA_Bacillus	KGERMRKIAL	EAFSDLE.FV	GEYRQVGVFG	AIELVANRDT	KEPLPSEERI	GYQIYKRALA	KGL.....LI	RPLGNVLYFM	(425)
GSA_Salmonella	LTRLAEGLC	EAAQEAGIPL	VNVHVGGMFG	IFFTDAESVTCYQDVM	ACDVERFKRF	FHLMLEEGVY	LAPSAFEAGF	(402)
* * * * *									
ACOAT_Anabaena	PPLIVTEAEI	NTALKLLEKA	LATVTA	(427)					
ACOAT_Levadura	PALTTEDELI	EEGMDAFEKA	IEAVYA	(422)					
OAT_Hombre	PPLVIKEDEL	RESIEIINKT	ILSF	(439)					
ABA_Escherichia	VPLTIEDAQI	RQGLEIISQC	FDEAKQ	(426)					
DGD_Pseudomonas	PPLTVSEDEI	DLGLSLLGQA	IERAL	(438)					
DAPA_Bacillus	PPYIITDEM	QFMIQTKDT	IVQFFEEREG	(465)					
GSA_Salmonella	MSVAHSMDDI	NNTIDAARRV	FAKL	(426)					

Figura 16.- Comparación de la ACOAT cianobacteriana con las proteínas más parecidas a la misma (según el programa TFASTA) aplicando el programa de alineamiento de secuencias PILEUP. Con un asterisco (*) se señalan los residuos conservados en todas las proteínas y en negrita los presentes en, por lo menos, cuatro de las proteínas. Se muestra subrayada la región de unión del piridoxal fosfato. Las abreviaturas de los nombres de las enzimas son las mismas que se utilizan en la Tabla 5.

III.C.5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *argD*

III.C.5.1. Identificación del mRNA en presencia y ausencia de arginina

Para el estudio de la transcripción del gen *argD* y su regulación, se procedió al análisis de su mRNA. Con objeto de determinar la influencia de la presencia de arginina en el medio de cultivo sobre la transcripción del gen *argD*, se aisló RNA total (como se describe en Materiales y Métodos, aptdo. II.C.6) de células de *Anabaena* cultivadas en medio BG11 \pm L-arginina 5 mM. El análisis de estos RNAs se llevó a cabo mediante hibridación de los mismos (aproximadamente 25 μ g), una vez sometidos a electroforesis y transferencia a filtros de nylon (Gene Screen Plus), con el fragmento *EcoRV* de 0,9 kb que contiene la zona 3' del gen (véase Fig. 13). El resultado de las hibridaciones se muestra en la figura 17. La calidad de la transferencia de los RNAs al filtro se controlaba tiñiendo el mismo con una disolución de azul de metileno (ver Materiales y Métodos, aptdo. II.F.3) antes de la hibridación con la sonda marcada con 32 P.

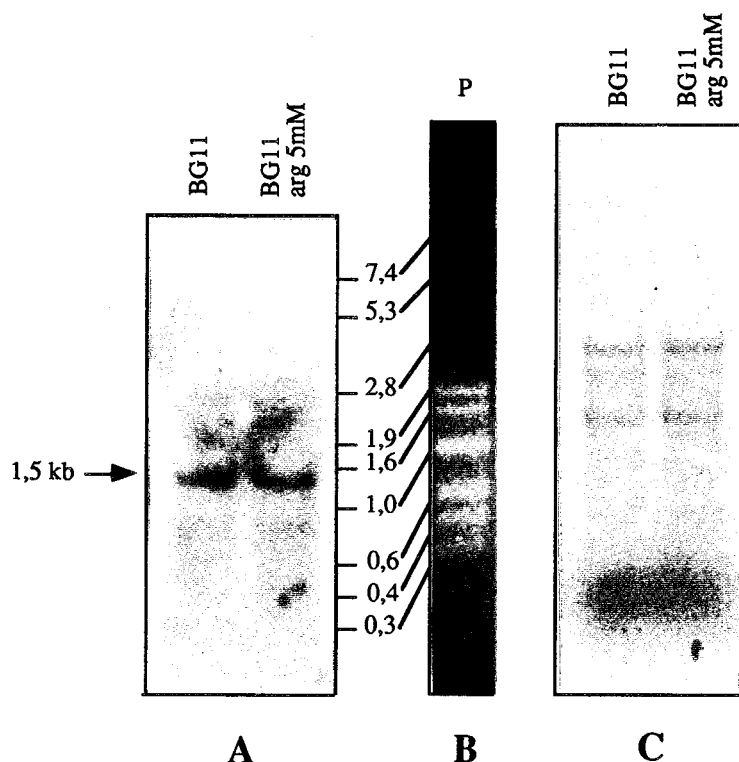


Figura 17.- A. Autorradiografía de la hibridación de RNA total aislado de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas en medio BG11 o BG11 suplementado con L-arginina 5 mM con una sonda del gen *argD*. Se indica la posición de los marcadores utilizados así como su tamaño en kb. B. Patrones de RNA ("RNA molecular weight markers", Boehringer) teñidos con bromuro de etidio. C. Tinción con azul de metileno del filtro de nylon después de la transferencia del RNA y antes de la hibridación.

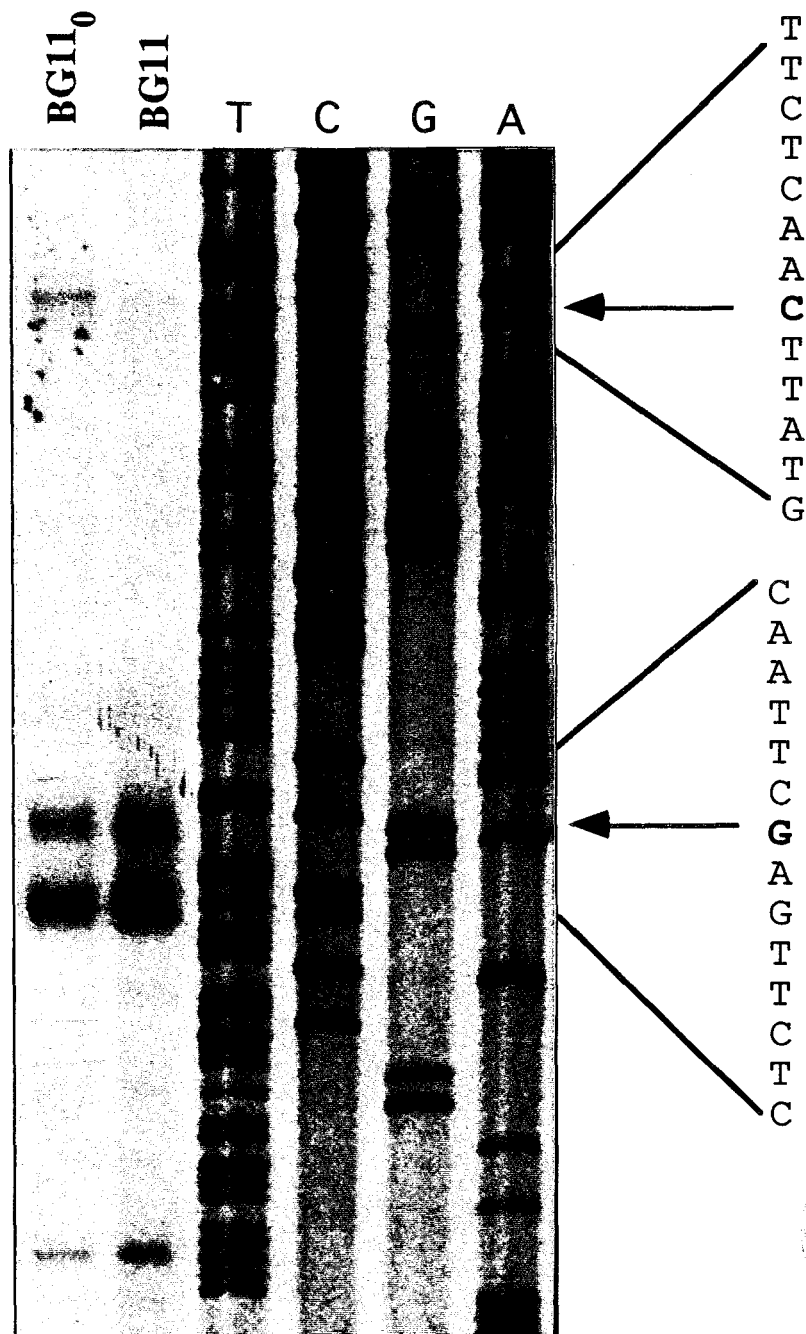


Figura 18.- Autorradiografía de las reacciones de retrotranscripción del mRNA del gen *argD* aislado de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas en medio BG11₀ o BG11. Los posibles nucleótidos +1 de la transcripción de este gen se señalan con flechas.

III.D. SUBCLONACIÓN Y ANÁLISIS DEL GEN AFECTADO EN LA ESTIRPE CS336

III.D.1. SUBCLONACIÓN DEL GEN

El cósmido pCSB336-24 se había aislado originalmente de un exconjugante protótrofo de la estirpe mutante CS336, habiéndose comprobado posteriormente que contenía una copia silvestre del gen mutado en dicha estirpe (véase aptdo. III.B). La subclonación del fragmento de DNA complementante a partir de este cósmido se realizó de igual manera que a partir del cósmido pCSB335-2 (aptdo. III.C.1). Tras la digestión parcial con *Sau3AI* de pCSB336-24, ligación con el vector pRL178 y posterior transformación de *E. coli* RR1, se obtuvieron unas 300 colonias resistentes a Km de las cuales 200 se conjugaron con la estirpe CS336. Sólo dos subclones *Sau3AI* fueron capaces de complementar al auxótrofo. Un mapa de restricción del subclón más caracterizado, pCSB6.A, se muestra en la figura 19.

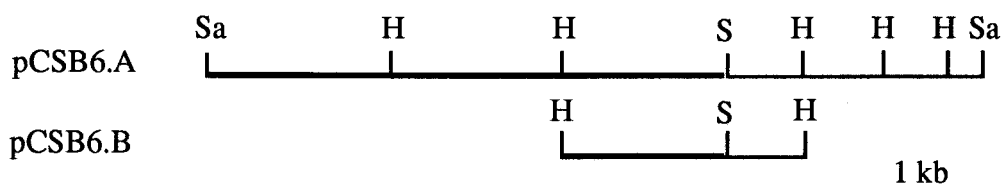


Figura 19.- Mapa de restricción de los insertos de los plásmidos pCSB6.A y pCSB6.B. Con trazo fino se señala el fragmento de DNA perteneciente al vector pDUCA7 (procedente del cósmido pCSB336-24) contenido en estos subclones. Con trazo grueso se indica el DNA procedente de *Anabaena*. El fragmento *HindIII* más pequeño capaz de conferir prototrofia a la estirpe CS336 era el presente en el plásmido pCSB6.B. H, *HindIII*; S, *SalI*; Sa, *Sau3AI*. (Sólo se muestran los sitios *Sau3AI* de los extremos del inserto de pCSB6.1.)

Para localizar el gen silvestre en el subclón pCSB6.A, se realizó una digestión total del mismo con la enzima de restricción *HindIII*. La mezcla de fragmentos obtenida se sometió a ligación y la estirpe de *E. coli* RR1 se transformó exigiendo resistencia a Km (marcador del vector pRL178). De las 620 colonias resultantes de la transformación, 95 se conjugaron con la estirpe CS336, de las cuales 4 portaban un fragmento de DNA capaz de complementar la mutación del auxótrofo. Analizando dichos subclones se comprobó que todos presentaban, entre otros, el fragmento *HindIII* de aproximadamente 3,2 kb contenido en el plásmido pCSB6.B (Fig. 19). Con objeto de obtener una construcción con un mínimo remanente del vector pDUCA7, se transfirió el fragmento

HindIII-SalI de aproximadamente 2,1 kb al vector pBR322. La capacidad de complementación de esta nueva construcción (pCSB6.1) se corroboró mediante conjugación con el auxótrofo CS336.

III.D.2. LOCALIZACIÓN DEL FRAGMENTO COMPLEMENTANTE EN OTROS CÓSMIDOS AISLADOS DE EXCONJUGANTES PROTÓTROFOS

Según el mapa de restricción de la construcción pCSB6.B, el fragmento complementante se localizaba en un extremo del cósmido pCSB336-24. Para comprobar ésto y estudiar la localización del fragmento complementante en los demás cósmidos obtenidos de los exconjugantes protótrofos de la estirpe CS336, se realizó una hibridación de los fragmentos resultantes de digerir los distintos cósmidos con la enzima *HindIII*, usando como sonda el fragmento *HindIII-SalI* de 2,1 kb procedente de la construcción pCSB6.1. El resultado de dicha hibridación se muestra en la figura 20 (A). Como se observa en la figura, el gen silvestre se encuentra contenido en un fragmento *HindIII* de aproximadamente 2,6 kb interno en todos los cósmidos salvo en pCSB336-24 (ver Fig. 6). Se observa también una banda de tamaño superior, probablemente debida a digestión parcial de los cósmidos. El cósmido no complementante pCSB336-23 se incluyó también en este análisis para discernir si la pérdida de la capacidad de complementación del mismo se debía a la pérdida del fragmento portador del gen silvestre. Los resultados obtenidos indicaban la presencia de un fragmento de tamaño igual al silvestre en el cósmido pCSB336-23, lo que sugería que la pérdida de la capacidad de complementación del mismo se habría debido a la adquisición de la copia mutada del gen por recombinación homóloga recíproca entre el cósmido original y el cromosoma de la estirpe CS336.

La presencia de un fragmento *HindIII* de 2,6 kb en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 se comprobó hibridando DNA total de *Anabaena* digerido con la enzima *HindIII* con una sonda interna de dicho fragmento *HindIII* (fragmento *ClaI* de 1,6 kb; ver más adelante). El resultado se muestra en la figura 20 (B).

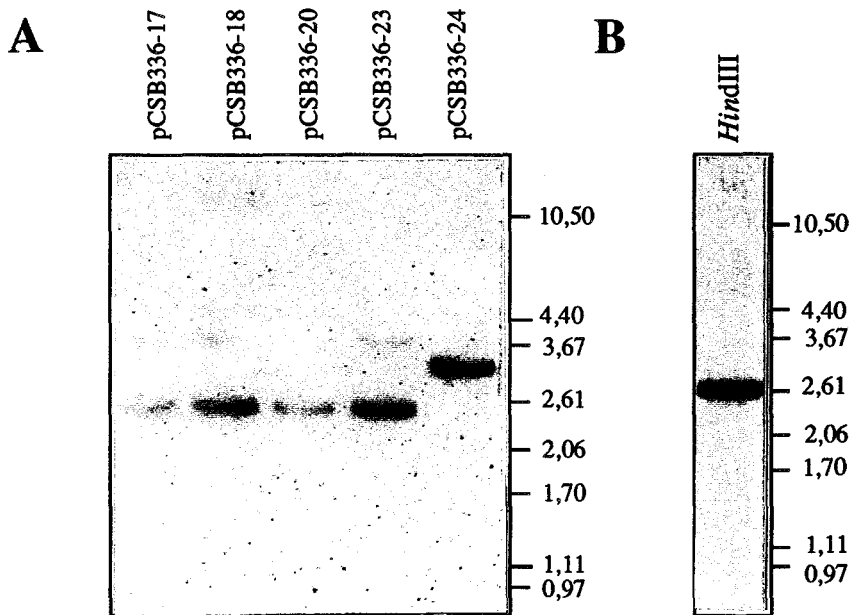


Figura 20.- A. Hibridación de los cósmidos pCSB336-17, pCSB336-18, pCSB336-20, pCSB336-23 y pCSB336-24 digeridos con la enzima *Hind*III usando como sonda el fragmento *Hind*III-*Sal*I de 2,1 kb clonado en pCSB6.1. B. Hibridación de DNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120 digerido con *Hind*III con una sonda interna (de 1,6 kb) del fragmento *Hind*III de 2,6 kb. Se muestra la posición ocupada por los marcadores usados así como su tamaño en kb.

III.D.3. IDENTIFICACIÓN DEL MENOR FRAGMENTO DE DNA CON CAPACIDAD DE COMPLEMENTACIÓN

El cósmido complementante pCSB336-18 se digirió con la enzima *Hind*III y la banda de 2,6 kb que contenía el gen silvestre se aisló y se ligó al vector pRL178, obteniéndose el plásmido pCSB6.3. Un esquema de los distintos subclones obtenidos a partir de este fragmento *Hind*III, así como su capacidad de complementar a la estirpe CS336, se muestra en la figura 21.

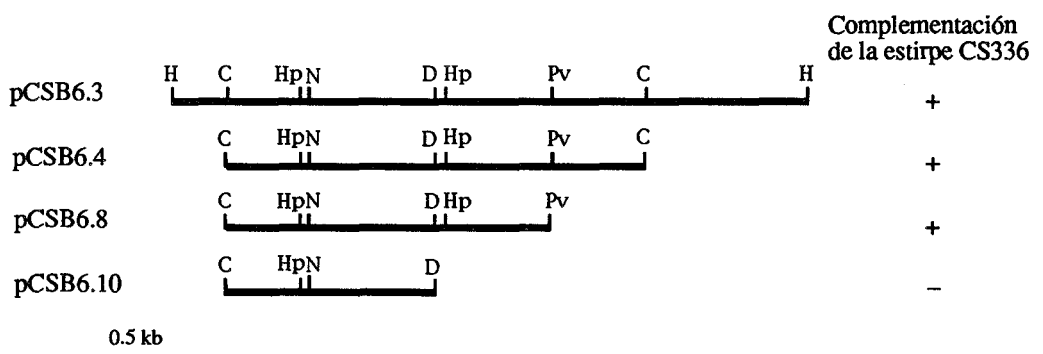


Figura 21.- Mapa de restricción de los insertos de los plásmidos pCSB6.3, pCSB6.4, pCSB6.8 y pCSB6.10 y capacidad (+) o incapacidad (-) de complementación de la estirpe CS336 por los mismos. Los vectores utilizados para estas construcciones fueron: pRL178 (pCSB6.3), pRL538 (pCSB6.4) y pBR322 (pCSB6.8 y pCSB6.10). C, *Cla*I; D, *Dra*I; H, *Hind*III; Hp, *Hpa*I; N, *Nhe*I; Pv, *Pvu*II.

III.D.4. COMPLEMENTACIÓN DE LA ESTIRPE DE *E. coli* W3679 (*argC*⁻)

Se realizaron ensayos de complementación de la colección de auxótrofos de arginina de *E. coli* (salvo del mutante afectado en el gen *argD*) transformando cada uno de ellos con el cósmido pCSB336-24 y los subclones pCSB6.A, pCSB6.B, pCSB6.1, pCSB6.3, pCSB6.4, pCSB6.8 y pCSB6.10. Se ensayó el crecimiento de los transformantes en medio mínimo M9 suplementado con el antibiótico marcador de cada vector y con los requerimientos de cada estirpe salvo el aminoácido L-arginina. El cósmido y todos los subclones, salvo pCSB6.10, eran capaces de conferir prototofía a la estirpe de *E. coli* W3679, afectada en el gen *argC*, el cual codifica la enzima N-acetilglutamato-5-semialdehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.38). De esta manera se identificó el gen clonado por complementación de la estirpe CS336 como *argC*. El hecho de que el subclón pCSB6.10 (ver Fig. 21) no complementase la función *argC* en *E. coli*, como tampoco lo hacía en CS336, nos sugirió que el gen cianobacteriano no se encontraba completo en dicho fragmento.

III.D.5. SECUENCIACIÓN DEL GEN *argC* DE *Anabaena* sp. PCC 7120

El fragmento *Cla*I de 1,6 kb que contenía el gen *argC* se transfirió al vector pUC18. Se obtuvieron construcciones con el fragmento insertado en las dos orientaciones posibles, como se detalla en Materiales y Métodos, denominándose a una de ellas pCSB6.7A y a la otra pCSB6.7B. La capacidad de complementación de estas construcciones se ensayó en el mutante de *E. coli* W3679, resultando positiva en ambos casos. Las dos construcciones se sometieron a digestión con la exonucleasa III con objeto de obtener los fragmentos delecionados necesarios para secuenciar el gen *argC*. En la figura 22 se muestran los fragmentos delecionados utilizados en la secuenciación, así como su capacidad de complementar a la estirpe de *E. coli* W3679.

Utilizando los fragmentos obtenidos y el plásmido pCSB6.2 (ver Materiales y Métodos), se secuenció un fragmento de 1.828 nucleótidos. Sometiendo la secuencia obtenida a un programa de análisis de secuencias de DNA (DNA Strider versión 1.1), se encontró una ORF de 968 nucleótidos y una segunda ORF incompleta a 56 nucleótidos del extremo 3' de la anterior. En la figura 23 se muestra la estrategia de secuenciación del fragmento y la localización de las ORFs encontradas.

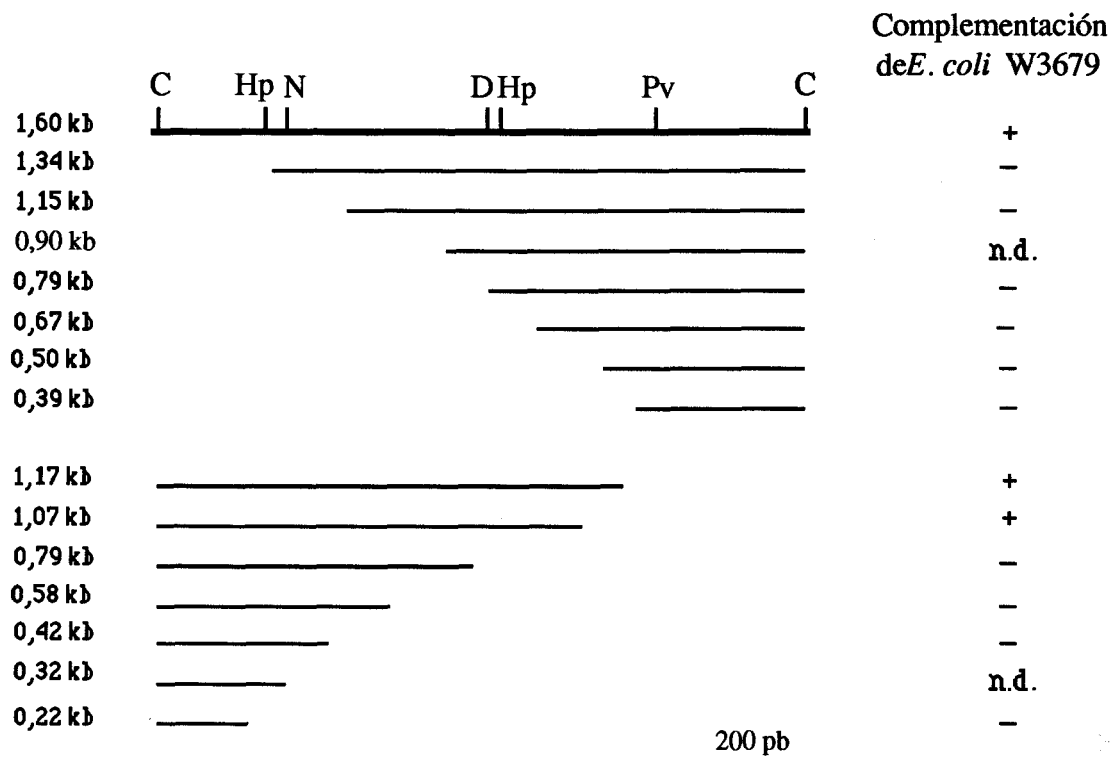


Figura 22.- Fragmentos de DNA obtenidos mediante delección del fragmento *Cla*I de 1,6 kb. A la izquierda se indican los tamaños de los diferentes fragmentos. A la derecha se indica la capacidad (+) o incapacidad (-) de complementación de *E. coli* W3679 de cada fragmento; n.d.: no determinado. C, *Cla*I; D, *Dra*I; Hp, *Hpa*I; N, *Nhe*I; Pv, *Pvu*II.

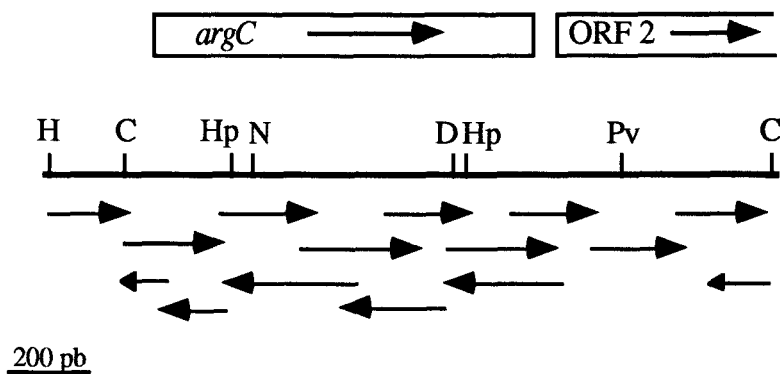


Figura 23.- Estrategia de secuenciación del fragmento *Hind*III-*Cla*I de 1,8 kb. Se muestra la localización, en el fragmento secuenciado, de la ORF correspondiente al gen *argC* y de la ORF 2. C, *Cla*I; D, *Dra*I; H, *Hind*III; Hp, *Hpa*I; N, *Nhe*I; Pv, *Pvu*II.

En la figura 24 se muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento *Hind*III-*Cla*I secuenciado, así como las secuencias de aminoácidos correspondientes al gen *argC* y a la ORF 2.

En la figura 24 se señala una posible secuencia de unión del ribosoma (5'TGAAG3') localizada a 5 nucleótidos del primer codón (ATG) del gen *argC*. Esto, junto con el hecho de que el fragmento *ClaI*, clonado en distintos vectores y diferentes orientaciones, complementase a la estirpe de *E. coli* W3679 (*argC*⁻), apoyaba que ese codón fuera el inicio del gen cianobacteriano. En el extremo 5' de la segunda ORF no aparecen secuencias evidentes para la unión del ribosoma; esta falta de secuencias Shine-Dalgarno se ha observado en otros genes de *Anabaena* (Curtis y Haselkorn, 1984; Nierzwicki-Bauer *et al.*, 1984; Curtis, 1987). La expresión del gen *argC* en *E. coli* podría tener lugar utilizando las posibles secuencias promotoras -10 (5'TAAAAT3') y -35 (5'TTTATT3') señaladas también en la figura (ver aptdo. III.D.7). En el extremo 3' del gen se encuentra una repetición invertida capaz de formar un lazo en el mRNA, con una energía libre de formación de -7,7 kcal/mol, cuya estructura se muestra en la figura 25. Dicha estructura, que no parece corresponder a un terminador de la transcripción independiente de Rho, podría estar implicada en la estabilización del mRNA o forzar una pausa en la transcripción por parte de la RNA polimerasa.

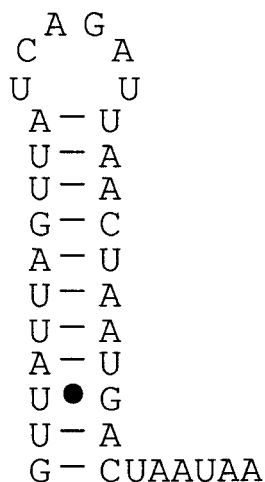


Figura 25.- Estructura de la region 3' del mRNA del gen *argC* con posible función de estabilización del mRNA o de pausa o terminación de la transcripción.

Solapando con esta estructura, en la figura 24 se señala la presencia de siete repeticiones directas imperfectas de una secuencia de siete nucleótidos cuyo consenso es 5'CTAATGA3'. La función de esta secuencia se desconoce. Dos de las repeticiones solapan con el inicio de la segunda ORF presente en el fragmento secuenciado.

III.D.6. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA ArgC

La proteína resultante de traducir la ORF correspondiente al gen *argC* está compuesta por 322 aminoácidos y tiene un peso molecular de 34.800. La comparación con las proteínas presentes en los bancos de datos disponibles confirmó la identidad de la proteína codificada por el gen secuenciado como ArgC, al presentar la mayor similitud con las proteínas ArgC de *E. coli* (Parsot *et al.*, 1988), *Bacillus subtilis* (Smith *et al.*, 1990), *Streptomyces clavuligerus* (Ludovice *et al.*, 1992) y el extremo C-terminal del producto del gen *ARG5,6* de *Saccharomyces cerevisiae* (Boonchird *et al.*, 1991). El gen *ARG5,6* de levaduras es nuclear y codifica un polipéptido cuyo extremo N-terminal es homólogo a la proteína ArgB de *E. coli* y el C-terminal a la proteína ArgC del mismo organismo. Durante su transporte al interior mitocondrial, dicho polipéptido se escinde dando lugar a las dos proteínas mencionadas homólogas a ArgB y ArgC respectivamente. En la Tabla 6 se recogen los porcentajes de identidades, obtenidos mediante el programa TFASTA, de la proteína ArgC de *Anabaena* con las otras proteínas ArgC cuyas secuencias se encuentran disponibles en la actualidad.

Tabla 6.- Homología de las proteínas ArgC de los organismos considerados con la proteína ArgC de *Anabaena* sp. PCC 7120. Se indica el porcentaje de residuos idénticos que se encuentran en los solapamientos del número de aminoácidos indicado, según el programa TFASTA.

PROCEDENCIA	%IDENTIDADES	SOLAPAMIENTO
<i>E. coli</i>	30,4	148 aa
<i>Bacillus subtilis</i>	24,1	228 aa
<i>Saccharomyces</i>	32,6	178 aa
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	26,4	163 aa

En la figura 26 se muestra el alineamiento de la proteína ArgC de *Anabaena* con las N-acetilglutamil-5-semialdehido deshidrogenasas conocidas, aplicando el programa PILEUP de alineamiento de secuencias.

		*	*	*					
B. subtilis	MKIGIVG	ATGYGGTEL V	RILSHHPHAE	ECILYSSS..	.GEGNVYSEG	(44)			
E. coli	MLNLTIVG	ASGYAGAE LV	TYVNRHPHMN	ITALTVSAQS	NDAGKLISDL	(48)			
S. clavuligerus	MTVRVAVAG	ASGYAGGE VV	RLLLGHPAES	WVALTAFSQA	GQAV.....G	(44)			
S. cerevisiae	PGRVALIG	ARGYTGNL V	SLINGHPYLE	VAHVSSRELK	GQKLQDYTKS	(587)			
Anabaena	MNKPKIFIDG	EAGTTGLQ IY	SRLNERDDIE	LVSIAASKRK	D.....	(41)			
				*					
B. subtilis	YPHLTGLADQ	QLKPI.DMNT	IK.HEIDIMF	LAAPP GVSS	LTP..KLADA	(90)			
E. coli	HPQLKGIVDL	PLQPMSEISE	FS.PGVDVVF	LATAHEV SHD	LAP..QFLEA	(95)			
S. clavuligerus	HPhLGpVAGR	VFEPIGMSAQ	APLAGHDVVF	LALPPA QSAA	LAE..E.AGA	(91)			
S. cerevisiae	EIIYESLQIQ	DIRKLEEQN.AVDFWV	MALPN KVCEP	FVETIQSVHG	(632)			
AnabaenaADERA	KLLNSVDVAI	LCLPDDA ARE	AVSLVN..SS	(74)			
				*	**	*			
B. subtilis	GITVIDLSGD	LRIKEPAEYE	KWYKRTAAPK	AVIQEAVYGL	AELN..QLQ..	(137)			
E. coli	GCVVFDLSGA	FRVNDATFYE	KYYGFTHQYP	ELLEQAAYGL	AEWC..GNK..	(142)			
S. clavuligerus	RVVDNRMGAD	FRLRDAGVWE	RFYG.....S	PWRGCWPYGL	PESP.GAREA	(135)			
S. cerevisiae	KSKIIDLSDA	HRFVSESDW.AYGL	PELN.D.RAK	(663)			
Anabaena	QVKILDASTA	YRTAQG....WVYGF	PEMMPGQREK	(105)			
				*	**	*			
B. subtilis	IQOAKLIANP	GCFPTAVLLG	LAPLAQKKLL	D.ESFVIVDA	KTGVSGAGRK	(186)			
E. coli	LKEANLIAVP	GCIPTAAQLA	LKPLIDADLL	DLNQWPVINA	TSGVSGAGRK	(192)			
S. clavuligerus	LAGARRIAVP	GCIPTAVTLA	LFPAVGAGLV	DRE...VVTA	VSGTSGAGRA	(182)			
S. cerevisiae	IANAAKIANP	GCIYATGSQLT	ISPLTKY...	.INGLPTVFG	VSGYSGAGTK	(709)			
Anabaena	IANAQFVSNP	GCIPTGFLAC	VRPLIAQGIL	PSSFPIITINA	VSGYSGGGKS	(155)			
		△		*	*	*			
B. subtilis	ASMGTH....	...FSELNDN	FKIYKV.NEH	QHTPEIE QA.	LNEWQPGLGP	(227)			
E. coli	AAISNS....	...FCEV..S	LOPYGV.FTH	RHPEI ATH.	LG.....AD	(225)			
S. clavuligerus	LKPHLL....	...GAEVMGS	VSPYAV.GGT	RHTPEI AQNS	TAVTDGEPVS	(224)			
S. cerevisiae	PSPKND....	...PKFLNNN	LIPYAL.SDH	IHEREI SARI	GH.....N	(744)			
Anabaena	LIQKYDSFHE	QQKGATSDYP	FGIYGLQFGH	KHVKE MHQHSGLASP	(200)			
				*	*	*			
B. subtilis	ITFSAHLFPM	TRGIMATMYT	RLTC..D.LT	ADDLHDLYSE	FYQDSYFVRV	(274)			
E. coli	VIFTPHLGNF	PRGILETITC	RLKS..G.VT	QAQVAQVLQQ	AYAHKPLVRL	(272)			
S. clavuligerus	VSFTPLLAPM	PRGILATCSA	RLTP..G.TR	RQVRAGLTKK	TYADEPFVSL	(271)			
S. cerevisiae	VAFMPHVGQW	FQGISLTVSI	PIKK..GSL	IDEIRKLYRN	FYEDEKLHVH	(792)			
Anabaena	PLFIPAVGDF	EQGMLVQIPL	PLWTLDNPPS	GEEIHQAIAQ	YYQGEKFFVQV	(250)			
				*	*	*			
B. subtilis	RP.....	KGQYPQTKEV	YGSNFCDI.A	VTLDETRNV	TIVSVIDNLM	(315)			
E. coli	YD.....	KG.VPALKNV	VGLPFCDI.G	FAVQG..EHL	IIVATEDNLL	(310)			
S. clavuligerus	AA.....	GGRV.ALDGF	DGLRSAHI.V	V...DRRRV	VKARDRDNLT	(308)			
S. cerevisiae	ID.....	D..IPLVKDI	EGTHGVVIGG	FKLNDADR	VVCATIDNLL	(832)			
Anabaena	APFKDPSLLR	DGTFLDATAV	NGTNIVQVFV	FG.NDNTKEA	LLVARLDNLG	(299)			
				*	*	*			
B. subtilis	KGAAG..QAV	QNFNLMNGWN	EETGLTITPI	YP	(345)				
E. coli	KGAAA..QAV	QCANIRFGYA	ETQSLI		(334)				
S. clavuligerus	KGAAGRRRPL	QSMNLALGLP	ETTGLPRTGL	AP	(340)				
S. cerevisiae	KGAAT..QCL	QNINLAMGYG	EYAGIPENKI	IGV	(863)				
Anabaena	KGASG..AAV	QNLNIMLGLP	EELGL		(322)				

Figura 26.- Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína ArgC de diferentes organismos mediante el programa de alineamiento de secuencias PILEUP. La secuencia de *Saccharomyces* comprende la región C-terminal (del aminoácido 587 al 863) del producto del gen ARG5,6. Los residuos idénticos en las cinco proteínas se señalan con un asterisco (*) y los idénticos al menos en tres de ellas en negrita. La cisteína asignada al sitio activo de la enzima se señala con el símbolo △ (Parsot *et al.*, 1988).

La enzima N-acetilglutamato-5-semialdehido deshidrogenasa (ArgC) lleva a cabo la reducción del N-acetilglutamato-5-fosfato según la siguiente reacción:



En la comparación entre las proteínas ArgC de los diferentes organismos presentada en la figura 26 cabe señalar la notable conservación de aminoácidos que se observa alrededor del residuo de cisteína (Cys-117 en la proteína de *Anabaena*) asignado al sitio activo de la enzima. Además, aparecen otras tres zonas destacables por su conservación en todas las proteínas comparadas que tienen características de interés como se describe a continuación. (a) La región amino terminal de las proteínas ArgC muestra similitud con las secuencias de la aspartato semialdehido deshidrogenasa de *S. cerevisiae* y *Streptococcus mutans*, la malato deshidrogenasa de *E. coli* y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de *Mesembryanthemum crystallinum* (Ludovice *et al.*, 1992). (b) Analizando la proteína ArgC de *Anabaena* mediante el programa MOTIFS se detectó una región (del aminoácido 147 al 155) reconocible como un sitio de unión de ATP/GTP conocido como "motivo A" (Walker *et al.*, 1982) o "P-loop" (Saraste *et al.*, 1990), cuya secuencia consenso es [AG]-X(4)-G-K-[ST]. Esta zona está conservada también en las demás proteínas ArgC. (c) En la región carboxi-terminal de la enzima cianobacteriana se encuentra una secuencia de aminoácidos similar a la encontrada en sitios de unión de NAD/NADP de algunas enzimas (Scrutton *et al.*, 1990), cuyo consenso es G-X(1)-G-X(2)-[AG]-X(3)-A-X(6)-G. Esta secuencia se encuentra en la tercera zona de gran conservación de las proteínas ArgC comparadas. Las posibles funciones de estas regiones se discuten en el apartado IV.C.1 (Discusión).

El análisis con el programa TFASTA de la secuencia de aminoácidos resultante de traducir el fragmento secuenciado de la ORF 2 mostró que la proteína codificada presentaba un 56,3% de identidad, en un solapamiento de 174 aminoácidos, con el producto de una ORF de *E. coli* (o389) presente en la región intergénica de los genes *rfe* y *rffD* (Daniels *et al.*, 1992). Estos genes participan en la síntesis de un antígeno enterobacteriano (ECA, "Enterobacterial Common Antigen"; Nikaido y Vaara, 1987), que consiste en repeticiones múltiples de tres polisacáridos unidos a un residuo de fosfatidilglicerol anclado en la

membrana. La función de la proteína de 43,6 kDa codificada por *o389* se desconoce, si bien se la supone implicada en la biosíntesis de lipopolisacáridos de la membrana externa de *E. coli*.

III.D.7. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *argC*

III.D.7.1. Identificación del mRNA en presencia y ausencia de arginina

Para el estudio de la expresión del gen *argC* en *Anabaena* sp. PCC 7120 se procedió al aislamiento de RNA total como se describe en Materiales y Métodos. Tras someter a electroforesis en agarosa aproximadamente 25 μ g de RNA, éste se transfirió a filtros de nylon (Hybond-N⁺) y se hibridó con el fragmento *Hpa*I de 0,6 kb interno del gen *argC* (ver Fig. 23). La posible influencia de la presencia de arginina en el medio de cultivo sobre la transcripción del gen se analizó mediante hibridación de RNA aislado de células cultivadas en medio BG11 en presencia o ausencia de L-arginina 5 mM. En la figura 27 se muestra el resultado de este análisis.

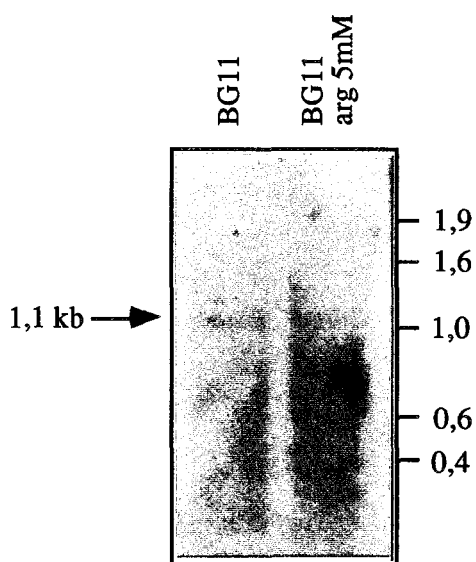


Figura 27.- Autorradiografía de la hibridación de RNA total aislado de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas en medio BG11 y BG11 + L-arginina 5 mM con una sonda del gen *argC*. Se muestra la posición de los marcadores ("RNA molecular weight markers", de Boehringer) y su tamaño en kb.

Como se observa en la figura 27, el gen *argC* se transcribe en *Anabaena* sp. PCC 7120 como un mRNA monocistrónico (tamaño aproximado 1,1 kb, siendo el de la ORF que lo codifica de 968 bases), y su transcripción no parece afectarse por la presencia de arginina en el

medio de cultivo. Cabe hacer mención a la dificultad que supuso el conseguir visualizar el mRNA de este gen en comparación con el del gen *argD*, lo cual probablemente sea debido a una menor transcripción del gen *argC* o una mayor inestabilidad de su mRNA.

III.D.7.2. Expresión del gen *argC* de *Anabaena* en *E. coli*

La capacidad de los distintos subclones del cósmido pCSB336-18 de complementar a la estirpe de *E. coli* W3679 (aptdo III.D.4) parecía indicar que la expresión del gen *argC* de *Anabaena* contenido en los mismos tenía lugar a partir de secuencias cianobacterianas capaces de actuar como un promotor en *E. coli*. Para intentar verificar esta hipótesis, se construyó el plásmido pCSB6.11 en el que el fragmento *Cla*I de 1,6 kb conteniendo el gen *argC* se clonó en el vector pDUCA7 (ver Materiales y Métodos, aptdo. II.C.2). Un esquema de pCSB6.11 se presenta en la figura 28, destacándose la presencia de un terminador de la transcripción (T_0), procedente del fago T7, que impide la transcripción del fragmento de DNA de *Anabaena* clonado a partir de promotores del vector.

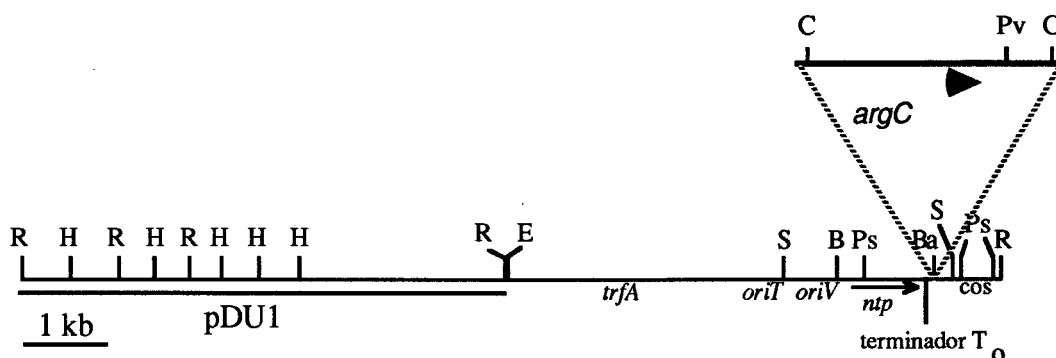


Figura 28.- Mapa de restricción del plásmido pCSB6.11. B, *Bgl*II; Ba, *Bam*HI; C, *Cla*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; Ps, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; R, *Eco*RV; S, *Sal*I.

El plásmido pCSB6.11 fue capaz de complementar a la estirpe de *E. coli* W3679, lo que corroboraba que la transcripción del gen *argC* se llevaba a cabo en la enterobacteria a partir de secuencias

cianobacterianas que podrían ser reconocidas como un promotor por la RNA polimerasa de *E. coli* (ver Discusión, aptdo. IV.D).

III.D.7.3. Determinación del inicio de la transcripción en *Anabaena*

Para definir la región promotora del gen *argC*, se determinó el inicio de la transcripción del mismo utilizando RNA total aislado de células cultivadas en medio BG11₀ (condiciones de fijación de N₂) y BG11. Como cebador se utilizó el oligonucleótido de 20 residuos, 5' TCTGTAAGCCTGTAGTCCC 3', situado a 35 nucleótidos del inicio del gen dentro del mismo. Las reacciones de retrotranscripción se llevaron a cabo utilizando 50 µg de RNA y entre 0,1 y 0,2 µg del oligonucleótido marcado en su extremo 5' con ³²P. En la figura 29 se muestra el resultado de las reacciones de retrotranscripción, señalándose el nucleótido +1 de la transcripción del gen *argC*, que era el mismo en las células procedentes de los dos tipos de cultivos.

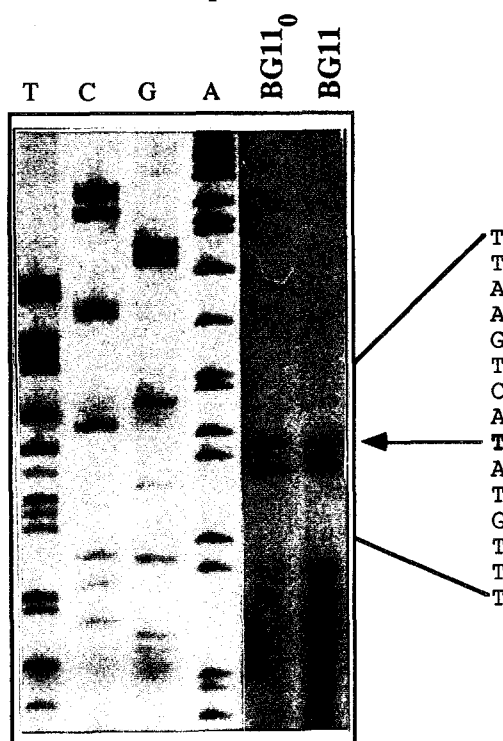


Figura 29.- Autorradiografía de las reacciones de retrotranscripción del mRNA del gen *argC* aislado de células de *Anabaena* sp. PCC 7120 cultivadas en medio BG11 y BG11₀. El nucleótido +1 de la transcripción de este gen se señala con una flecha.

Según el resultado mostrado en la figura 29, y como se discutirá en el apartado IV.D (Discusión), la región promotora del gen *argC* en células vegetativas de *Anabaena* sp. PCC 7120 sería la siguiente:

próximos en el cromosoma de *Anabaena* sp. PCC 7120. Para intentar confirmar este hecho, los fragmentos resultantes de digerir los cósmidos pCSB336-17, pCSB336-18, pCSB336-23 y pCSB336-24 con la enzima de restricción *Hind*III se hibridaron con un fragmento de DNA que contenía el inserto del cósmido pCSB335-2 más 0,75 kb del vector pDUCA7. (Para aislar esta sonda, el cósmido pCSB335-2 se digirió con las enzimas *Sph*I y *Sal*I y el fragmento conteniendo el inserto se aisló de un gel de agarosa de bajo punto de fusión.)

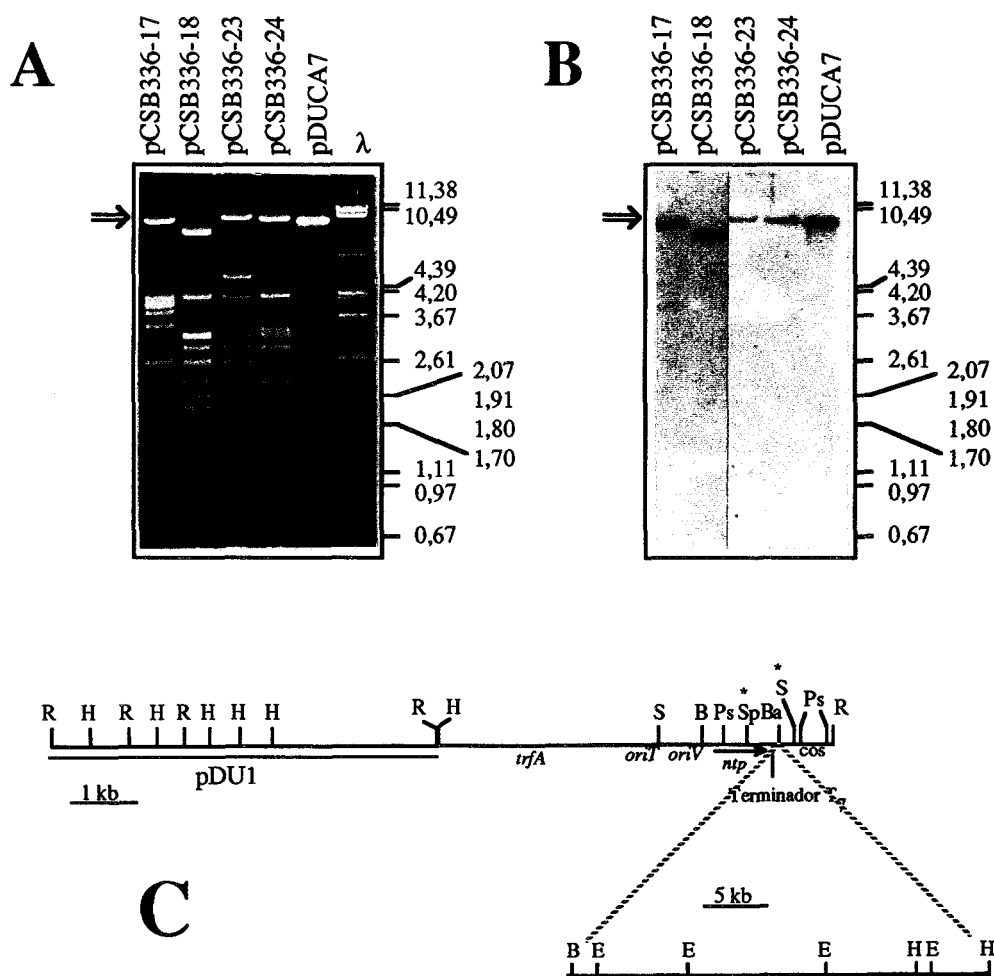


Figura 31.- A. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de restricción obtenidos al digerir con *Hind*III los cósmidos pCSB336-17, pCSB336-18, pCSB336-23 y pCSB336-24 y el vector pDUCA7. Los fragmentos que mostraron hibridación con la sonda de pCSB335-2 se señalan con una flecha. B. Autorradiografía de la hibridación del DNA mostrado en A utilizando como sonda un fragmento del cósmido pCSB335-2 que contenía el inserto de DNA de *Anabaena* y 0.75 kb del vector. C. Esquema del cósmido pCSB335-2. El fragmento de DNA cromosómico de *Anabaena* sp. PCC 7120 clonado en el vector pDUCA7 se muestra con trazo grueso. Los sitios *Sph*I y *Sal*I del vector pDUCA7 utilizados para aislar la sonda se señalan con un asterisco (*).

En la figura 31 se observa que sólo mostraron hibridación aquellas bandas de los cósmidos aislados de la estirpe CS336 que contenían el fragmento del vector que estaba presente en la sonda. Ello confirmaba que los insertos de los cósmidos que complementaban a cada mutante no se encontraban próximos en el cromosoma de *Anabaena*. Utilizando como sonda el inserto del cósmido pCSB336-24 en una hibridación con el cósmido pCSB335-2 se obtuvo un resultado similar.

III.F. ESTRUCTURA CROMOSÓMICA DE EXCONJUGANTES DE *Anabaena* CS336

Un aspecto novedoso de los métodos que se han utilizado en este trabajo ha sido el empleo de vectores no replicativos en *Anabaena* en algunas de las conjugaciones cuyo objeto era la complementación de los mutantes auxótrofos.

Para determinar la estructura cromosómica de los exconjugantes de CS336 cuando se transfería un fragmento complementante en un plásmido no replicativo en la cianobacteria, se realizó un estudio con los exconjugantes resultantes de la transferencia de pCSB6.3 (ver Fig. 21) a la estirpe de *Anabaena* mutante. El medio selectivo de la conjugación no contenía Nm en este caso, exigiéndose sólo prototrofia. Así, se podrían obtener tanto exconjugantes que hubieran integrado el plásmido completo en su cromosoma mediante un sólo hecho de recombinación como exconjugantes que hubieran sufrido un doble hecho de recombinación, que implicaría la pérdida del vector y, por lo tanto, la incapacidad de resistir al antibiótico. Se transfirieron 100 de los exconjugantes protótrofos obtenidos a nuevas cajas de medio BG11 y, cuando se generó biomasa suficiente, se les ensayó su capacidad de crecimiento en BG11 suplementado con Nm (25 µg/ml). Se obtuvieron 86 clones capaces de crecer en medio que contenía el antibiótico y 11 que resultaron incapaces de crecer en el mismo medio (los 3 clones restantes dieron sólo unas pocas colonias en BG11+Nm). Se seleccionaron tres exconjugantes de *Anabaena* (B3.17, B3.32 y B3.54) que debían tener el vector integrado en el cromosoma, ya que eran resistentes a Nm, y uno (B3.67) de los que dieron sólo algunas colonias en medio BG11+Nm (lo cual indicaba una heterogeneidad cromosómica en la colonia original). Se cultivaron estos clones durante unas nueve

generaciones en medio líquido con Nm para B3.17, B3.32 y B3.54 y sin Nm para B3.67, procediéndose después al aislamiento de DNA total a partir de los mismos. Tras restricción con *EcoRV* o *EcoRI*, estos DNAs se hibridaron utilizando como sonda el fragmento *ClaI* de 1,6 kb (véase Fig. 23) conteniendo al gen *argC*. En la figura 32 se muestra el resultado de este experimento. Como control se utilizó DNA de la estirpe silvestre digerido con las mismas enzimas.

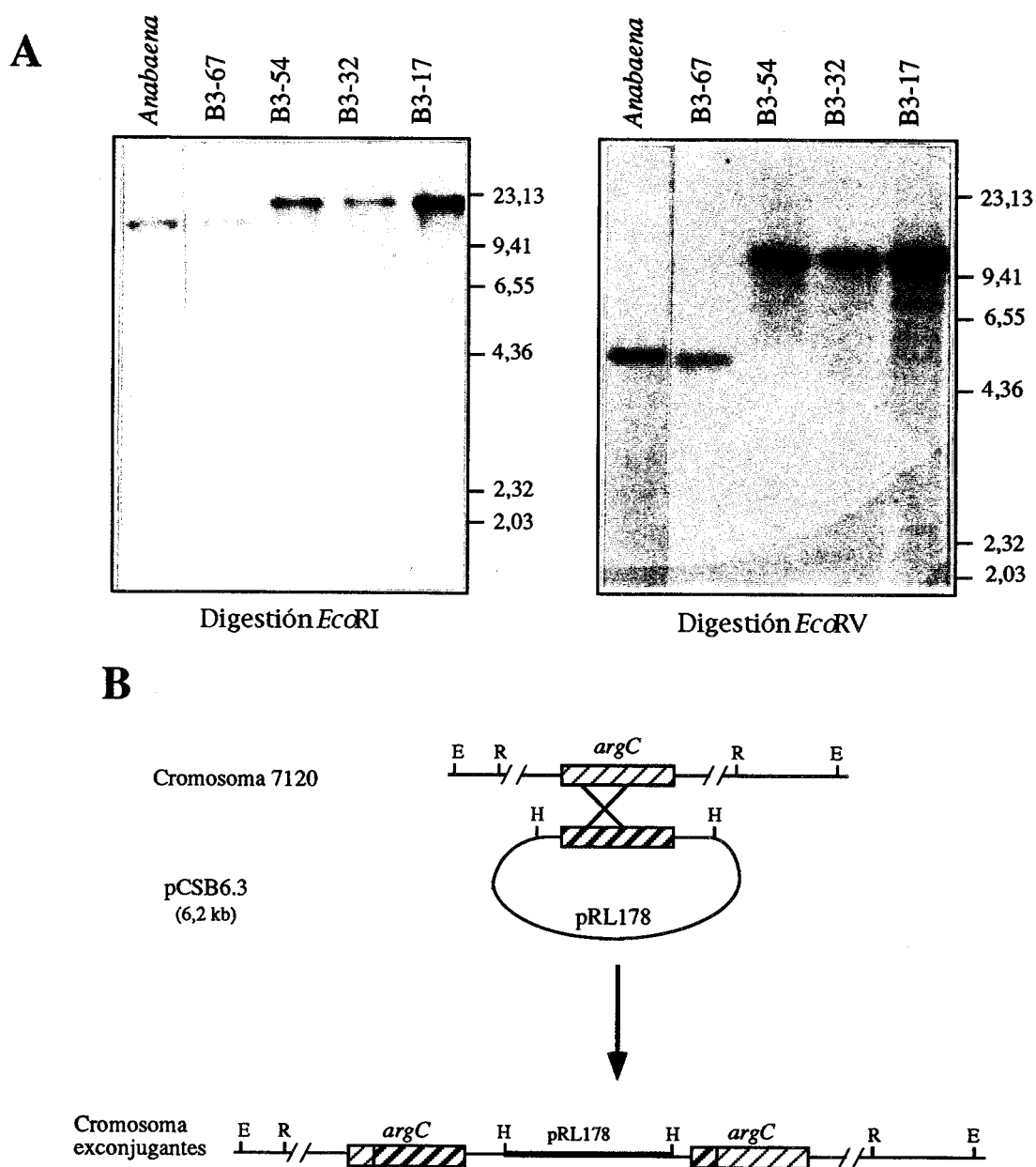


Figura 32.- A. Hibridación de DNA total de *Anabaena* sp. PCC 7120 y de los clones B3.67, B3.54, B3.32 y B3.17, digerido con *EcoRV* o *EcoRI*, utilizando como sonda el fragmento *ClaI* de 1,6 kb conteniendo *argC*. Se indica la posición de los marcadores utilizados así como su tamaño en kb. B. Esquema de la estructura cromosómica de los exconjugantes resistentes a Nm. E, *EcoRI*; H, *HindIII*; R, *EcoRV*.

Como se observa en la figura 32, la estructura cromosómica de los exconjugantes B3.17, B3.32 y B3.54 es la esperada según el fenotipo que mostraban, ya que tienen integrado en el cromosoma un fragmento de DNA que ha de corresponder al plásmido transferido por conjugación (pCSB6.3). A pesar de que el clon B3.67 era capaz de originar colonias resistentes a Nm, en la hibridación no se observa una heterogeneidad de cromosomas en el cultivo, debiendo corresponder su estructura cromosómica a la resultante de un fenómeno de sustitución génica (región mutante del gen *argC* sustituida por la región silvestre aportada por pCSB6.3, sin adición de ningún fragmento de DNA extra). Este clon se cultivó posteriormente en medio BG11 suplementado con Nm, siendo capaz de crecer en este medio. Se aisló DNA total de las células de este cultivo y se repitió el mismo tipo de análisis. En la figura 33 se muestra que los organismos de dicho cultivo presentaban la estructura cromosómica que se genera por integración del plásmido mediante un suceso de recombinación. Por ello, aunque en la hibridación anterior no se detectó, se confirmó que en el cultivo original debían existir algunas células con cromosomas con el vector integrado, que se habrían amplificado tras la selección con Nm. La aparición en cada restricción de una banda de tamaño superior a la observada con los clones B3-54, B3-32 y B3-17 (comparar con los resultados recogidos en la Fig. 32) sugiere la acumulación de varias copias del plásmido pCSB6.3, integradas en tandem en el cromosoma del clon B3.67, tras la selección de resistencia a Nm.

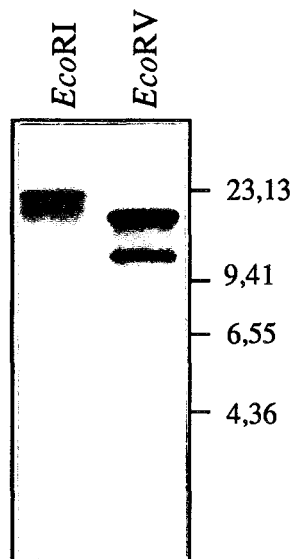


Figura 33.- Hibridación de DNA total del clon B3.67 cultivado en medio BG11 suplementado con Nm, digerido con *EcoRI* o *EcoRV*, utilizando como sonda el fragmento *ClaI* de 1,6 kb conteniendo al gen *argC*. Se indica la posición de los marcadores utilizados así como su tamaño en kb.

Los resultados mostrados en este apartado corroboran que en *Anabaena* sp. PCC 7120 los hechos de doble recombinación son menos frecuentes que la recombinación simple, cuyo resultado es la integración del plásmido transferido y la duplicación en el cromosoma del fragmento de DNA clonado en dicho plásmido (Cai y Wolk, 1990; Golden y Wiest, 1988). Sin embargo, nuestros datos muestran una relación 1:9 en la obtención de dobles recombinantes frente a recombinantes simples, superior a la descrita por Cai y Wolk (1990) en una inactivación del gen *nifD* de *Anabaena*, en la que no encontraron dobles recombinantes entre 200 clones analizados. Además, se ha observado la heterogeneidad cromosómica que puede obtenerse en los exconjugantes si no se facilita un proceso de segregación cromosómica tras transferir a *Anabaena* genes en plásmidos no replicativos en este organismo.

IV. DISCUSIÓN

IV.A. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AUXÓTROFOS DE ARGININA EN *Anabaena* sp. PCC 7120

En esta Tesis se presenta la clonación de dos genes implicados en la biosíntesis de arginina en la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120. La clonación se ha llevado a cabo mediante complementación de dos estirpes, CS335 y CS336, auxótrofas de este aminoácido, obtenidas mediante mutagénesis con luz UV.

Esta técnica mutagénica ha sido empleada con éxito en la obtención de otros mutantes de cianobacterias (Flores y Schmetterer, 1986; Wolk *et al.*, 1988; Martín-Nieto *et al.*, 1990; Vega-Palas *et al.*, 1990). Tras la irradiación, las células deben incubarse en luz amarilla para evitar que el sistema de reparación de DNA por fotorreactivación, presente en cianobacterias, actúe antes de que lo hagan otros sistemas de reparación mutagénicos, y deshaga los dímeros de timina generados por la luz UV. La incubación en oscuridad no es una alternativa válida para organismos fotoautótrofos estrictos. Debido al elevado número de copias del cromosoma que poseen las células de *Anabaena* (Herdman, 1982), es necesario un periodo de expresión relativamente largo en medio no selectivo para permitir la segregación de los cromosomas mutados. Los tratamientos de sonicación para la obtención de filamentos de 2-3 células y la contraselección con penicilina en medio mínimo contribuyen a la segregación de la mutación y al enriquecimiento de la población en filamentos mutantes cromosómicamente homogéneos.

Aplicando este protocolo de generación y aislamiento de mutantes a la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120, se obtuvieron tres estirpes, CS334, CS335 y CS336, que presentaban un requerimiento de arginina para su crecimiento en medio BG11 (medio mínimo). Este requerimiento se satisfacía con una concentración 10 μM de L-arginina en el medio, si bien la estirpe CS334 parecía ser un mutante rezumante, ya que era capaz de crecer, aunque en menor medida ($\mu=0,25 \text{ d}^{-1}$) que la estirpe silvestre ($\mu=0,6 \text{ d}^{-1}$), en medio carente del aminoácido. Cabe señalar la presencia en *Anabaena* sp. PCC 7120 de sistemas de transporte de arginina (Herrero y Flores, 1990), lo que habrá facilitado la recuperación de los auxótrofos al posibilitar la entrada en la célula del aminoácido requerido.

Como se indica en la Introducción de esta Tesis, la biosíntesis de arginina tiene lugar a partir del glutamato mediante ocho pasos

enzimáticos. Los cinco primeros implican intermediarios acetilados para la síntesis de ornitina; la síntesis de arginina a partir de ornitina requiere tres pasos más. Para realizar una primera caracterización de los mutantes obtenidos, se estudió su crecimiento en presencia de los intermediarios de la ruta disponibles. Ninguno de los compuestos acetilados utilizados, N-acetilglutamato y N-acetilornitina, fueron capaces de suplir la auxotrofia de los mutantes. Sin embargo, la adición al medio de ornitina permitió el crecimiento de las estirpes CS335 y CS336 por lo que se estableció que ambos mutantes estaban afectados en la biosíntesis de ornitina. El hecho de que la N-acetilornitina no supliera la auxotrofia de los mutantes CS335 y CS336, que estaban afectados en pasos anteriores a la síntesis de este compuesto, parecía indicar que su transporte al interior celular estaba muy limitado, ya que este intermediario debería ser capaz de permitir el crecimiento de ambas estirpes una vez en el interior de la célula. Esta explicación sería igualmente aplicable para el escaso crecimiento de los mutantes en medios suplementados con argininosuccinato.

Cabe discutir la toxicidad aparente de la L-ornitina para la estirpe CS334, cuyo crecimiento era fuertemente inhibido por concentraciones de este compuesto en el medio de cultivo superiores a 0,1 mM. Esta estirpe parecía estar afectada en la síntesis de citrulina, ya que la adición de este aminoácido al medio de cultivo permitía un crecimiento igual al de la estirpe silvestre. Estas observaciones sugieren que la enzima afectada en la estirpe CS334 podría ser la ornitina carbamiltransferasa, de manera que la adición de ornitina exógena provocaría su acumulación intracelular, lo cual podría dar lugar a un efecto tóxico de la misma o de algún producto de su metabolismo. Hay que señalar que el crecimiento de la estirpe silvestre no se vió afectado por la adición de ninguno de los intermediarios a las concentraciones utilizadas.

IV.B. COMPLEMENTACIÓN DE MUTANTES DE CIANOBACTERIAS

La clonación de genes por complementación de mutantes ha sido un método poco utilizado tanto en cianobacterias unicelulares transformables (Tandeau de Marsac *et al.*, 1982; Kuhlemeier *et al.*, 1984; Vega-Palas *et al.*, 1990) como en cianobacterias filamentosas a las que se puede transferir DNA mediante conjugación con *Escherichia*

coli (Wolk *et al.*, 1988; Buikema y Haselkorn 1991a). La complementación de las estirpes CS335 y CS336 se realizó transfiriéndoles por conjugación una genoteca de *Anabaena* sp. PCC 7120 establecida en *E. coli* (Buikema y Haselkorn, 1991a). Esta misma genoteca ha servido para la clonación por complementación de los genes *hetR* (Buikema y Haselkorn, 1991b), *patA* (Liang *et al.*, 1992) y *patB* (Liang *et al.*, 1993), implicados en la diferenciación o el establecimiento del patrón espacial de los heterocistos en *Anabaena*. Los cósmidos que complementaron a cada estirpe auxótrofa de arginina se aislaron de exconjugantes seleccionados como resistentes a Nm (marcador del vector pDUCA7) y protótrofos. Debido a que la genoteca utilizada no se encontraba individualizada, fue necesario transferir los cósmidos de nuevo a *E. coli* para su amplificación y posterior análisis.

Aunque el vector empleado en la genoteca porta un origen de replicación que le permite mantenerse de forma autónoma en la cianobacteria, no es posible evitar que en los exconjugantes tengan lugar hechos de recombinación entre los insertos de los cósmidos (que son de gran tamaño) y el cromosoma, ya que no se dispone de mutantes de estos organismos afectados en recombinación (Murphy *et al.*, 1990). Mediante recombinación homóloga recíproca puede ocurrir un intercambio de DNA que genere un cósmido portador de la versión mutada del gen afectado en la estirpe estudiada y un cromosoma silvestre, siendo el fenotipo del exconjugante indistinguible de aquellos que no hayan sufrido ningún tipo de recombinación. Ejemplos de este supuesto pueden ser los cósmidos pCSB335-11 y pCSB336-23 que, habiéndose aislado y procesado de igual manera que los demás, no fueron capaces de complementar a las estirpes CS335 y CS336, respectivamente, tras una nueva conjugación. El hecho de que el cósmido pCSB335-11 presentase todos o casi todos los fragmentos de restricción iguales en tamaño a los del cósmido pCSB335-2 (que sí complementó a la estirpe CS335 tras su reintroducción en la misma), y que el cósmido pCSB336-23 tuviera fragmentos de restricción comunes en tamaño con los cósmidos complementantes de la estirpe CS336, apoyaba la interpretación de que la pérdida de la capacidad de complementación habría de deberse a recombinación recíproca con el cromosoma, con la adquisición por los cósmidos de las versiones mutadas de los respectivos genes. En el cósmido pCSB336-23 se comprobó además la presencia del gen *argC* mediante hibridación (ver Resultados, aptdo. III.D.2). Por otra parte, si se permite el crecimiento

de los exconjugantes durante un número suficiente de generaciones, se pueden obtener clones protótrofos resistentes al marcador del vector, pero que hayan perdido la forma autónoma del cósmido, probablemente por integración en el cromosoma. Mediante un hecho de recombinación simple se originaría una integración del cósmido en el cromosoma de *Anabaena*, que daría lugar a un fenotipo indistinguible del de aquellos exconjugantes que portasen el cósmido no integrado. Así, posteriores intentos de conseguir cósmidos complementantes de la estirpe CS335 a partir de exconjugantes independientes procedentes de la complementación original con la genoteca fueron infructuosos, por lo que, aunque no se llegó a analizar los cromosomas de estos exconjugantes empleados en los nuevos aislamientos de plásmidos, su pérdida por integración en el cromosoma parece ser la explicación más plausible.

La subclonación de los genes a partir de los cósmidos complementantes se realizó en plásmidos movilizables por conjugación desde *E. coli* a *Anabaena*, pero que no portaban el origen de replicación cianobacteriano (plásmidos "suicidas"). La recombinación entre el inserto de DNA de *Anabaena* presente en el plásmido transferido y el cromosoma mutado era, por lo tanto, suficiente para corregir la mutación e identificar de esta manera los fragmentos de DNA portadores de la versión silvestre de la secuencia mutada. Este sistema facilitó el proceso de subclonación a partir de los cósmidos pCSB335-2 y pCSB336-24, aunque no asegurase la presencia del gen completo en los fragmentos clonados.

IV.C. GENES DE LA BIOSÍNTESIS DE ARGININA EN *Anabaena* sp. PCC 7120

IV.C.1. IDENTIFICACIÓN DEL GEN *argD* Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA ArgD

El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen afectado en la estirpe CS335 con aquellas disponibles en los bancos de datos permitió la identificación del mismo como *argD*, al presentar la proteína un 40% de residuos idénticos a los de las N-acetilornitina aminotransferasas (ArgD) de *E. coli* y *S. cerevisiae*. Esta enzima lleva a cabo la cuarta reacción en la ruta de

biosíntesis de arginina, convirtiendo el N-acetilglutamil-5-semialdehído en N-acetilornitina mediante una reacción reversible de transaminación. Además de la homología de la proteína ArgD cianobacteriana con las otras proteínas ArgD, el análisis con el programa FASTA puso de manifiesto la existencia de una similitud significativa (alrededor de un 30% de residuos idénticos en solapamientos de unos 400 aminoácidos) de la enzima cianobacteriana con otras aminotransferasas y enzimas dependientes de piridoxal fosfato (ver aptdo. III.C.4), constituyendo todas ellas la clase III de enzimas dependientes de piridoxal fosfato según Bairoch (1992). Es destacable la conservación de aminoácidos existente en torno al residuo de lisina propuesto como sitio de unión del piridoxal fosfato entre las enzimas pertenecientes a este grupo. Según una reciente clasificación, las aminotransferasas pueden dividirse en cuatro grupos en base al grado de similitud de sus estructuras primarias (Mehta *et al.*, 1993). Las acetilornitina aminotransferasas (ACOAT), junto con las ornitina aminotransferasas (OAT), aminobutirato aminotransferasas (ABA), DAPA aminotransferasas (DAPA) y ω -aminoácido aminotransferasas, constituyen el subgrupo II de las aminotransferasas, según dicha clasificación. En el estudio comparativo realizado por Mehta *et al.* (1993), se pone de manifiesto la existencia de cuatro residuos conservados en las secuencias de aminoácidos de las aminotransferasas comparadas, cuyas funciones han sido definidas en la aspartato aminotransferasa (subgrupo I). Estos residuos, que también se encuentran en la ACOAT de *Anabaena*, son los siguientes: G₂₂₂ (numeración de la ACOAT de *Anabaena*), que participa en una curvatura de la proteína; D₂₄₈ (sustituible por un E), implicado en la unión por un puente de H con el N¹ del piridoxal fosfato; K₂₇₇, que formaría una base de Schiff con el piridoxal fosfato; y R₃₉₉, implicado en la unión al grupo α -carboxilato del sustrato mediante un puente de H.

La identificación del gen *argD* cianobacteriano no fue posible realizarla por complementación del auxótrofo de *E. coli* afectado en dicho gen, ya que éste es un mutante rezumante y no fue empleado en los ensayos de complementación. El fenotipo rezumante también lo presentan las estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* con el gen *argD* mutado (Voellmy y Leisinger, 1975). Dicho fenotipo se explica por la inespecificidad de sustrato de la enzima 4-aminobutirato aminotransferasa, que es capaz de generar acetilornitina a partir de N-

acetilglutamato-5-semialdehído, presente en ambos organismos e implicada en la degradación de la arginina mediante la ruta de la arginina descarboxilasa. Cabe señalar que en *Anabaena* (al igual que en *S. cerevisiae* y *N. crassa*; Davis, 1986) la mutación en el gen *argD* no dió lugar a un fenotipo rezumante, lo cual podría explicarse por la ausencia de una 4-aminobutirato aminotransferasa en cianobacterias. De hecho, en estos organismos no parece encontrarse presente la ruta de la arginina descarboxilasa (E. Flores, resultados no publicados).

IV.C.2. IDENTIFICACIÓN DEL GEN *argC* Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA ArgC

La complementación fenotípica de mutantes de *E. coli* es una estrategia que se ha utilizado en la clonación e identificación de un pequeño número de genes cianobacterianos (Tandeau de Marsac y Houmard, 1987). Este procedimiento implica que la proteína codificada por el gen clonado se sintetice en la enterobacteria y sea capaz de suplir la función de la proteína autóctona. La complementación de la estirpe de *E. coli* W3679 permitió la identificación del gen afectado en la estirpe CS336 como *argC*, así como su localización en subclones del cósmido pCSB336-18 para su secuenciación.

La comparación de la secuencia de la proteína codificada por el gen *argC* de *Anabaena* sp. PCC 7120 con las proteínas disponibles en los bancos de datos confirmó la identidad del mismo. Según este análisis, la proteína cianobacteriana presentaba alrededor de un 30% de aminoácidos idénticos con las proteínas ArgC conocidas, si bien la mayor similitud la presentaba con el extremo C-terminal del producto del gen *ARG5,6* de *S. cerevisiae* (un 32,6% de residuos idénticos en un solapamiento de 178 aminoácidos). El alineamiento de la proteína ArgC de *Anabaena* con las otras N-acetilglutamil-5-semialdehído deshidrogenasas (las proteínas ArgC y el extremo C-terminal del producto del gen *ARG5,6*) puso de manifiesto la existencia de zonas de notable conservación entre las enzimas de los diferentes organismos. De hecho, el residuo de cisteína asignado al sitio activo de la enzima (Parsot *et al.*, 1988) se encuentra conservado, junto con los aminoácidos de su entorno, en las proteínas de los diferentes organismos que se han estudiado. Por otra parte, como se indicó en el aptdo. III.D.6, las proteínas ArgC utilizan NADPH como donador de electrones en la reacción de reducción del N-acetilglutamato-5-fosfato (Baich y Vogel,

1962), por lo que deben presentar un dominio de unión del piridín nucleótido. Una región conservada que podría participar en la unión de NADPH se localiza en la zona carboxi-terminal de las proteínas, donde se encuentra una secuencia de aminoácidos similar a la presente en los sitios de unión de $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ de muchas oxido-reductasas (Hanukoglu y Gutfinger, 1989; Scrutton *et al.*, 1990; Floriano *et al.*, 1992). Por otra parte, cercana al residuo de Cys del sitio activo de las proteínas ArgC, aparece una secuencia reconocida por el programa MOTIFS como un dominio característico de sitios de unión de ATP/GTP, denominado "P-loop" ("lazo de unión de fosfato"; Saraste *et al.*, 1990). Dado que no se conoce que la proteína ArgC una ATP o GTP, esta zona, muy conservada en todas las proteínas, podría formar parte del sitio de unión del N-acetilglutamato-5-fosfato. Finalmente, en la región amino-terminal se encuentra una secuencia similar a la presente en otras deshidrogenasas que también emplean piridín-nucleótidos como donadores de poder reductor (Ludovice *et al.*, 1992). El papel preciso de estas diferentes regiones de la proteína ArgC en la unión de sus sustratos está aún por determinar.

IV.C.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA

En el análisis de las secuencias de los fragmentos de DNA que contienen a los genes *argC* y *argD* se pone de manifiesto la existencia de posibles regiones promotoras en los respectivos extremos 5' de los genes (discutidas en el aptdo. IV.D), de secuencias de parada de la RNA polimerasa o terminación de la transcripción (ver aptdos. III.C.3 y III.D.5), así como de cortas secuencias repetidas en el caso del gen *argC*. Detrás del extremo 3' de este gen destaca la presencia de siete repeticiones de un heptanucleótido cuya secuencia consenso es CTAATGA. Una secuencia similar (CAAATGA) se encuentra repetida ocho veces delante del extremo 5' del gen *thrB* de *Calothrix* sp. PCC 7601 (Parsot y Mazel, 1987), cianobacteria que también pertenece a la sección IV de Rippka *et al.* (1979). Se han encontrado heptanucleótidos repetidos, con diferentes secuencias consenso, cercanos a genes implicados en la diferenciación del heterocisto (Holland y Wolk, 1990), en la fijación de dinitrógeno (Mulligan y Haselkorn, 1989) y en el transporte de electrones fotosintético (Kallas *et al.*, 1988) en diferentes cianobacterias. Mazel *et al.* (1990) han caracterizado tres familias de secuencias repetidas de este tipo y han demostrado que son

características de las cianobacterias formadoras de heterocistos. Al igual que se ha especulado para las secuencias palindrómicas repetidas de enterobacterias (Higgins *et al.*, 1982), estos elementos repetidos encontrados en cianobacterias podrían proceder de elementos similares a secuencias de inserción que hubieran quedado en una posición fija en el genomio donde podrían proporcionar alguna ventaja selectiva. Aunque también se ha postulado que estas secuencias pudieran ser sitios de unión de proteínas específicas (Holland y Wolk, 1990; Mazel *et al.*, 1990), su verdadera función es aún desconocida.

IV.C.4. ORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES ESTRUCTURALES

La organización cromosómica de los genes estructurales de la ruta de biosíntesis de arginina no sigue un patrón común en todos los organismos. Así, en *E. coli* los genes *argCBH* (Elseviers *et al.*, 1972) y *carAB* (Bouvier *et al.*, 1984) forman operones mientras que el resto de los genes implicados se encuentran dispersos en el cromosoma (excepto *argE* que se localiza próximo al extremo 5' del operón *argCBH* transcribiéndose en sentido contrario). En *Bacillus subtilis*, siete de los genes (*argC*, *argA*, *argE*, *argB*, *argD*, *cpa* y *argF*) se encuentran agrupados en un fragmento de DNA de 12 kb, mientras que los genes *argG* y *argH* se encuentran en otro locus diferente (Mountain *et al.*, 1986), si bien no se conoce si se organizan o no en operones. Por otra parte, tanto en *Pseudomonas aeruginosa* (Haas *et al.*, 1977) como en *Neisseria gonorrhoeae* (Picard y Dillon, 1989), los genes estructurales de la biosíntesis de arginina se encuentran dispersos en el cromosoma. En cianobacterias, los resultados presentados en esta Tesis permiten sugerir que al menos dos de estos genes se encuentran separados en el cromosoma. Esta afirmación se basa en el hecho de que los cósmidos aislados sólo fueron capaces de complementar la mutación de la estirpe de la que habían sido rescatados, lo que nos indicaba que, al menos los genes *argC* y *argD*, no se encontraban ligados. Esto se corroboró posteriormente mediante hibridación cruzada entre cósmidos conteniendo los genes *argC* o *argD* (ver aptdo. III.E). Además, en los experimentos de complementación de la colección de auxótrofos de *E. coli*, ninguno de los cósmidos fue capaz de complementar ninguna otra mutación, lo que podría ser debido bien a que las mutaciones no fuesen complementables por las enzimas cianobacterianas o bien a que no se encontrasen los genes necesarios en los fragmentos de DNA

introducidos. Mientras que en *E. coli* el gen *argC* es el primero en el operón *argCBH* y en *B. subtilis* este gen se encuentra también en primera posición en un agrupamiento de genes, en *Anabaena* 7120 dicho gen no parece estar ni precedido ni seguido por ningún otro gen estructural de la biosíntesis de arginina, según el análisis del fragmento de DNA secuenciado. De hecho, la ORF que se encuentra a 56 nucleótidos del extremo 3' de *argC* parece corresponder a un gen implicado en la síntesis de algún componente de la pared celular. El análisis de la secuencia del fragmento de DNA que contiene al gen *argD* pone de manifiesto que tampoco existe ninguna ORF flanqueando a este gen.

IV.C.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *argC* Y *argD*

De acuerdo con la información disponible, los organismos procariotas pueden ser divididos en dos grupos según el patrón de regulación de la ruta de biosíntesis de arginina. Así, en aquellas bacterias que utilizan una ruta de biosíntesis de ornitina lineal, es decir, que poseen la enzima N-acetilornitinasasa (producto del gen *argE*) que desacetila la N-acetilornitina dando lugar a L-ornitina y acetil-CoA, la represión de la síntesis de todas, o la mayoría, de las enzimas y la inhibición de la primera enzima de la ruta, N-acetilglutamato sintetasa (codificada por el gen *argA*), por arginina son los principales mecanismos de control de la síntesis de las enzimas de la biosíntesis de arginina. A este grupo pertenecen *E. coli* y *B. subtilis*, organismos en los que se han identificado los genes reguladores, *argR* (Lim *et al.*, 1987) y *ahrC* (North *et al.*, 1989), respectivamente, así como las secuencias de DNA, en las regiones promotoras de los genes regulados, a las que se unen de forma específica las proteínas codificadas por dichos genes reguladores (Cunin *et al.*, 1986; Czaplewski *et al.*, 1992).

El segundo grupo lo forman aquellos organismos que poseen la ornitina acetiltransferasa (el producto del gen *argJ*), de manera que sintetizan ornitina reciclando el grupo acetilo de la N-acetilornitina que se transfiere al glutamato (ver esquema de la ruta en la Introducción). En estas bacterias, la inhibición por arginina de la segunda enzima de la ruta (N-acetilglutamato fosfotransferasa, codificada por el gen *argB*) parece ser el principal mecanismo de regulación de la misma. Los organismos que utilizan este sistema de regulación coinciden con aquellos que poseen la característica de presentar los genes estructurales dispersos en el cromosoma. Las cianobacterias parecen

pertenecer a este segundo grupo de organismos, ya que (1) se ha demostrado la inhibición por arginina de la N-acetilglutamato fosfotransferasa (Hoare y Hoare, 1966) y se han obtenido mutantes superproductores de arginina y citrulina que poseen una forma de esta enzima insensible a la arginina (Wolters *et al.*, 1991), (2) se ha descrito la no represión de la síntesis de las enzimas biosintéticas (Hood y Carr, 1971) y (3) se ha demostrado la presencia de actividad ornitina acetiltransferasa (Hoare y Hoare, 1966). En esta Tesis se ha estudiado la regulación de la expresión de los genes estructurales *argC* y *argD*. Como se muestra en los apartados III.C.5.1 y III.D.7.1, la cantidad de mRNA de dichos genes detectada en células cultivadas en un medio conteniendo L-arginina 5 mM es prácticamente igual a la detectada en células cultivadas en medio sin arginina añadida, lo que corrobora los resultados obtenidos con medidas de actividades enzimáticas previamente descritos.

IV.D. ESTUDIO DE SECUENCIAS PROMOTORAS

A pesar de que en los últimos años se ha determinado el inicio de la transcripción de algunos genes de *Anabaena* sp. PCC 7120, no se han llegado a establecer secuencias consenso para los promotores cianobacterianos. Sin embargo, la comparación de la secuencia de aminoácidos del factor σ principal de la RNA polimerasa de *Anabaena* sp. PCC 7120, deducida del gen *sigA* que codifica para el mismo, con las secuencias de los factores σ^{70} de *E. coli* y σ^{43} de *B. subtilis*, ha puesto de manifiesto la homología que existe entre ellos, especialmente en los dominios involucrados en el reconocimiento de las regiones -35 y -10 de las secuencias promotoras (Brahamsha y Haselkorn, 1991). Esta homología se refleja en el hecho de que la RNA polimerasa purificada de *Anabaena* muestra, en ensayos de inicio de la transcripción *in vitro*, una preferencia por promotores con secuencias -10 y -35 y distancia entre éstas similares a las del promotor consenso σ^{70} de *E. coli* (Schneider *et al.*, 1991). En este contexto, es de interés que las regiones -10 y -35 definidas para los genes *argC* y *argD* muestren una clara homología con las secuencias consenso de promotores σ^{70} de *E. coli*. Cabe recordar que el gen *argC* cianobacteriano es capaz de expresarse en *E. coli* W3679, permitiendo la complementación de la mutación de

esta estirpe, habiendo de disponer, por lo tanto, de un promotor reconocible por la RNA polimerasa de la enterobacteria.

Para una definición más precisa de las secuencias consenso -10 y -35 de los promotores cianobacterianos se ha considerado que sería necesario el estudio de promotores constitutivos. En este sentido, la caracterización llevada a cabo en esta Tesis de los genes *argC* y *argD* de la biosíntesis de arginina en *Anabaena* ha sido de interés. Aunque no se han realizado ensayos de transcripción *in vitro*, según las secuencias promotoras definidas para ambos genes es predecible su reconocimiento por la RNA polimerasa de *Anabaena* con el factor σ principal (SigA). En la Tabla 7 se muestra una comparación de las regiones promotoras de 14 genes de *Anabaena* sp. PCC 7120 (incluidos los caracterizados en esta Tesis), cuyo inicio de la transcripción ha sido determinado. Los genes señalados en la Tabla con un asterisco han sido utilizados en ensayos de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa purificada y/o con extractos de células vegetativas de *Anabaena*, habiéndose confirmado que pueden transcribirse por la RNA polimerasa con el factor σ principal SigA (Schneider *et al.*, 1991). Las secuencias -35 y -10 reflejadas en la Tabla no siempre se corresponden con las elegidas por los autores referidos. Su definición en este trabajo se ha realizado en base a la similitud mostrada con las secuencias de otros promotores de genes de *Anabaena* y a la conservación de una distancia entre ellas dentro de los límites definidos para *E. coli*. La comparación de estas secuencias permite deducir una secuencia consenso para promotores de genes cianobacterianos que han de ser reconocidos por la RNA polimerasa-SigA de *Anabaena* sin el concurso de ningún otro factor. Esta secuencia consenso es muy parecida a la definida para el reconocimiento por la RNA polimerasa- σ^{70} de *E. coli*.

En *Anabaena* existe un amplio número de genes cuyas regiones promotoras -10 se ajustan al consenso TAN₃T pero que no presentan regiones -35 reconocibles. Ejemplos claros de este tipo de promotores son los del operón *rbclS* (codificador de la RuBisCo; Nierzwicki-Bauer *et al.*, 1984) y el promotor I del gen *glnA* (Tumer *et al.*, 1983). Sin embargo, esta falta de secuencias -35 consenso puede deberse a la presencia de secuencias reconocibles por proteínas reguladoras en esta región. Así, se ha descrito la unión *in vitro* a las regiones promotoras del operón *rbclS* y del gen *glnA* de una proteína homóloga al regulador NtcA de *Synechococcus* sp. PCC 7942 (BifA, Wei *et al.*, 1993). Estos genes no se han incluido en la elaboración de la Tabla 7.

En la determinación del inicio de la transcripción del gen *argD* en células cultivadas en condiciones de fijación de N₂ se ha señalado la presencia de un producto de la reacción de retrotranscripción que es menos abundante cuando se realiza la extensión con RNA de células cultivadas con nitrato como fuente de nitrógeno (ver aptdo. III.C.5.2). Cabe la posibilidad de que este segundo inicio sea debido a un artefacto, ya que no se han utilizado otras técnicas como el mapeo con S1 o la transcripción *in vitro* para la confirmación del mismo. Así, por ejemplo, podría ocurrir que una unión inespecífica del cebador utilizado para el análisis del gen *argD* a un mRNA expresado sólo en condiciones de fijación de nitrógeno fuese la responsable de la aparición de este segundo inicio de la transcripción. Sin embargo, este segundo inicio de la transcripción podría corresponder a un promotor específico para la transcripción del gen en condiciones de fijación de dinitrógeno en *Anabaena*, que podría ser activo en los heterocistos. Cabe mencionar que en los heterocistos (diferenciados en estas condiciones) se han descrito mayores actividades de las enzimas de la biosíntesis de arginina que en las células vegetativas (Gupta y Carr, 1981a). El hecho de que en el gen *argC* no se detectara más de un inicio de la transcripción podría deberse a que la baja transcripción del mismo no permitiese que la técnica empleada pusiera de manifiesto la existencia de un inicio de la transcripción específico de los heterocistos. La utilización de más de un promotor se ha descrito para otros genes de *Anabaena* como *glnA* (Tumer *et al.*, 1983), *atpB/E* (Curtis, 1987) y *sigA* (Brahamsha y Haselkorn, 1991), habiéndose detectado para este último un inicio de la transcripción presente sólo en condiciones de ausencia de nitrógeno en el medio. El estudio de las condiciones en las que se utilizan distintos promotores de un mismo gen, y la posibilidad de que algunos de estos promotores se utilice específicamente en los heterocistos, es un campo de gran interés actual en la biología molecular de las cianobacterias filamentosas formadoras de heterocistos.

Tabla 7 .- Comparación de secuencias promotoras de genes de *Anabaena* sp. PCC 7120. Los subíndices en las secuencias consenso indican el porcentaje con el que se encuentra en dicha posición la base señalada entre las secuencias promotoras analizadas. Los asteriscos señalan los genes que han sido utilizados en ensayos de transcripción in vitro. M indica A o C y W indica A o T.

Consenso <i>E. coli</i>	T T G A C a —15/20n— 82 84 78 65 54 45	T A t A a T—5/9n—+1 80 95 45 60 50 96	REFERENCIAS ¹
<i>argD</i>	T T G C C A 16n	T A A T G T 4n C	Esta Tesis
<i>argC</i>	T T T A T T 18n	T A A A A T 5n A	Esta Tesis
* <i>sigAI</i>	G T G C A A 16n	T A C A A T 6n A	Brahamsa y Haselkorn (1991)
* <i>sigAIV</i>	T T G A A A 15n	T A A T G T 5n T	Brahamsa y Haselkorn (1991)
* <i>sigAV</i>	A T G T C A 18n	T A A A A T 6n G	Brahamsa y Haselkorn (1991)
<i>rnpB</i>	C A G A C A 18n	T A C A C T 6n A	Vioque (1992)
<i>cpcB</i>	T T G T A A 15n	T A G C A T 9n A	Belknap y Haselkorn (1987)
* <i>psbA</i>	T A G T A A 17n	T A A A T T 4n G	Curtis y Haselkorn (1984)/Schneider et al. (1991)
* <i>woxA</i>	T T G A T T 18n	T A T G A T 4n C	Borthakur y Haselkorn (1989b)
* <i>petF</i>	T T A T A T 16n	T A G T A T 6n T	Alam et al. (1986)
* <i>atpB/EII</i>	T T G T A A 16n	T A T G A T 9n G	Curtis (1987)
* <i>glnAII</i>	T T G T G C 18n	T A A T G T 7n A	Tumer et al. (1983)
* <i>NII</i>	T T G A C A 17n	T A A T A T 6n A	Schneider y Haselkorn (1988b)
* <i>NIII</i>	T T G A C A 17n	T A A A A T 6n G	Schneider y Haselkorn (1988b)
Consenso <i>Anabaena</i>	T T G W M A —15/18n— 78 86 86 86 78 71	T A A W A T—4/9n—+1 100 100 57 78 64 100	

(1) Los artículos referidos describen la determinación del inicio de la transcripción de cada gen. Las secuencias mostradas como promotoras en la Tabla no siempre coinciden con las elegidas por los autores.

V. CONCLUSIONES

- 1.- Se han obtenido, mediante mutagénesis con luz UV y enriquecimiento con penicilina, dos estirpes auxótrofas de arginina de la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120. Ambas estirpes (denominadas CS335 y CS336) están afectadas en la síntesis de ornitina a partir de glutamato.
- 2.- Se han clonado, mediante complementación de las estirpes mutantes, las versiones silvestres de los genes afectados en los auxótrofos CS335 y CS336. El gen mutado en la estirpe CS336 se ha identificado como *argC* mediante complementación de una estirpe de *E. coli* auxótrofa de arginina afectada en dicho gen.
- 3.- El gen afectado en la estirpe CS335 se ha identificado como *argD* tras su secuenciación y comparación de la proteína codificada por el mismo con las secuencias contenidas en los bancos de datos disponibles. El producto de este gen tiene un peso molecular de 46.110 y es homólogo a las N-acetilornitina aminotransferasas de *E. coli* y *S. cerevisiae*, enzimas codificadas por los genes *argD* y *ARG8*, respectivamente, así como a otras aminotransferasas con las que conserva, entre otras regiones de la proteína, el sitio de unión del piridoxal fosfato, cofactor de estas enzimas.
- 4.- La confirmación de la identidad del gen afectado en la estirpe CS336 se ha obtenido tras su secuenciación y comparación de la proteína codificada por el mismo con las secuencias contenidas en los bancos de datos disponibles. La proteína ArgC cianobacteriana tiene un peso molecular de 34.800 y es homóloga a las correspondientes proteínas ArgC (N-acetilglutamil-5-fosfato deshidrogenasa) de *E. coli*, *B. subtilis*, *S. clavuligerus* y *S. cerevisiae*. La secuencia de aminoácidos que contiene el residuo de cisteína propuesto como sitio activo de la enzima se encuentra conservada en todas las proteínas ArgC comparadas.
- 5.- Los genes *argC* y *argD* no se encuentran cercanos en el cromosoma de *Anabaena*.
- 6.- Se ha analizado la expresión de ambos genes, concluyéndose que ambos se transcriben como mRNAs monocistrónicos y no se regulan por arginina a nivel transcripcional.

7.- Se han determinado los sitios de inicio de la transcripción de los genes *argC* y *argD* en células cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno, lo que ha permitido identificar las posibles regiones -35 y -10 de los promotores de ambos genes, las cuales deben ser reconocibles por la RNA polimerasa de *Anabaena* sp. PCC 7120 con el factor σ SigA.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aiba H., Nagaya M. y Mizuno T.** (1993) Sensor and regulator proteins from the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC 7942 that belong to the bacterial signal-transduction protein families: implication in the adaptive response to phosphate limitation. *Mol. Microbiol.* **8**:81-91.
- Alam J., Whitaker R.A., Krogmann D.W. y Curtis S.E.** (1986) Isolation and sequence of the gene for ferredoxin I from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **168**:1265-1271.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. y Struhl K.** (eds.) (1992) Current protocols in Molecular Biology. Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York.
- Baich A. y Vogel H.J.** (1962) N-acetyl- γ -glutamokinase and N-acetylglutamic- γ -semialdehyde dehydrogenase: repressible enzymes of arginine synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**:491-496.
- Bairoch A.** (1992) Información no publicada recogida en la base de datos PROSITE.
- Bancroft I., Wolk C.P. y Oren E.V.** (1989) Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **171**:5940-5948.
- Belknap W.R. y Haselkorn R.** (1987) Cloning and light regulation of expression of the phycocyanin operon of the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J.* **6**:871-884.
- Bolívar F., Rodríguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W., Crosa J.H. y Falkow S.** (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
- Boonchird C., Messenguy F. y Dubois E.** (1991) Characterization of the yeast *ARG5,6* gene: determination of the nucleotide sequence, analysis of the control region and *ARG5,6* transcript. *Mol. Gen. Genet.* **226**:154-166.
- Borthakur D. y Haselkorn R.** (1989a) Tn5 mutagenesis of *Anabaena* sp. strain PCC 7120: Isolation of a new mutant unable to grow without combined nitrogen. *J. Bacteriol.* **171**:5759-5761.

- Borthakur D. y Haselkorn R.** (1989b) Nucleotide sequence of the gene encoding the 33 kDa water oxidizing polypeptide in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 and its expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol. Biol.* **13**:427-439.
- Bouvier J., Patte J.C. y Stragier P.** (1984) Multiple regulatory signals in the control region of the *Escherichia coli* *carAB* operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4139-4143.
- Brahamsha B. y Haselkorn R.** (1991) Isolation and characterization of the gene encoding the principal sigma factor of the vegetative cell RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **173**:2442-2450.
- Brahamsha B. y Haselkorn R.** (1992) Identification of multiple RNA polymerase sigma factor homologs in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120: cloning, expression, and inactivation of the *sigB* and *sigC* genes. *J. Bacteriol.* **174**:7273-7282.
- Buikema W. y Haselkorn R.** (1991a) Isolation and complementation of nitrogen fixation mutants of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **173**:1879-1885.
- Buikema W. y Haselkorn R.** (1991b) Characterization of a gene controlling heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Genes and Develop.* **5**:321-330.
- Buikema W. y Haselkorn R.** (1993) Molecular genetics of cyanobacterial development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**:33-52.
- Cai Y. y Wolk C.P.** (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.
- Carr N.G.** (1973) Metabolic control and auxotrophic physiology. En *The biology of blue-green algae* (Carr N.G. y Whitton B.A., eds.), pp. 39-65. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra.
- Carr N.G.** (1983) Biochemical aspects of heterocyst differentiation and function. En *Photosynthetic prokaryotes: cell differentiation and function* (Papageorgiou G.C. y Packer L., eds.), pp. 265-280. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, USA.
- Chapman J.S. y Meeks J.C.** (1987) Conditions for mutagenesis of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.* **133**:111-118.

- Chen X.G. y Widger W.R.** (1993) Physical genomic map of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* **175**:5106-5116.
- Chiang G.G., Schaeffer M.R. y Grossman A.R.** (1992) Complementation of a red-light-indifferent cyanobacterial mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9415-9419.
- Cunin R., Glansdorff N., Piérard A. y Stalon V.** (1986) Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**:314-352.
- Curtis S.E.** (1987) Genes encoding the beta and epsilon subunits of the proton-translocating ATPase from *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **169**:80-86.
- Curtis S.E. y Haselkorn R.** (1984) Isolation, sequence and expression of two members of the 32 kd thylakoid membrane protein gene family from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Plant Mol. Biol.* **3**:249-258.
- Czaplewski L.G., North A.K., Smith M.C.M., Baumberg S. y Stockley P.G.** (1992) Purification and initial characterization of AhrC: the regulator of arginine metabolism genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **6**:267-275.
- Daniels D.L., Plunket III G., Burland V. y Blattner F.R.** (1992) Analysis of the *Escherichia coli* genome: DNA sequence of the region from 84.5 to 86.5 minutes. *Science* **257**:771-778.
- Davis R.H.** (1986) Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **50**:280-313.
- Devereux J., Haerberli P. y Smithies O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* **12**:387-395.
- Elhai J. y Wolk C.P.** (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 C.P.** (1988b) Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **167**:747-754.

- Elhai J. y Wolk C.P.** (1990) Developmental regulation and spatial pattern of expression of the structural genes for nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena*. *EMBO J.* **9**:3379-3388.
- Elseviers D., Cunin R., Glansdorff N., Baumberg S. y Ashcroft, E.** (1972) Control regions within the *argECBH* gene cluster of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **117**:349-366.
- Fisher R., Tuli R. y Haselkorn R.** (1981) A cloned cyanobacterial gene for glutamine synthetase functions in *Escherichia coli*, but the enzyme is not adenylylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:3393-3397.
- Fleming H. y Haselkorn R.** (1974) The program of protein synthesis during heterocyst differentiation in nitrogen-fixing blue-green algae. *Cell* **3**:159-170.
- Flores E. y Schmetterer G.** (1986) Interaction of fructose with the glucose permease of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* **166**:693-696.
- Flores E. y Wolk C.P.** (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* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **6**:2085-2094.
- Frías J.E., 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.
- Giovanonni S.J., Turner S., Olsen G.J., Barns S., Lane D.J. y Pace N.R.** (1988) Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**:3584-3592.
- Glazer A.N.** (1984) Phycobilisome: a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta* **768**:29-51.
- Golden J.W. y Wiest D.R.** (1988) Genome rearrangement and nitrogen fixation in *Anabaena* blocked by inactivation of *xisA* gene. *Science* **242**:1421-1423.

- Golden J.W., Robinson S.J. y Haselkorn R.** (1985) Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Anabaena*. *Nature* (London) **314**:419-423.
- Golden J.W., Carrasco C.D., Mulligan M.E., Schneider G.J. y Haselkorn, R.** (1988) Deletion of a 55-kilobase-pair DNA element from the chromosome during heterocyst differentiation of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **170**:5034-5041.
- Golden S.S., Brusslan J. y Haselkorn R.** (1987) Genetic engineering of the cyanobacterial chromosome. *Methods Enzymol.* **153**:215-231.
- Gupta M y Carr N.G.** (1981a) Enzymology of arginine metabolism in heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Letts.* **12**:179-181.
- Gupta M y Carr N.G.** (1981b) Enzyme activities related to cyanophycin metabolism in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena* spp. *J. Gen. Microbiol.* **125**:17-23.
- Haas D., Holloway B.W., Schamböck A. y Leisinger T.** (1977) The genetic organization of arginine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* **154**:7-22.
- Hanahan D.** (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hanukoglu I. y Gutfinger T.** (1989) cDNA sequence of adrenoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* **189**:479-484.
- Haselkorn R.** (1978) Heterocysts. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **29**:311-344.
- Heimberg H., Boyen A., Crabeel M. y Glansdorff N.** (1990) *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* acetylornithine aminotransferases: evolutionary relationship with ornithine aminotransferases. *Gene* **90**:69-78.
- Herdman M.** (1982) Evolution and genetic properties of cyanobacterial genomes. En *The Biology of Cyanobacteria* (Carr N.G. y Whitton B.A., eds.), pp. 263-305. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 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.

- Herrero A. y Wolk C.P.** (1986) Genetic mapping of the chromosome of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. Proximity of the structural genes for nitrogenase and ribulose-bisphosphate carboxylase. *J. Biol. Chem.* **261**:7748-7754.
- Higgins C.F., Ames G.F.-L., Barnes W.M., Clement J.M. y Hofnung M.** (1982) A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* **298**:760-762.
- Hoare D.S. y Hoare S.L.** (1966) Feedback regulation of arginine biosynthesis in blue-green algae and photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol.* **92**:375-379.
- Holland D. y Wolk C.P.** (1990) Identification and characterization of *hetA*, a gene that acts early in the process of morphological differentiation of heterocysts. *J. Bacteriol.* **172**:3131-3137.
- Hood W. y Carr N.G.** (1971) Apparent lack of control by repression of arginine metabolism in blue-green algae. *J. Bacteriol.* **107**:365-367.
- Itikawa H., Baumberg S. y Vogel H.J.** (1968) Enzymic basis for a genetic suppression: accumulation and deacylation of N-acetylglutamate- γ -semialdehyde in enterobacterial mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **159**:547-550.
- 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.
- Kuhleimeier C. J., Logtenberg T., Stoorvogel W., Van Heughten H.A.A., Borrias W.E. y Van Arkel G.A.** (1984) Cloning of nitrate reductase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **159**:36-41.
- Kuritz T., Ernst A., Black T.A. y Wolk C.P.** (1993) High-resolution mapping of genetic loci of *Anabaena* PCC 7120 required for photosynthesis and nitrogen fixation. *Mol. Microbiol.* **8**:101-110.
- Lang N.J., Simon R.D. y Wolk C.P.** (1972) Correspondence of cyanophycin granules with structured granules in *Anabaena cylindrica*. *Arch. Mikrobiol.* **83**:313-320.

- Liang J., Scappino L. y Haselkorn R.** (1992) The *patA* 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.
- Liang J., Scappino L. y Haselkorn R.** (1993) The *patB* gene product, required for growth of the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 under nitrogen-limiting conditions, contains ferredoxin and helix-turn-helix domains. *J. Bacteriol.* **175**:1697-1704.
- Ligon P.J.B., Meyer K.G., Martin J.A. y Curtis S.E.** (1991) Nucleotide sequence of a 16S rRNA gene from *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Nucl. Acids Res.* **19**:4553.
- Lim D., Oppenheim J.D., Eckhardt T. y Maas W.K.** (1987) Nucleotide sequence of the *argR* gene of *Escherichia coli* K12 and isolation of its product, the arginine repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:6697-6701.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
- Ludovice M., Martín J.F., Carrachas P. y Liras P.** (1992) Characterization of the *Streptomyces clavuligerus argC* gene encoding N-acetylglutamyl-phosphate reductase: expression in *Streptomyces lividans* and effect on clavulanic acid production. *J. Bacteriol.* **174**:4606-4613.
- MacKinney G.** (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**:315-322.
- Maldener I., Lockau W., Cai Y. y Wolk C.P.** (1991) Calcium-dependent protease of the cyanobacterium *Anabaena*: molecular cloning and expression of the gene in *Escherichia coli*, sequencing and site-directed mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.* **225**:113-120.
- Markwell M.A.K., Haas S.M., Bieber L.L. y Tolbert N.E.** (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**:206-210.
- Martín-Nieto J., Flores E. y Herrero A.** (1990) Mutants of *Anabaena variabilis* requiring high levels of molybdate for nitrate reductase and nitrogenase activities. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**:1-4.

- Mazel D., Houmard J., Castets A.M. y Tandeau de Marsac N. (1990) Highly repetitive DNA sequences in cyanobacterial genomes. *J. Bacteriol.* **172**:2755-2761.
- Mehta P.K., Hale T.I. y Christen P. (1993) Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.* **214**:549-561.
- Mountain A., McChesney J., Smith M.C.M. y Baumberg S. (1986) Gene sequence encoding early enzymes of arginine synthesis within a cluster in *Bacillus subtilis*, as revealed by cloning in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**:1026-1028.
- Mulligan M.E. 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.
- Muro-Pastor A., Flores E. , Herrero A. y Wolk C.P. (1992) Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **6**:3021-3030.
- Murphy R.C., Gasparich G.E., Bryant D.A. y Porter R.D. (1990) Nucleotide sequence and further characterization of the *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 *recA* gene: complementation of a cyanobacterial *recA* mutation by the *Escherichia coli recA* gene. *J. Bacteriol.* **172**:967-976.
- Murry M.A. y Wolk C.P. (1989) Evidence that the barrier to the penetration of oxygen into heterocysts depends upon two layers of the cell envelope. *Arch. Microbiol.* **151**:469-474.
- Nierzwicki-Bauer S.A., Curtis S.E. y Haselkorn R. (1984) Cotranscription of genes encoding the small and large subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5961-5965.
- North A.K., Smith M.C.M. y Baumberg S. (1989) Nucleotide sequence of a *Bacillus subtilis* arginine regulatory gene and homology of its product to the *Escherichia coli* arginine repressor. *Gene* **80**:29-38.
- Parsot C., Boyen A., Cohen G.N. y Glansdorff, N. (1988) Nucleotide sequence of *Escherichia coli argB* and *argC* genes: comparison of N-acetylglutamate kinase and N-acetylglutamate- γ -semialdehyde dehydrogenase with homologous and analogous enzymes. *Gene* **88**:275-283.

- 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 W.R. y Lipman D.J.** (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:2444-2448.
- Picard F.J. y Dillon J.R.** (1989) Cloning and organization of seven arginine biosynthesis genes from *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* **171**:1644-1651.
- Porter R.D., Buzby J.S., Pilon A., Fields P.I., Dubbs J.M. y Stevens S.E.** (1986) Genes from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* isolated by complementation: characterization and production of merodiploids. *Gene* **41**:249-260.
- Rice D., Mazur B.J. y Haselkorn R.** (1982) Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **257**:13157-13163.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M. y Stanier R.Y.** (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**:1-61.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (eds.)** (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Saraste M., Sibbald P.R. y Wittinghofer A.** (1990) The P-loop _ a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**:430-434.
- Schmetterer G. y Wolk C.P.** (1988) Identification of the region of cyanobacterial plasmid pDU1 necessary for replication in *Anabaena* sp. strain M-131. *Gene* **62**:101-109.
- Schneider G.J. y Haselkorn R.** (1988a) RNA polymerase subunit homology among cyanobacteria, other eubacteria and archaebacteria. *J. Bacteriol.* **170**:4136-4140.
- Schneider G.J. y Haselkorn R.** (1988b) Characterization of two early promoters of cyanophage N-1. *Virology* **167**:150-155.

- Schneider G.J., Tumer N.E., Richaud C., Boberly G. y Haselkorn R. (1987)** Purification and characterization of RNA polymerase from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* **262**:14633-14639.
- Schneider G.J., Lang J.D. y Haselkorn R. (1991)** Promoter recognition by the RNA polymerase from vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *Gene* **105**:51-60.
- Scrutton N.S., Berry A. y Perham N.R. (1990)** Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* **343**:38-43.
- Shine J. y Dalgarno L. (1974)** The 3' sequence of *E. coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**:1342-1346.
- Short J.M., Fernández J.M., Sorge J.A. y Huse W.D. (1988)** λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with in vivo excision properties. *Nucl. Acids Res.* **16**:7583-7601.
- Simon R.D. (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.
- Smith M.C.M., Mountain A. y Baumberg S. (1990)** Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *argC* gene encoding N-acetylglutamate-gamma-semialdehyde dehydrogenase. *Nucl. Acids Res.* **18**:4595.
- Stanier R.Y. y Cohen-Bazire G. (1977)** Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**:225-274.
- Tandeau de Marsac N., Borrias W.E., Kuhleimeier C.J., Castets A.M., Van Arkel G.A. y Ven den Hondel C.A.M.J.J. (1982)** A new approach for molecular cloning in cyanobacteria: cloning of an *Anacystis nidulans met* gene using a transposon Tn901-induced mutant. *Gene* **20**:111-119.
- Tandeau de Marsac N. y Houmard J. (1987)** Advances in cyanobacterial molecular genetics. En *The Cyanobacteria*, (Fay P. y Van Baalen C., eds.), pp. 251-295. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Amsterdam.

- Tang T. y Asato Y.** (1978) Ultraviolet light-induction and photoreactivation of thymine dimers in a cyanobacterium, *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* **118**:193-197.
- Thiel T. y Wolk C.P.** (1987) Conjugal transfer of plasmids to cyanobacteria. *Methods Enzymol.* **153**:232-243.
- Thiel T. y Poo H.** (1989) Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. *J. Bacteriol.* **171**:5743-5746.
- Thomas J., Meeks J.C., Wol C.P., Shaffer P.W., Austin S.M. y Chien W.-S.** (1977) Formation of glutamine from [¹³N]ammonia, [¹³N]dinitrogen, and [¹⁴C]glutamate by heterocysts isolated from *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.* **129**:1545-1555.
- Tumer N.E., Robinson S.J. y Haselkorn R.** (1983) Different promoters for the *Anabaena* glutamine synthetase gene during growth using molecular or fixed nitrogen. *Nature* **306**:337-342.
- Udaka S.** (1966) Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. *J. Bacteriol.* **91**:617-621.
- Vega-Palas M.A., 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.
- Vega-Palas M.A., Flores E. y Herrero A.** (1992) NtcA, a global nitrogen regulator from the cyanobacterium *Synechococcus* that belongs to the Crp family of bacterial regulators. *Mol. Microbiol.* **6**:1853-1859.
- Vioque A.** (1992) Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucl. Acids Res.* **20**:6331-6337.
- Voellmy R. y Leisinger T.** (1975) Dual role for N²-acetylornithine 5-aminotransferase from *Pseudomonas aeruginosa* in arginine biosynthesis and arginine catabolism. *J. Bacteriol.* **122**:799-809.
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J. y Gay N.J.** (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**:945-951.

- Wei T.-F., Ramasubramanian T.S., Pu F. y Golden J.W.** (1993) *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *bifA* gene encoding a sequence-specific DNA-binding protein cloned by in vivo transcriptional interference selection. *J. Bacteriol.* **175**:4025-4035.
- Woese C.R.** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* **51**:221-271.
- Wolk C.P.** (1973) Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. *Bacteriol. Rev.* **37**:32-101.
- Wolk C.P.** (1982) Heterocysts. En *The biology of cyanobacteria*, (Carr N.G. y Whitton B.A., eds.), pp. 359-386. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wolk C.P., Vonshak A., Kehoe P. y Elhai J.** (1984) Construction of shuttle vectors capable of conjugative transfer from *Escherichia coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:1561-1565.
- Wolk C.P., Cai Y., Cardemil L., Flores E., Hohn B., Murry M., Schmetterer G., Schrautemeier B. y Wilson R.** (1988) Isolation and complementation of mutants of *Anabaena* sp. strain PCC 7120 unable to grow aerobically on dinitrogen. *J. Bacteriol.* **170**:1239-1244.
- Wolk C.P., Cai Y. y Panoff J.-M.** (1991) Use of a transposon with luciferase as a reporter to identify environmentally responsive genes in a cyanobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5355-5359.
- Wolters M.A., Bodnar M.E., Strem M.D. y Bingham S.E.** (1991) Dereglulation of arginine biosynthesis in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**:56-59.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. y Messing J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.

VII. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla. Ha sido financiado con ayudas a la investigación concedidas por la Junta de Andalucía y la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (DGICYT-MEC) y mediante una beca de Formación del Profesorado y Personal Investigador (FPPI-MEC).

A los Dres. Enrique Flores y Antonia Herrero, directores de esta Tesis, les agradezco su dedicación e interés en el desarrollo del trabajo aquí presentado así como sus aportaciones a mi formación científica durante estos cuatro años. A nivel personal, les agradezco su paciencia y comprensión en algunos momentos difíciles. Al Dr. Agustín Vioque le agradezco el ser Tutor de esta Tesis y su ayuda en muchas ocasiones.

Al Dr. Angel Mérida tengo tanto que agradecerle que es difícil saber por dónde empezar. Por orden cronológico, primero el haber evitado, junto con el Dr. Sebastián Chávez, que me hubiera convertido en una funcionaria prematura y supieran guiarme con gran maestría en los intrincados caminos de la Bioquímica y en la tortuosa vida del Becario. Les agradezco a los componentes de aquel laboratorio 114 su estupenda acogida y sus notables enseñanzas. Segundo, su apoyo constante e incondicional a lo largo de todos estos años de trabajo así como sus juicios críticos y constructivos que han influido de manera muy positiva en mi modesta formación científica. Por último, el haber contribuido al 50% en el resultado más querido y menos discutible de estos últimos cuatro años, Angela.

A los que me han tenido que aguantar tantas horas seguidas en el mismo laboratorio, en un espacio estrecho y limitado, sin quejarse, no sé cómo agradecerles su paciencia conmigo, el cómo me iniciaron en unas técnicas desconocidas para mí, su amistad. En fin, para mis compañeros del laboratorio 120, el agradecimiento más agradecido (valga la redundancia). Y cómo cualquier orden de importancia resulta imposible, os iré nombrando según habéis ido cediendo vuestra mesa y silla al siguiente: al Dr. Pepe Nieto (nuestro Pepe), al Dr. Miguel Vega, a la Dra. Alicia Muro, al futuro Dr. Ignacio Luque, idem Dr. José Enrique Frías e idem Dra. M^a Luz Montesinos. No voy a olvidarme aquí de la reciente sección eucariótica del grupo: a José M^a Romero (Director de los Invernaderos), por sus correcciones de mi pobre inglés y, por supuesto, a la futura Dra. Rosario, por su gran amistad y confianza.

A los "hermanos" Jesús de la Cruz y M^a Cruz Muñoz-Centeno, que me sufrieron como compañera de promoción y después de trabajo, les agradezco su infinita paciencia escuchando agobios tanto científicos como personales y haber moldeado, aún sin saberlo, muchas de las aristas de mi formación científica y humana. A Jesús, gracias también por su ayuda con las fotos. Al resto del personal del laboratorio 108 también gracias, especialmente a Tere, Ana e

Isa. A la Dra. Rocío Rodríguez le agradezco el haberme servido de modelo en numerosas ocasiones. A Paco Navarro, también futuro Doctor, le agradezco su reciente amistad y el estar dispuesto siempre a escuchar mis resultados (los buenos y los malos). A todos los demás, a la Dra. Maribel Muro, a José Carlos, a Begoña, a Blanca, a Antonio, a las dos Mercedes, les agradezco que el ambiente durante trabajo y las comidas (gracias a tí también Consuelo) haya sido tan grato.

Al resto de los miembros del Instituto, y al Director del mismo, el Prof. Miguel García Guerrero, como su representante, les agradezco su inestimable ayuda y su amabilidad.

A J. R. Dillon y F. Picard del Departamento de Biología de la Universidad de Ottawa, Canadá, les agradezco el envío de la colección de auxótrofos de arginina de *E. coli* y a W. J. Buikema y R. Haselkorn el habernos permitido el uso de la genoteca de *Anabaena* 7120 antes de su publicación.

Por último, quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, que me permitieran emprender la aventura de estudiar Biología en Sevilla, su confianza y su apoyo durante todos estos años e incluso su interés sobre algo que les resulta un poco incomprensible, esta Tesis. A mi familia política les agradezco su presencia y ayuda sin las cuales el último año de trabajo hubiera sido, si cabe, aún más duro.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. BELEN FLORIANO PARDAL titulada CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS GENES *arg C* y *arg D* EN LA CIANOBACTERIA *Anabaena* sp PCC 7120 acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDE"

Sevilla, 10 de Diciembre 1993

El Vocál,

[Signature]

El Vocál,

[Signature]

El Vocál,

[Signature]

El Presidente

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Decerado,

[Signature]



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672916